

Estudio morfológico e identificación de giberelinas endógenas en raíces de maíz (*Zea mays* L.) afectado por el Mal de Río Cuarto

Poloni, N., M. Tordable, A. Vigliocco, G. Boito, E. Lorenzo y G. Abdala

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la histología de raíces adventicias y laterales de maíz afectadas por el virus MRDV. Asimismo se identificaron giberelinas A₁, A₃ y A₄ como endógenas de estos órganos, procediendo a su cuantificación parcial.

Los resultados muestran que la virosis produce alteraciones en el cilindro central y la endodermis, las que comienzan en elementos del floema, en relación con los cuales se forman protuberancias que sobresalen hacia la corteza. Algunas raíces laterales muestran severas alteraciones en su anatomía. En cuanto al análisis de giberelinas libres y conjugadas se observa un metabolismo diferencial entre raíces sanas y afectadas. Por lo tanto, la disminución del crecimiento radical y posiblemente el enanismo del tallo producidos por la virosis, sean una consecuencia directa de las marcadas alteraciones morfológicas y hormonales observadas en los tejidos radicales.

Abreviaturas: AcOH, ácido acético; BSTFA, bis-trimetil-trifluoroacetamida; C₁₈, octadecilsilano; EtOAc, acetato de etilo; GC-MS, cromatografía gaseosa-espectrometría de masa; KRI, índice de retención de Kovats; MeOH, metanol; MRDV, virus del maíz enano rugoso; MeTMSi, metiltrimetilsilil-derivado; N (CH₃)₂, nucleosil; SiO₂, ácido silícico.

Palabras Clave: Mal de Río Cuarto, MRDV, raíces, hiperplasia, giberelinas.

N. Poloni, M. Tordable, A. Vigliocco, G. Boito, E. Lorenzo y G. Abdala, 1993. Morphology study and identification of endogenous gibberellins of maize (*Zea mays* L.) roots affected by Mal de Río Cuarto. Agriscientia, X : 11-19.

SUMMARY

In this paper we analyzed the histology of maize lateral and adventitious roots affected by MRDV virus. Likewise, gibberellins A₁, A₃, A₄, were identified as endogenous of these organs, and partially quantified.

Results show that virus infection produces alterations in the central cylinder and endodermis, beginning in the phloem elements, forming protuberances towards cortex. Some lateral roots show severe alterations in their anatomy. In relation to free and conjugated gibberellins, it was observed a differential metabolism

between healthy and diseased roots. Therefore, diminution of root growth and possibly stem dwarfism produced by MRDV, may be a direct consequence of morphological and hormonal alterations observed in root tissues.

Key words: Mal de Río Cuarto, MRDV, roots, hyperplasia, gibberellins.

N. Poloni, M. Tordable, A. Vigliocco, G. Boito, E. Lorenzo, G. Abdala. Dpto de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas Físico - Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. 5800 - Río Cuarto. Córdoba. Argentina.

INTRODUCCIÓN

El Mal de Río Cuarto, enfermedad virósica del maíz que ocasiona severas pérdidas en la producción de granos y forraje, es causada por el Maize Rough Dwarf Virus. La presencia del MRDV fue detectada en tejidos vasculares de hoja, tallo y raíz, más precisamente en células parenquimáticas del floema (Nome *et al.*, 1981; Milne *et al.*, 1983; Milne y Boccardo, 1984).

La sintomatología de la enfermedad fue descrita por Lenardón y March (1985) y Lenardón *et al.* (1987), quienes destacaron como síntomas diferenciales la presencia de enaciones en hojas y chalas, el acortamiento de los entrenudos del tallo (enanismo) y la reducción del sistema radical.

En general el grupo de los Fijivirus al cual pertenece el MRDV induce crecimiento neoplásico principalmente en floema, afectando también algunos elementos xilemáticos (Francki *et al.*, 1985).

En un trabajo previo (Castillo *et al.*, 1989) se observó que la infección con MRDV afectaba principalmente los tejidos vasculares de los nudos y entrenudos basales del tallo. El floema mostraba hiperplasia y las células resultantes habían perdido su típica estructura y disposición. Además se observaron masas de xilema en posición anormal, con abundantes miembros de vasos y traqueidas de paredes engrosadas.

Tordable *et al.* (1991) demostraron que el MRDV causa en raíces de maíz severas alteraciones en el cilindro central, con lignificación de esta estructura y de la endodermis, y señalaron la presencia de raíces laterales anormales. Asimismo se observó un metabolismo diferencial de giberelinas endógenas.

Por ser el "enanismo" del tallo y la reducción del sistema radical los principales síntomas del Mal de Río Cuarto se sugiere que el MRDV podría afectar la regulación hormonal del crecimiento de éstos órganos, alterando síntesis, metabolismo

y/o transporte de hormonas, entre ellas el grupo de las giberelinas.

Tanimoto (1990) ha demostrado que las giberelinas regulan el normal crecimiento de las raíces a concentraciones extremadamente más bajas que las necesarias para el crecimiento del tallo; por otra parte se menciona que las raíces sintetizan giberelinas las que son transportadas a los tallos (Carr *et al.*, 1964; Crozier and Reid, 1971; Prochazka, 1981; Dathe *et al.*, 1982).

A partir de tejidos vegetativos (plántulas), inflorescencias masculinas y femeninas, polen y semillas de maíz se han identificado las siguientes giberelinas endógenas: AG₁, AG₃, AG₄, AG₅, AG₈, AG₉, AG₁₂, AG₁₇, AG₁₉, AG₂₀, AG₂₉, AG₄₄ y AG₅₃ (Hedden *et al.*, 1982; Heupel *et al.*, 1985; Fujioka *et al.*, 1988, 1990; Phinney *et al.*, 1985, 1990; Murofushi *et al.*, 1990).

Los objetivos de este trabajo fueron: i) analizar las alteraciones histológicas de raíces enfermas descriptas preliminarmente en un trabajo anterior (Tordable *et al.*, 1991), en comparación con la histología de raíces sanas; ii) determinar la identidad química de las giberelinas endógenas en raíces de maíz sanas y atacadas por el MRDV y cuantificarlas, a fin de establecer correlaciones entre estas hormonas y la sintomatología mencionada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de maíz Morgan 400 de aproximadamente 60 cm de altura infectadas con Mal de Río Cuarto, mostrando alteraciones exomorfológicas características de la virosis, y plantas sanas, se recolectaron en un lote de Cuatro Vientos (Dpto Río Cuarto) en Diciembre 1989 y Enero 1990.

Estudios Histológicos

Raíces adventicias y laterales se seccionaron y fijaron en FAA (formol: ácido acético:etanol:agua; 30:5:50:15 v/v) para obtener preparados histológicos permanentes. El material se des-

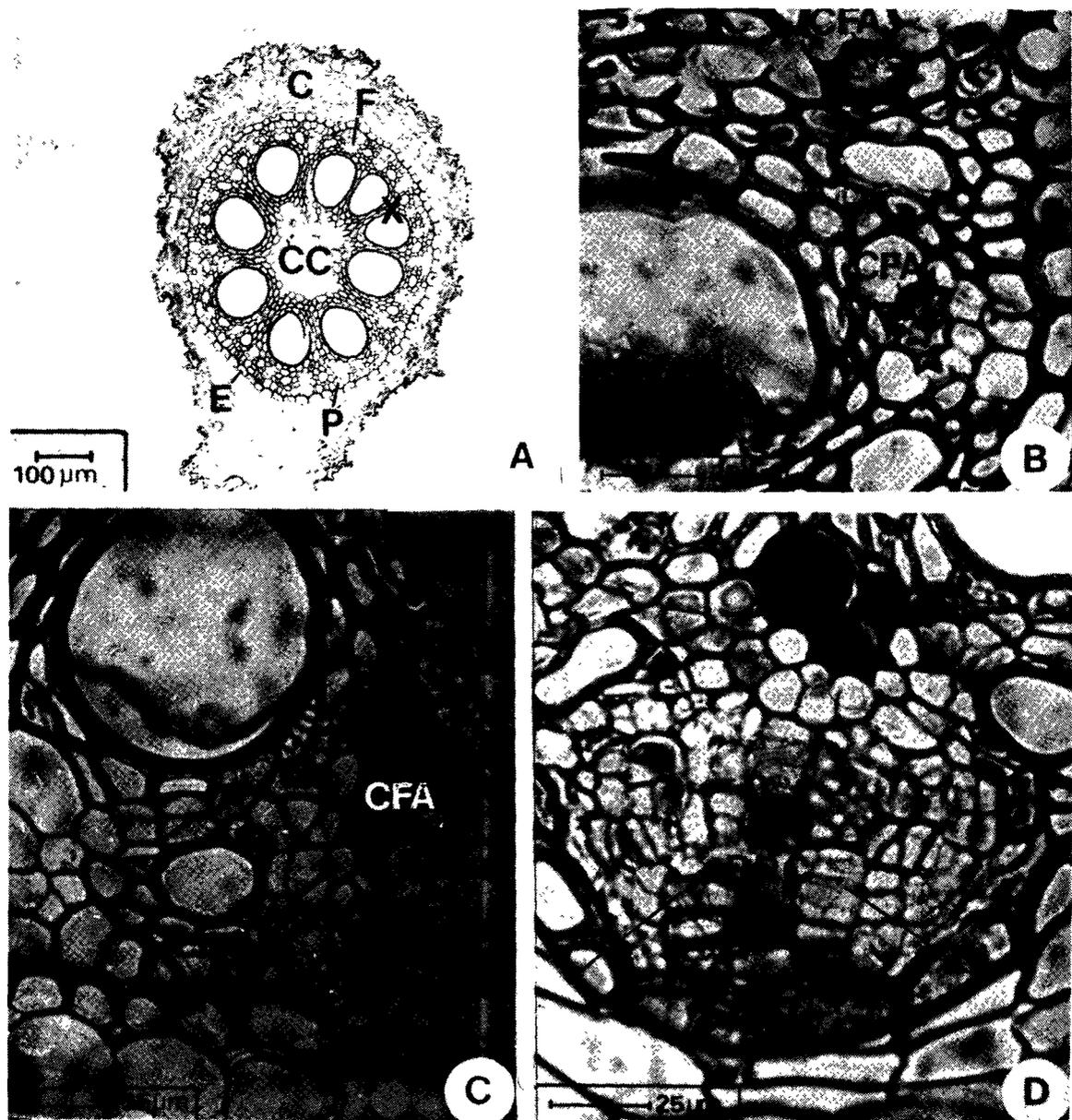


Figura 1. Fotomicrografías en sección transversal de raíces adventicias de maíz (*Zea mays* L.) sanas y afectadas por el MRDV. A. Raíz adventicia de planta sana. C. corteza, CC: cilindro central, E: endodermis, F: floema, P: periciclo, X: xilema. B, C, D. Detalles de cilindro central de planta afectada. B, C. Células del floema con alteraciones: CFA. D. Proliferación celular en relación con polo afectado. PRC

hidrató en serie de alcohol etílico de diferentes gradaciones, seguido de una serie de alcohol-xilol y xilol puro; luego se incluyó en parafina (Johansen, 1940).

Cortes transversales seriados de 13 µm de espesor se obtuvieron en micrótopo rotativo; se co-

lorearon usando "hematoxilina-safranina-verde permanente" y se montaron en bálsamo de Canadá. La observación del material se realizó con microscopio óptico Zeiss, Standard 16 y las fotomicrografías se tomaron con microscopio Leitz Orthoplan.

Análisis de giberelinas endógenas

Extracción de Giberelinas:

5 g de PF de raíces se congelaron con nitrógeno líquido y homogeneizaron con 40 ml de MeOH acuoso al 80 %. El sobrenadante se separó y el residuo fue extraído con 20 ml adicionales de MeOH. Ambos sobrenadantes se reunieron, filtraron y eluyeron a través de una columna cromatográfica de C18 (Koshioka *et al.*, 1983). Con la adición de agua destilada el eluido se llevó a una concentración de 50 % de MeOH para ser purificado sobre una segunda columna de C18, la cuál se lavó finalmente con 20 ml de MeOH 40 %. El solvente se evaporó bajo vacío a 37° C y el agua remanente se eliminó por liofilización. El residuo obtenido contenía las giberelinas en sus formas libres y conjugadas.

Cromatografía en columna de partición de SiO₂:

El residuo anterior se traspasó a 0.5 g de celite, el cual se colocó sobre el tope de una columna corta de SiO₂ (Koshioka *et al.*, 1983) eluida primero con mezcla de EtOAc: n-hexano (95:5), y luego con 100 ml de MeOH puro en orden de separar las giberelinas libres de las formas conjugadas.

La fracción conteniendo giberelinas libres se evaporó y cromatografió sobre una segunda columna larga de SiO₂ (Durley *et al.*, 1972; Powell and Tautvydas, 1967), eluida con gradiente de EtOAc (de 0 a 100 %) y n-hexano (de 100 a 0 %), recolectándose 24 fracciones de 10 ml cada una, las que se llevaron a sequedad. La actividad biológica de cada fracción se midió mediante el bioensayo de arroz enano (*Oryza sativa* L.) cv. Tan-ginbozu.

Posteriormente, las fracciones que mostraron actividad biológica se reunieron nuevamente y se les adicionó [1,2 (n)⁻³H] GA₁ (Amersham), actividad específica de 1,21 TBq mmol⁻¹ y [-1,2 (n)⁻³H] GA₄ (Amersham), actividad específica de 1.4 TBq mmol⁻¹ como estándares internos.

Hidrólisis enzimática:

Las giberelinas conjugadas obtenidas de la columna corta de SiO₂ se sometieron a hidrólisis enzimática para obtener giberelinas libres (Rood *et al.*, 1983). Para ello, el residuo se disolvió en 0.4 ml de buffer acetato 0,2 M pH 4 y 0.2 ml de celulasa (Calbiochem) al 1 %. La mezcla se incubó a 37° C durante 16 hs.; se centrifugó, y el sobrenadante se particionó con EtOAc saturado en agua, llevándose a sequedad. El residuo conteniendo

giberelinas libres liberadas por acción enzimática se cromatografió sobre columna larga de SiO₂.

Cromatografía líquida de alta presión:

Las fracciones de giberelinas libres provenientes de raíces sanas se analizaron en HPLC sobre columna Nucleosil N(CH₃)₂ eluida con MeOH 99.9 % en 0.1 % de AcOH durante 50 min a un flujo de 1 ml min⁻¹. Cada una de las 50 fracciones obtenidas se llevaron a sequedad y se bioensayaron mediante el bioensayo de arroz enano en diluciones de 1/50 y 1/100.

Debido a la presencia de mayores impurezas, la fracción de giberelinas conjugadas de raíces sanas, y las fracciones de giberelinas libres y conjugadas de raíces enfermas se analizaron previamente en C₁₈- Z-module fase reversa con el siguiente programa: 0 a 30 min gradiente lineal desde 37 % a 100 % MeOH en 0.1 de AcOH, luego, 30 a 50 min 100 % MeOH a un flujo de 1 ml min⁻¹. 25 fracciones de 1 min cada una (0-25 min), 5 fracciones de 2 min cada una (26-35 min) más una fracción de 15 min, se recolectaron y bioensayaron como se mencionó anteriormente.

Las fracciones de ambas fechas de muestreo que mostraron actividad se reunieron y cromatografiaron sobre columna de Nucleosil N(CH₃)₂, recolectándose 45 fracciones de 1 min cada una más una fracción de 15 min adicionales; luego se procedió a realizar el bioensayo correspondiente.

Bioensayo:

Para medir la actividad giberélica se empleó el bioensayo de la microgota de arroz enano (*Oryza sativa* L.) cv. Tan-ginbozu (Murakami, 1968). La actividad biológica se expresó como ng de GA₃ equivalente por g de PF de tejido.

Cromatografía gaseosa

Espectrometría de masa:

Las fracciones a analizar por GC-MS se convirtieron a derivados MeTMSi con diazometano y piridina: BSTFA (1:1), y trimetilclorosilano al 1 % (Pierce Chem. Co). Alícuotas de cada fracción se inyectaron sobre una columna capilar Hewlett-Packard-1 de 25 m x 0.32 mm de un Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5790 A, conectado por una interfase a un Detector selectivo de masa Hewlett-Packard 5970.

El programa usado fue: temp 1 = 60° C, tiempo 1 = 1 min; temp 2 = 270° C, tiempo 2 = 20 min. Se utilizó Helio como fase móvil gaseosa. El KRI para giberelinas auténticas y endógenas se calculó co-inyectando una mezcla de hidrocarburos

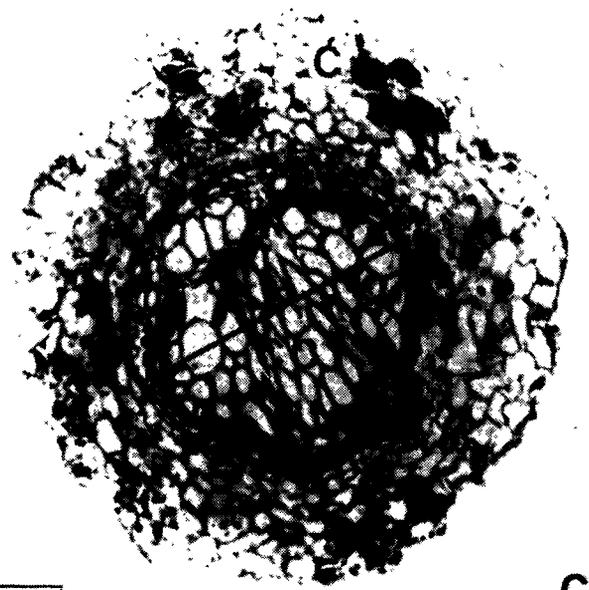
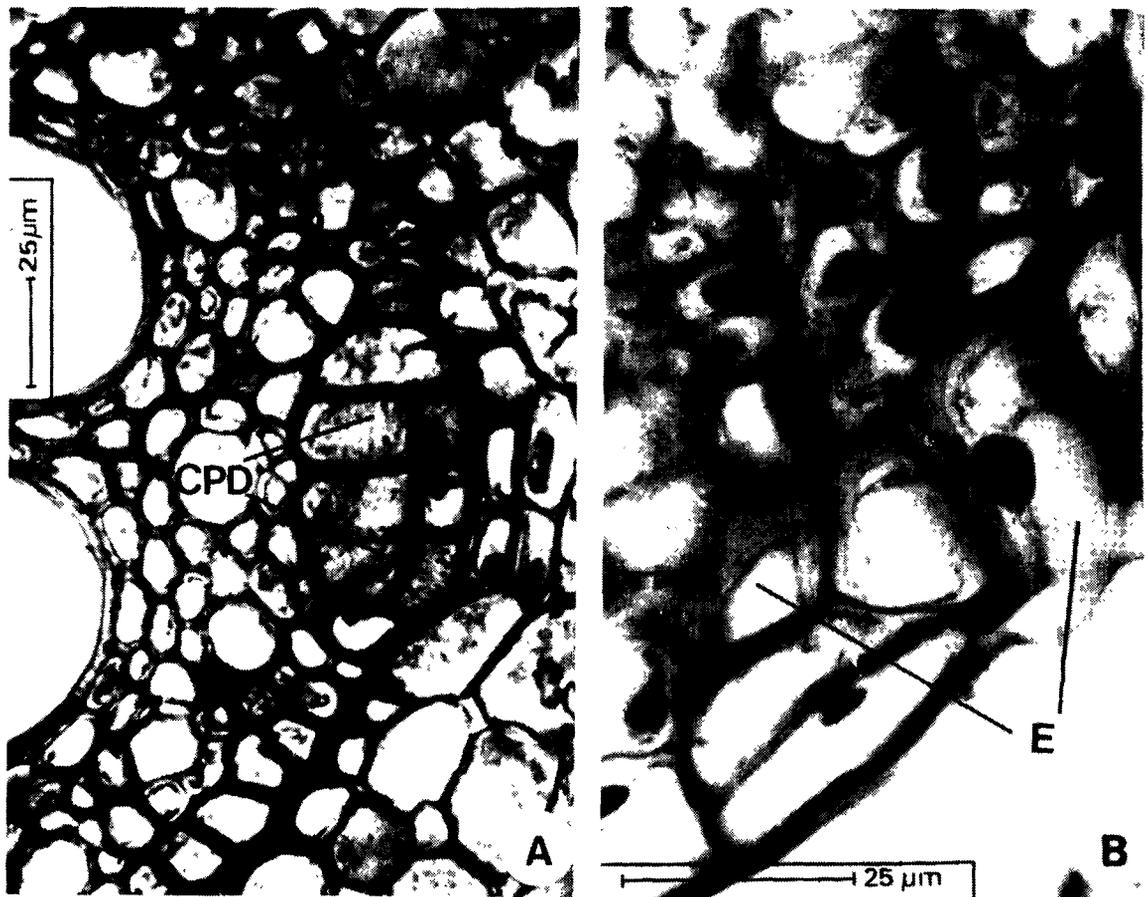


Figura 2. Fotomicrografías en sección transversal de raíces adventicias y laterales de maíz (*Zea mays* L.) afectadas por el MRDV. A. Detalle de cilindro central de raíz adventicia con células del periciclo en división CPD. B. Detalle de endodermis: E. C. Raíz lateral con cilindro central alterado: CC; C: corteza.

100 µm

C

(Kovats, 1958; Gaskin *et al.*, 1971). La identificación de giberelinas se basó en la comparación del KRI y de las intensidades relativas de 5 iones característicos de los derivados MeTMSi de giberelinas endógenas y giberelinas auténticas empleadas como estándares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las raíces adventicias y laterales de una planta de maíz sana poseen estructura poliarca; en el cilindro central los tejidos vasculares, xilema y floema, alternan entre sí rodeados por el periciclo, límite externo de esta zona. En contacto con el periciclo se ubica la endodermis, estrato uniestratificado que representa el límite interno de la corteza enteramente parenquimática y rodeada por una epidermis uniestratificada (Fig. 1 A).

Las raíces adventicias y laterales afectadas por el MRDV presentan alteraciones a nivel de cilindro central y endodermis. En las primeras, la afección comienza en los polos de floema, progresando hacia xilema, periciclo y endodermis.

En el floema los elementos celulares afectados son miembros de tubo criboso y células acompañantes, las cuales podrían alojar el virus, lo que corroboraría lo observado por Nome *et al.* (1981), Milne *et al.* (1983), Milne y Boccardo (1984), en cuanto a la presencia del MRDV en células del floema. Dichos elementos presentan alteraciones tales como: acúmulos de materiales que se depositan en relación con la pared y lumen celular parcial o totalmente ocupado por un contenido que difiere del normal, de aspecto denso, granuloso, que presenta afinidad por los colorantes, adquiriendo tonalidad muy intensa (Fig. 1 B y C). En relación con estos elementos se inicia una proliferación celular, observándose numerosas divisiones; las células resultantes luego de diferenciarse en elementos de xilema y floema quedan dispuestas en forma más o menos desordenada; algunas de ellas presentan paredes celulares secundarias con puntuaciones, mientras que otras permanecen semejantes a las parenquimáticas (Fig. 1 D). Además, entre ellas, existen células que presentan citoplasma con las mismas modificaciones observadas en los elementos de floema (posiblemente ocupadas por el virus).

En relación con esta proliferación o próxima a ella, se evidencian en el periciclo divisiones celulares predominantemente periclinales, que si bien como lo señalaran Bell and Mc Cully (1970) en maíz es uno de los procesos, juntamente con la basofilia, que anteceden al inicio de una raíz lateral, las

células aquí resultantes depositan inmediatamente pared secundaria lignificada (Fig. 2 A).

En la endodermis diversos autores (Bell and Mc Cully, l.c.; Karas and Mc Cully, 1973) han observado divisiones celulares anticlinales en una etapa temprana del desarrollo del primordio, remoción del engrosamiento de la pared secundaria y delignificación. En las raíces analizadas en este trabajo no se detectaron dichas modificaciones a nivel de pared celular, aunque se han observado divisiones celulares en sentido periclinal, agrandamiento celular y marcada lignificación de la pared (Fig. 2 B).

Como resultado de la proliferación celular descrita en tejidos vasculares, periciclo y endodermis, se forman protuberancias en el cilindro central que sobresalen hacia la corteza; podemos suponer que en estadios más avanzados de la afección se produce desorganización de los tejidos en estas protuberancias, generándose zonas de necrosis muy significativas descritas previamente por Tordable *et al.* (1991).

De lo expuesto se comprueba que el MRDV induce formación anormal de tejidos a nivel de floema y de algunos elementos de xilema, hecho observado por Francki *et al.* (1985), aunque los resultados obtenidos en este trabajo permiten inferir que la hiperplasia incluye también periciclo y endodermis.

Se han analizado raíces laterales que conservan la estructura poliarca típica en el cilindro central y otras que la han perdido, en ellas se evidencian algunos polos de floema afectados, con engrosamientos en las paredes celulares; el xilema se presenta desordenado y ocupando gran parte del cilindro central (Fig. 2 C).

La distribución cualitativa de giberelinas libres y conjugadas, de raíces de plantas sanas y enfermas de maíz, evaluadas por el bioensayo de arroz enano cv. Tan-ginbozu, ha sido resumida en Fig. 3 y 4.

El nivel endógeno de giberelinas libres obtenidas de raíces sanas, recolectadas durante los meses de Dic/89 (Fig. 3 A) y Ene/90 (gráfica no presentada) es relativamente bajo, a diferencia, en el perfil de estas mismas sustancias obtenidas de raíces de plantas enfermas recolectadas en Dic/89 se observa un pico de actividad correspondiente a la zona de elución de GA₁ estándar (Fig. 3 B), el cual disminuye marcadamente en la recolección del mes de Ene/90 (gráfica no presentada).

De las fracciones 19-27 de la cromatografía sobre HPLC de giberelinas libres obtenidas de raíz

Tabla 1. Identificación y cuantificación tentativa de giberelinas endógenas de raíces de plantas de maíz sanas y afectadas por el Mal de Río Cuarto. Expresadas como ng por 5 g de PF de tejido.

	Raíces sanas	Raíces enfermas
Giberelinas libres		
GA ₁	—	trazas
GA ₃	0.3 ng	1 ng
Giberelinas conjugadas		
GA ₁	—	0.1 ng
GA ₃	—	0.3 ng
GA ₄	—	3.3 ng

ces sanas (Fig. 3 A) se identificó por GC-MS la presencia de GA₃, y de las fracciones 12-16 de la cromatografía de extracto de raíces enfermas (Fig. 3 B) se identificó GA₁ y GA₃ (Tabla 1).

El bajo nivel de giberelinas libres determinado en raíces sanas extraídas en Dic/89 corroboraría lo sugerido por Tanimoto (1990) en cuanto a que estas hormonas regularían el crecimiento radical a muy bajas concentraciones. Por lo tanto, relativos altos niveles endógenos de giberelinas, tales como los evaluados en raíces afectadas, podrían inhibir el crecimiento de estos órganos.

En el muestreo realizado en Ene/90, cuando las plantas de maíz alcanzaron su estado reproductivo (emergencia de la inflorescencia masculina), el nivel de giberelinas libres de raíces sanas y enfermas fue menor respecto al muestreo de Dic/89 (plantas en estado de crecimiento vegetativo) y no se observaron diferencias apreciables entre ellas.

La presencia de GA₃ en raíces sanas y de GA₁ y GA₃ en raíces enfermas plantea el interrogante de si estas giberelinas son las responsables del crecimiento de estos órganos, tal como se indica para el crecimiento de los tallos en esta especie. Por otro lado es conocido el hecho de que las giberelinas se trasladan de la raíz al tallo y viceversa; por lo tanto la disminución del sistema radical de plantas enfermas podría ser consecuencia de concentraciones diferenciales de estas hormonas en sus formas libres, así como también de la alteración de la funcionalidad de los tejidos vasculares, lo que dificultaría el movimiento de giberelinas y de otras hormonas como auxinas sintetizadas en la parte apical de la plan-

ta; asimismo el traslado de fotoasimilados se vería también afectado.

En cuanto a conjugados giberelínicos endógenos, su nivel fue mayor en raíces enfermas (Fig. 4 B) que en sanas (Fig. 4 A) en ambas fechas de recolección de muestras. De las fracciones 5-15 de la cromatografía sobre HPLC, correspondiente a giberelinas libres provenientes de la hidrólisis de conjugados, obtenidos de raíces enfermas (Fig. 4 B), se identificó por GC-MS GA₃, GA₁ y GA₄ (Tabla 1). En extractos correspondientes a la fracción de giberelinas libres por hidrólisis de conjugados, de raíces sanas, no se logró identificar la presencia de compuestos tipo giberelina. El nivel importante de conjugados en raíces enfermas sugiere que, al igual que en el caso de las formas libres, se producen severas modificaciones.

De este modo se comprueba que el virus no modificaría la ruta biosintética de giberelinas en raíces, debido a que se identificaron GA₁ y GA₃, quienes representan extremos finales del camino de biosíntesis en maíz.

Cabe señalar que la cuantificación de giberelinas es parcial debido a que los estándares internos fueron adicionados a los extractos una vez que se había realizado parte de la purificación como se detalla en Materiales y Métodos; por lo tanto las pérdidas previas que pudieron ocurrir, no han podido ser contabilizadas.

Por otro lado, y en referencia al metabolismo de giberelinas, la presencia de GA₁ y GA₃ en raíces de maíz indica la ocurrencia de la vía de síntesis denominada 13-hidroxiativa temprana; mientras que la identificación tentativa de GA₄ sugiere una vía metabólica adicional a la mencionada. Desde el punto de vista de la interconversión de giberelinas en diversos órganos de una misma especie, este trabajo menciona por vez primera la identificación de éstas hormonas en raíces de maíz y señala la posibilidad de la existencia de dos vías metabólicas diferentes tal como se informara para semillas, polen e inflorescencias masculinas y femeninas de maíz (Murofushi *et al.*, 1990).

El acortamiento de entrenudos del tallo y la disminución del crecimiento radical viene acompañado por marcadas alteraciones morfológicas observadas en los tejidos radicales y de las diferencias metabólicas en giberelinas endógenas, provocadas por la presencia del virus MRDV.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue realizado con fondos aportados por CONICOR y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la U.N.R.C.

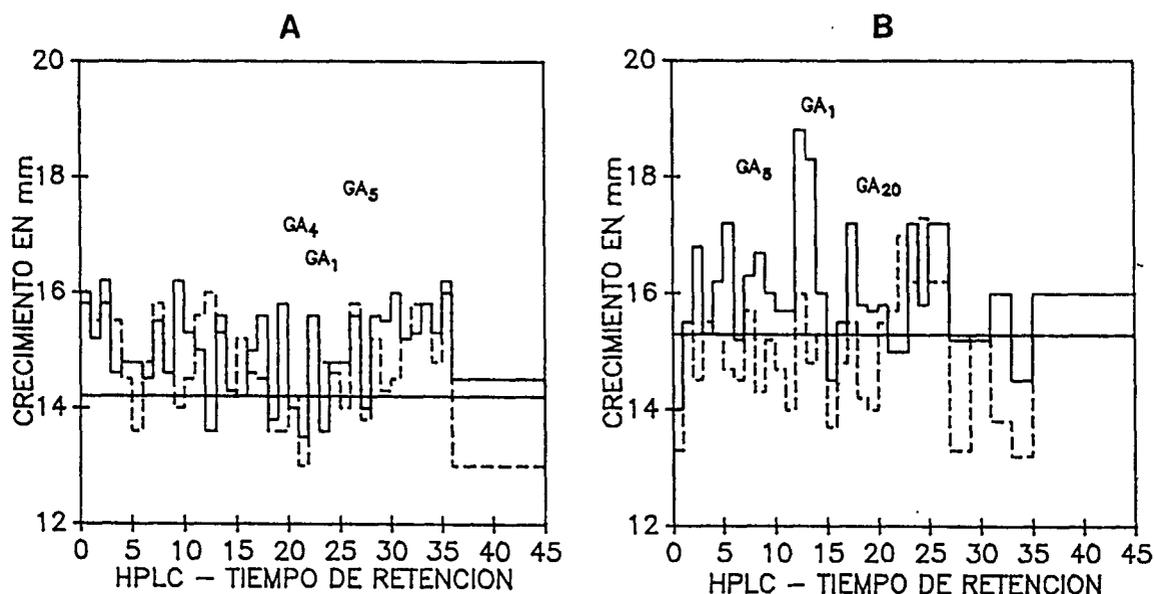


Figura 3. A) Perfil de elución de giberelinas libres obtenidas de raíces de plantas sanas de maíz, analizadas por HPLC sobre columna de nucleosil; corrida isocrática 99.9 % de metanol; bioensayadas mediante la prueba de arroz enano cv. Tanginbozu. Línea llena = dilución 1/50. Línea punteada = dilución 1/100. B) Perfil de elución de giberelinas libres obtenidas de raíces de plantas enfermas de maíz, analizadas por HPLC sobre columna de nucleosil; corrida isocrática 99.9 % de metanol; bioensayadas mediante la prueba de arroz enano cv. Tanginbozu. Línea llena = dilución 1/50. Línea punteada = dilución 1/100.

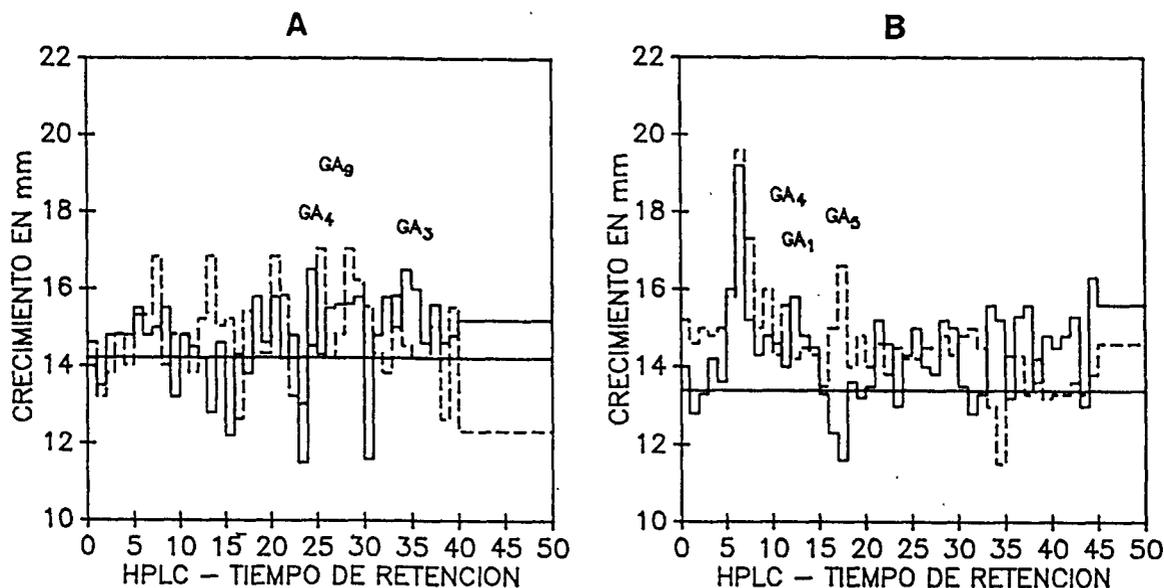


Figura 4. A) Perfil de elución de giberelinas conjugadas obtenidas de raíces de plantas sanas de maíz, analizadas por HPLC sobre columna de nucleosil; corrida isocrática 99.9 % de metanol; bioensayadas mediante la prueba de arroz enano cv. Tanginbozu. Línea llena = dilución 1/50. Línea punteada = dilución 1/100. B) Perfil de elución de giberelinas conjugadas obtenidas de raíces de plantas enfermas de maíz, analizadas por HPLC sobre columna de nucleosil; corrida isocrática 99.9 % de metanol; bioensayadas mediante la prueba de arroz enano cv. Tanginbozu. Línea llena = dilución 1/50. Línea punteada = dilución 1/100.

BIBLIOGRAFÍA

- Bell, J. K., M. E. Mc Cully, 1970. A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays* L. *Protoplasma* 70: 179-205.
- Carr, D. J., D. M. Reid, K. G. M. Skene, 1964. The supply of gibberellins from the root to the shoot. *Planta* 63: 382-292.
- Castillo, N., N. Tavecchio, E. Lorenzo, G. Abdala, 1989. Histología y análisis hormonal de nudos y entrenudos de plantas de maíz (*Zea mays* L.) sanas y atacadas por el MRDV, agente del Mal de Río Cuarto. *Revista de la Universidad de Río Cuarto*. 9 (1): 15-28.
- Crozier, A., D. M. Reid, 1971. Do roots synthesize gibberellins? *Can J. Bot* 49: 967 - 975.
- Dathe W. G., G. Sembdner, I. Yamaguchi, N. Takahashi, 1982. Gibberellins and growth inhibitors in spring bleeding sap, roots and branches of *Juglans regia* L. *Plant and Cell Physiol* 23: 115- 23.
- Durley, R. C., A. Crozier, R. P. Pharis, G. E. McLaughlin, 1972. Chromatography of 33 gibberellins on a gradient eluted silica gel partition column. *Phytochemistry* 11: 3029-3033.
- Francki, R., R. Milne, T. Hatta, 1985. Atlas of plant viruses. I. CRC Press INC. Florida.
- Fujioka, S. H., H. Yamane, C. Spray, P. Gaskin, J. MacMillan, B. O. Phinney, N. Takahashi, 1988. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of normal, dwarf 1, dwarf 2, dwarf 3 and dwarf 5 seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 88: 1367-1372.
- Fujioka, S. H., H. Yamane, C. Spray, B. O. Phinney, P. Gaskin, J. MacMillan, N. Takahashi, 1990. Gibberellin A₃ is biosynthesized from gibberellin A₂₀ via gibberellin A₅ in shoots of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 94: 127-131.
- Gaskin, P., J. MacMillan, R. D. Firn, R. J. Pryce, 1971. "Parafilm", a convenient source of n-alkane standards for the determination of gas chromatographic retention indices. *Phytochemistry* 10: 1155-1157.
- Hedden, P., B. O. Phinney, R. Heupel, D. Fujii, H. Cohen, P. Gaskin, J. MacMillan, J. E. Graebe, 1982. Hormones of young tassels of *Zea mays* L. *Phytochemistry* 21: 390-393.
- Heupel, R. C., B. O. Phinney, C. R. Spray, P. Gaskin, J. MacMillan, P. Hedden, J. E. Graebe, 1985. Native gibberellin and the metabolism of (¹⁴C) gibberellin A₅₃ and of 17-¹³C-³H₂ gibberellin A₂₀ in tassels of *Zea mays* L. *Phytochemistry* 24: 47-53.
- Johansen, D., 1940. *Plant microtechnique* VII - XI, pp 3-503. Mac Graw Hill Book Co, New York.
- Karas, I., M. E. Mc Cully, 1973. Further studies of the histology of lateral root development in *Zea mays* L. *Protoplasma* 77: 243-269.
- Koshioka, M., K. Takeno, F. D. Beall, R. P. Pharis, 1983. Purification and separation of plant gibberellins from their precursors and glucosyl conjugates. *Plant Physiology* 73 : 389-406.
- Kovats, E., 1958. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentions Indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv Chim Acta* 41 : 1915-1932.
- Lenardón, S. L., G. J. March, 1985. Cartilla guía UNRC - INTA.
- Lenardón, S. L., G. J. March, J. E. Beviacqua, J. A. Ornaghi, A. Marinelli, 1987. Maíz: Mal de Río Cuarto CREA-AACREA, 6-15.
- Milne, R. G., E. Boccardo, E. Dalbo, S. F. Nome, 1983. Association of maize rough dwarf virus with Mal de Río Cuarto in Argentina. *Phytopathology* 73 : 1290-1292.
- Milne, R. G., E. Boccardo, 1984. Descriptions of plants viruses. Set 18 Plant Reovirus Group n° 294.
- Murakami, Y., 1968. A new rice seedling bioassay for gibberellins, "microdrop method", and its use for testing of rice and morning glory. *Bot Mag (Tokyo)* 81 : 33-43.
- Murofushi, N., I. Honda, R. Hirasawa, I. Yamaguchi, N. Takahashi, B. O. Phinney, 1990. Gibberellins from tassel, cob, seed, silk, and pollen of maize. In: Gibberellins. Ed. N. Takahashi, B. Phinney, J. MacMillan pp 32-39.
- Nome, S. F., S. L. Lenardón, B. C. Raju, I. G. Laguna, S. R. Lowe, D. Docampo, 1981. Association of reovirus like particles with enfermedad de Río Cuarto of maize in Argentina. *Phytopathology Z.* 101 : 7-15.
- Phinney, B. O., 1985. Gibberellin A₁, dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biol. Plant.* In: Plant Growth Regulators (International Symposium, Liblice, CZECH Ed. M. Kutacek).
- Phinney, B. O., C. R. Spray, Y. Suzuki, P. Gaskin, 1990. Gibberellin metabolism in maize: tissue specificity. In: Gibberellins Ed. N. Takahashi, B. Phinney, J. MacMillan, pp 22-31.
- Powell, L. E., K. J. Tautvydas, 1967. Chromatography of gibberellins on silica gel partition columns. *Nature* 213 : 292-293.
- Procházka, S., 1981. Translocation of growth regulators from roots in relation to the stem apical dominance in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. In: Structure and Function of Plant Roots. Ed. R. Brouwer *et al.* 407-409. Martinus Nijhoff, W. Junk Publishers, The Hague.
- Rood, S. B., R. P. Pharis, M. Koshioka, 1983. Reversible conjugation of gibberellins in situ in maize. *Plant Physiology* 73 : 340-346.
- Tanimoto, E., 1990. Gibberellin requirement for the normal growth of roots. In: Gibberellins. Ed. N. Takahashi, B. Phinney, J. MacMillan, pp 229-240.
- Tordable, M., N. Tavecchio, E. Lorenzo, G. Abdala, 1991. Histology and gibberellin levels in healthy and diseased maize (*Zea mays* L.) roots affected by Mal de Río Cuarto. *Turrialba* 41 (2) : 183-189.