

## DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE ÁCIDO INDOLIL-3-ACÉTICO EN ALTRAMUZ

J. Sánchez-Bravo\*, A. Ortuño\*, M. Acosta\* y F. Sabater\*

Recibido: marzo 1984

### ABSTRACT

#### Fluorimetric determination of indolil-3-acetic acid in Lupine

The quantification of the phytohormone, indolil-3-acetic acid (IAA), in methanolic extracts of etiolated hypocotyls of Lupine by a fluorimetric method, has been investigated. The application of the established criteria for the use of this method shows that the observed fluorescence corresponds to the fluorescent IAA derivative, and that the other components of the methanolic extracts do not interfere in the measure. So, it is possible to quantify directly the IAA in the methanolic extracts without previous purification.

### RESUMEN

Se ha estudiado la determinación de la fitohormona ácido indolil-3-acético (AIA), en extractos metanólicos de hipocotilos etiolados de altramuz, mediante un método fluorimétrico. Aplicando los criterios establecidos para la utilización de dicho método, se comprueba que, la medida fluorimétrica corresponde al derivado fluorescente del AIA, y que otros componentes naturales presentes en el extracto no interfieren de forma apreciable en la medida. Todo lo cual permite realizar la cuantificación directa de AIA en el extracto metanólico inicial.

### INTRODUCCIÓN

La investigación relativa a la hormona vegetal ácido indolil-3-acético (AIA) implica, en ocasiones, la necesidad de realizar determinaciones de los niveles endógenos, cuya principal dificultad estriba en la baja concentración de hormona en los tejidos vegetales (del orden de los  $\mu\text{g}$  por Kg de peso fresco).

Durante muchos años, el único procedimiento para la determinación de auxinas en material vegetal ha consistido en la utilización de bioensayos basados en diferentes efectos fisiológicos producidos por la hormona: ensayo de la curvatura del coleoptilo de avena, del crecimiento recto de secciones del coleoptilo de avena, el de la curvatura del tallo hendido de

guisante, entre otros (BONNER, 1933; WENT & THIMANN, 1937).

Si bien los bioensayos poseen una gran sensibilidad, presentan sin embargo graves inconvenientes debido principalmente a la inespecificidad de la respuesta, ya que otras hormonas vegetales, así como diversos metabolitos, pueden interferir positiva o negativamente con el efecto producido por las auxinas.

En la actualidad se han desarrollado otras técnicas de análisis para reemplazar el ensayo biológico, basadas en métodos fisicoquímicos: métodos cromatográficos (SEELEY & POWELL, 1974; SWARTZ & POWELL, 1979; DURING, 1977; FRANKENBERGER & BRUNNER, 1983; WURST *et al.*, 1980; CROZIER *et al.*, 1980); métodos de espectrometría de masas

\* Departamento Interfacultativo de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Matemáticas. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

(CARUSO *et al.*, 1978; HEIKES, 1980; McDOUGALL & HILLMAN, 1978; ALLEN *et al.*, 1979; LITTLE *et al.*, 1978); métodos fluorimétricos (MUKHERJEE *et al.*, 1981; STOESSL & VENIS, 1970; IINO *et al.*, 1980; MOUSDALE, 1980; MOUSDALE *et al.*, 1978; ELIASSON *et al.*, 1976; KNEGT & BRUINSMA, 1973; PLIENINGER *et al.*, 1964).

Los principales problemas que plantean dichas técnicas radican en la necesidad de eliminar del medio las sustancias que puedan interferir en la cuantificación de la auxina, lo que puede requerir procesos largos de purificación del extracto vegetal (KNEGT & BRUINSMA, 1973; BANDURSKI & SCHULZE, 1974; LIU & TILLBERG, 1983).

En 1970, Stoessel y Venis pusieron a punto un método fluorimétrico para la determinación de AIA en extractos vegetales, basado en la medida de la fluorescencia del derivado 2-metilindol- $\alpha$ -pirona (2-MIP), obtenido por reacción de AIA con anhídrido acético. Desde su publicación este método ha sido ampliamente utilizado (ELIASSON *et al.*, 1976; KNEGT & BRUINSMA, 1973), pero investigaciones posteriores han demostrado que la reacción con anhídrido acético es específica para los compuestos indólicos ácidos y neutros con un metileno en la cadena lateral del C-3 (MOUSDALE *et al.*, 1978; BOETTGER *et al.*, 1978), algunos de los cuales (4-Cl-AIA; 5-OH-AIA) se han detectado en extractos de diferentes especies (MARUMO *et al.*, 1968; WEST, 1959), junto con AIA. Por otra parte, las medidas de fluorescencia pueden estar distorsionadas seriamente por los efectos de dispersión de la luz causados por compuestos no caracterizados presentes en los extractos vegetales (KAMISAKA & LARSEN, 1977).

De todo lo anterior se deduce que para llevar a cabo una estimación correcta de la auxina por el procedimiento fluorimétrico, es necesario realizar previamente una serie de comprobaciones en el extracto a utilizar. Estos criterios de fiabilidad han sido propuestos por MOUSDALE (1980), después de un intenso estudio, y suministran información en dos aspectos fundamentales:

—Sobre la naturaleza química de la sustancia fluorescente presente en el extracto. Mediante estudios espectrales se confirma que la fluorescencia medida corresponde al 2-MIP y no a otros fluoróforos.

—Sobre la existencia en el extracto de sustancias interferentes que distorsionen la medida de fluorescencia. Se deduce a partir de medidas de la turbidez del medio, cuantificación constante de la concentración de AIA a tiempos variables y cinética de descenso de la fluorescencia

detectada, así como de los datos espectrales.

El objetivo del presente trabajo es poner a punto un procedimiento fluorimétrico que permita realizar una correcta determinación del nivel de AIA en extractos de hipocotilos etiados de altramuz, especie cuyo crecimiento y metabolismo auxínico es investigado en nuestro laboratorio. Para ello, se han aplicado los criterios de fiabilidad propuestos por MOUSDALE (1980) a extractos brutos o sometidos a diferentes etapas de purificación.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### MATERIAL VEGETAL

Las semillas de altramuz (*Lupinus albus* L.) se mantienen en imbibición durante 24 h en oscuridad. Se siembran en bandejas de plástico, utilizando como soporte inerte vermiculita. Las plántulas crecen en total oscuridad y a 25° C, manteniéndose el nivel de humedad con riegos diarios. Al cabo de 8 días se procede a cortar secciones de 0.5 cm de localización definida con respecto al ápice, congelándose a -20° C hasta su uso.

### EXTRACCIÓN Y PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACIÓN

La extracción del material vegetal se realiza según el método indicado por KNEGT & BRUINSMA (1973), con modificaciones: cantidades variables de material congelado se trituran en frío con metanol frío conteniendo 100 mg/l de 2,6-di-ter-butil-p-cresol (BHT) en proporción de 20 ml de extractante por cada g de peso fresco, con un homogeneizador Polytron® PT 10-35. Una vez homogeneizado el material se adiciona AIA-C<sup>14</sup> (0,085  $\mu$ Ci/g) disuelto en metanol conteniendo 1 mg/ml de BHT, para controlar pérdidas durante el proceso. La extracción se realiza a -15° C durante 90 min y oscuridad. La suspensión metanólica se filtra sobre papel Whatman N.º 5 y el residuo se lava con metanol hasta obtener un volumen final de extracto correspondiente a la relación peso/volumen indicada.

Para la purificación del extracto bruto se han utilizado los siguientes procedimientos:

- 1) El procedimiento modificado por KNEGT & BRUINSMA (1973), en el que se utiliza PVP.
- 2) El procedimiento modificado propuesto por ATSUMI, KURAISHI & HAYASHI (1976), con diclorometano.
- 3) El procedimiento propuesto por LIU & TILLBERG (1983), con modificaciones (fig. 1).
- 4) Desarrollo cromatográfico en poliamida del extracto bruto, utilizando como eluyente benceno: acetato de etilo: ácido acético (70:25:5), conteniendo BHT 100 mg/l (IINO *et al.*, 1980).

El control del rendimiento en las distintas etapas se realiza midiendo la radiactividad de alícuotas de 0.1 ml en un contador de centelleo líquido Rack Beta Modelo 1211, utilizando para

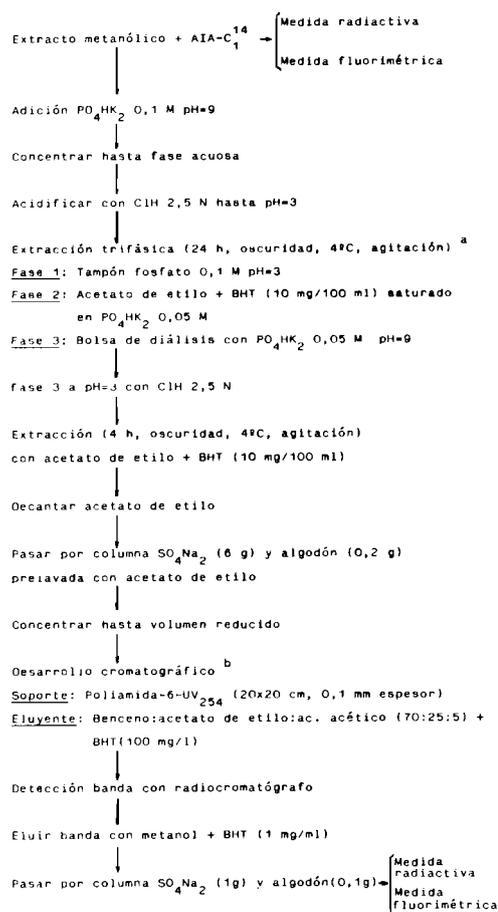


FIGURA 1. Esquema del procedimiento de purificación 3 (véase Material y Métodos). *a*, las relaciones de los volúmenes utilizados entre las fases del proceso de extracción son: 1:1.5:0.5, para las fases 1, 2 y 3, respectivamente. *b*, las placas cromatográficas son previamente lavadas con acetato de etilo-ácido acético (95:5), dejándolas secar a continuación.

Scheme of purification procedure 3 in Material and Methods. *a* In the extraction, the volume ratio is 1:1.5:0.5 for phase 1, phase 2 and phase 3 respectively. *b* The TLC plates were washed by eluting with ethyl acetate: acetic acid (95:5, v/v) and air dried.

cada ensayo 10 ml de centelleador (4 g de PPO; 0.2 g de POPOP; 667 ml de tolueno y 333 ml de tritón X100).

#### REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos usados han sido: AIA (Merck); AIA-C<sup>14</sup> (Radiochemical Centre, Amersham); PVP (insoluble, Sigma); ácido trifluoroacético (especial para espectroscopía, Merck); anhídrido acético (reactivo analítico, AnalaR); BHT (BDH).

Estos reactivos fueron usados sin alguna otra purificación. Entre los disolventes utilizados: metanol (para cromatografía LiChrosolv, Merck) redistilado; diclorometano (para análisis, Merck) redistilado; acetato de etilo (para análisis, Merck) redistilado; benceno (para análisis, Merck) redistilado; ácido acético (puris. A. R., Koch-Light Laboratories Ltd) redistilado.

#### DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA

Para la determinación fluorimétrica del AIA se procede bien con extractos brutos o purificados, según los procedimientos indicados, de la siguiente forma: alícuotas de 0.1 ml de los extractos metanólicos se depositan en tubos de ensayo cónicos (1.5x10 cm), cuidando que la disolución no quede en las paredes del tubo. Se concentra a sequedad eliminando el disolvente por evaporación a presión reducida y a temperatura ambiente. Al residuo seco se le adiciona 0.1 ml de reactivo fluorimétrico previamente enfriado a 0° C. Dicho reactivo está formado por volúmenes iguales de anhídrido acético y ácido trifluoroacético. La reacción transcurre a 0° C deteniéndose a los 15 min por adición de 4 ml de agua destilada.

La fluorescencia se mide con un espectrofluorímetro SPF-500<sup>1M</sup> de Aminco acoplado a un registrador X-Y Aminco 7040 A/7041 A.

La fuente de luz es el arco de una lámpara de xenón. Los máximos de excitación y de emisión en los que se realizan las medidas son 440 nm y 490 nm, respectivamente (INO *et al.*, 1980), y la anchura de banda es de 5 nm en ambos casos. La medida de la fluorescencia se realiza a los 60 s después de detener la reacción, para evitar el efecto de las burbujas formadas en la solución sobre la dispersión de luz (MOUSDALE, 1980), obteniéndose el valor de la fluorescencia relativa (F<sub>r</sub>).

Para la cuantificación de AIA en los extractos se procede según el método propuesto por STOESSL & VENIS (1970), en donde la cantidad de AIA endógeno viene dada por la abscisa en el origen de la recta de calibrado obtenida al representar F<sub>r</sub>-F<sub>r</sub> frente a la cantidad de AIA adicionado (0, 5, 10, 15 ng), siendo F<sub>i</sub> la fluorescencia inicial y F<sub>r</sub> la residual al cabo de 24 h de haber detenido la reacción.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### ESTUDIOS ESPECTRALES

De acuerdo con MOUSDALE (1980), la fluorescencia medida debe estar asociada a un fluoróforo que tenga el espectro de excitación y emisión del 2-MIP, si bien el espectro de excitación puede estar distorsionado por la presencia de otros componentes del extracto, lo cual puede ser evaluado por reacción de AIA auténtico en presencia del extracto.

Las experiencias realizadas con tal fin proporcionan los resultados recogidos en la tabla 1.

TABLA 1. Espectros de fluorescencia y porcentaje de transmitancia del derivado fluorescente de extractos brutos y purificados de hipocotilos de altramuç. *a*, máximo principal de excitación. *b*, la adición de 5 ng de AIA puro a una alícuota del extracto bruto se realiza antes de la reacción con anhídrido acético. *c*, para la medida de la transmitancia a 510 nm se utiliza como referencia agua destilada. Para los procedimientos de purificación, véase Material y Métodos.

Fluorescence spectra and transmission of the fluorescent derivative of crude and purified extracts of lupinus hypocotyls. *a* Principal excitation maximum. *b* Aliquot of sample mixed with 5 ng IAA before reaction with acetic anhydride. *c* Transmission measured against distilled water blank. For the purification processes see Material and Methods.

Muestra	Máximos de excitación ( $\lambda_{\text{emi}} = 490 \text{ nm}$ )	Máximo de emisión ( $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ )	% T (510 nm) <sup>c</sup>
AIA	267, 310, 420, 450 <sup>a</sup>	490	100
Extracto bruto	265, 330, 420 <sup>a</sup> , 450	490	97
Extrac. bruto + 5 ng AIA <sup>b</sup>	265, 310, 420 <sup>a</sup> , 450	490	97
Procedimiento 1	270, 375, 420 <sup>a</sup> , 450	490	98
Procedimiento 2	270, 335 <sup>a</sup> , 415, 450	490	98
Procedimiento 3	265, 310, 420 <sup>a</sup> , 450	490	100
Procedimiento 4	265, 310, 420 <sup>a</sup> , 450	490	99.9

Como resultado de este estudio espectral se concluye que tanto en extractos brutos como en purificados se presenta un pico de emisión bien definido a 490 nm similar al obtenido al reaccionar AIA puro con anhídrido acético. En cuanto a los máximos de excitación obtenidos para el extracto bruto, son semejantes a los obtenidos con AIA puro exceptuando el desplazamiento del pico a 310 que en este caso aparece alrededor de 330 nm. Cuando se purifica mediante el procedimiento de diálisis (LIU & TILLBERG, 1983), o por cromatografía en capa fina (IINO *et al.*, 1980), se restablece la posición de este pico. Por el contrario no suponen mejoras espectrales los procedimientos de purificación con PVP (KNEGT & BRUINSMA, 1973), y diclorometano (ATSUMI *et al.*, 1976). Otra diferencia con respecto al AIA puro radica en la localización del máximo principal, que sin embargo queda confirmado como característico de nuestro extracto a 420 nm al mantenerse su posición tras adicionar a una alícuota del extracto bruto 5 ng de AIA puro antes de la reacción con anhídrido acético.

#### % TRANSMITANCIA (510 nm)

La existencia de opalescencia en las soluciones destinadas al análisis por fluorescencia puede originar una medida distorsionada (MOUSDALE, 1980); por ello, se procede a medir el % T a 510 nm de los extractos brutos y purificados. Los resultados vienen dados en la tabla 1, y de ellos se deduce que nuestros extractos brutos no presentan este fenómeno de una forma acusada, ya que sus valores están

próximos al 99% exigido por MOUSDALE (1980). Por otra parte, los tratamientos de purificación con PVP utilizados por Mousdale para eliminar este tipo de sustancias (de naturaleza fenólica ácida que pudieran esterificarse durante el ensayo de reacción y que se insolubilizarán en el medio acuoso adicionado para detener la reacción), no proporcionan una mejora sustancial respecto al % T del extracto bruto. Sin embargo, un ligero aumento en el % T se consigue cuando se somete el extracto bruto a un procedimiento de purificación por diálisis (LIU & TILLBERG, 1983), o por desarrollo cromatográfico en poliamida (IINO *et al.*, 1980), alcanzándose un 100% y 99.9%, respectivamente. Dichas mejoras en el % T no parecen implicar, en ensayos previos realizados y que son objeto de estudios posteriores, variaciones en la cuantificación con respecto a los extractos brutos.

#### CINÉTICA DE DESCENSO

Después de la adición de agua para detener la reacción, la fluorescencia del 2-MIP desciende de acuerdo con una cinética característica (MOUSDALE, 1980), debido a la inestabilidad del derivado frente a la luz.

Esta cinética de la pérdida de fluorescencia se da en nuestros extractos como indica la figura 2. La vida media del fluoróforo es de aproximadamente 15 min después de detener la reacción, ya que en ese momento la fluorescencia alcanza valores que oscilan alrededor del 40-50%, en los distintos ensayos, con respecto al inicial. MOUSDALE (1980) observa asimismo

variaciones en la velocidad de descenso según el tipo de material. La caída es más lenta desde 30 a 120 min, estabilizándose prácticamente a

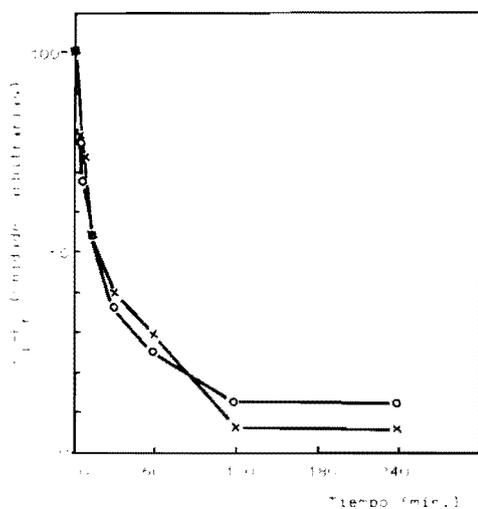


FIGURA 2. Descenso de la fluorescencia del derivado  $\alpha$ -pirone con el tiempo después de detener la reacción. (x-x) Extracto de plántulas de altramuz. (o-o) Extracto + 5 ng de AIA puro.  $F_i$  = fluorescencia inicial;  $F_r$  = fluorescencia residual 24 h después de detener la reacción.

Decay of fluorescence of  $\alpha$ -pirone derivative with the time, after stopping the reaction. Extrac (x-x) and extract + 5 ng pure IAA (o-o).  $F_i$  = initial fluorescence;  $F_r$  = background fluorescence 24 h after stopping the reaction.

partir de este momento en un valor residual de aproximadamente un 7% con respecto al inicial.

La figura 2 muestra que la adición de AIA puro al extracto bruto no modifica la cinética. Los extractos purificados presentan cinéticas semejantes así como valores muy próximos de  $F_r$  a las 24 h.

#### CUANTIFICACIÓN A DISTINTOS TIEMPOS

MOUSDALE (1980) establece que para asegurar la fiabilidad de la medida de AIA, es necesario que la cuantificación no varíe apreciablemente con el tiempo, ya que si en el medio existieran además del 2-MIP otros fluoróforos de fluorescencia variable con el tiempo, la cuantificación de AIA sería imposible.

Los resultados obtenidos en relación con este punto en nuestros extractos se representan en la figura 3, encontrándose una cuantificación independiente del tiempo hasta los 8 min después de detener la reacción, tanto en extractos brutos (A) como en purificados (B). Otros ensayos con extractos brutos indican que la cuantificación es constante hasta 30 min después de detenida la reacción.

#### SENSIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO FLUORIMÉTRICO

Además de la comprobación de los criterios propuestos por Mousdale, se han realizado di-

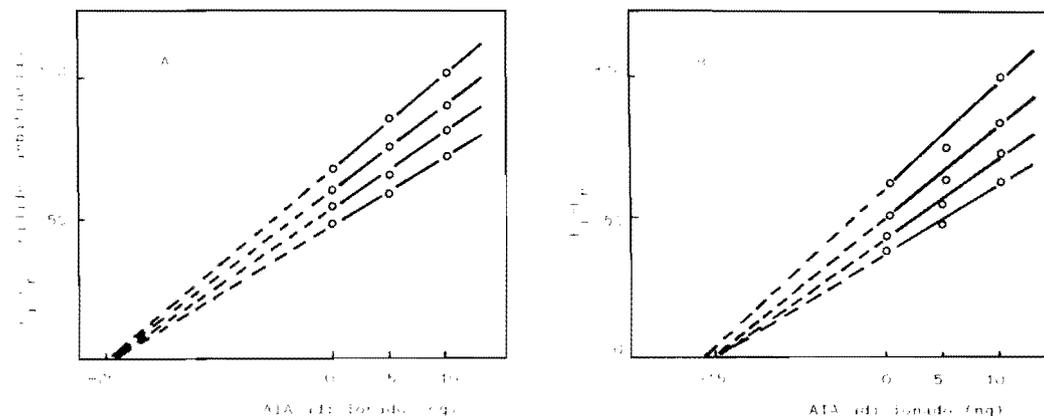


FIGURA 3. Cuantificación de AIA a tiempos variables (2, 4, 6, 8 min) después de detener la reacción. A, Extracto bruto de hipocótilos de altramuz; B, Extracto purificado por el procedimiento 2 (véase Material y Métodos).  $F_i$  = fluorescencia inicial;  $F_r$  = fluorescencia residual 24 h después de detener la reacción.

Determination of IAA at variable times (2, 4, 6, 8 min) after stopping the reaction. A, Crude extract of *lupinus hypocotyls*. B, Extract purified by procedure 2 (See Material and Methods).  $F_i$  = initial fluorescence;  $F_r$  = Background fluorescence 24 h after stopping the reaction.

versos ensayos a fin de establecer la sensibilidad y reproducibilidad del método fluorimétrico aplicado a nuestros extractos. El límite inferior de detección puede establecerse en aproximadamente 1 ng de AIA por 0.1 ml de extracto bruto. Concentraciones superiores a 30 ng/0.1 ml ya no proporcionan un valor lineal de fluorescencia, con lo que en este caso el extracto debe diluirse antes de proceder a su medida. Las determinaciones de AIA en diferentes alícuotas de 0.1 ml correspondientes a un mismo extracto bruto, presentan una reproducibilidad aceptable ya que, por ejemplo, para un valor medio de 9.74 ng/0.1 ml la desviación típica es de  $\pm 0.38$  ng. Finalmente, la determinación de AIA en dos muestras vegetales correspondientes a hipocotilos de plantas de igual edad y tamaño proporciona un valor medio de 2.66 ng de AIA por 0.1 ml de extracto bruto, con una desviación típica de  $\pm 0.43$ , lo que indica una buena reproducibilidad del proceso de extracción de la auxina del material vegetal.

En resumen, puede concluirse tras el estudio efectuado que es posible realizar una determinación fiable y reproducible del AIA presente en un extracto metanólico de hipocotilos etiolados de altramuz, obtenido según el procedimiento descrito. Los diferentes procesos de purificación a los que se ha sometido el extracto bruto no introducen variaciones sustanciales en ninguno de los criterios exigidos por MOUSDALE (1980). Este hecho implica que la cuantificación en extractos brutos debe coincidir con la cuantificación de extractos purificados, una vez corregidos los valores con los rendimientos deducidos del AIA radiactivo incorporado. Los primeros resultados así lo indican y deben de confirmarse en un estudio posterior más detallado.

#### BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, J. R. F., GREENWAY, A. M. & BAKER, D. A. 1979. Determinations of Indole-3-Acetic Acid in Xylem sap of *Ricinus communis* L. Using Mass Fragmentography. *Planta*, 144: 299-303.
- ATSUMI, S., KURAIISHI, S. & HAYASHI, T. 1976. An improvement of auxin extraction procedure and its application to cultured plant cells. *Planta*, 129: 245-248.
- BANDURSKI, R. S. & SCHULZE, A. 1974. Concentrations of Indole-3-acetic Acid and its Esters in *Avena* and *Zea*. *Plant Physiol.*, 54: 257-262.
- BOETTGER, M., ENGULD, K. C. & KAISER, P. 1978. Response of substituted indoleacetic acids in the indole- $\alpha$ -pyrone fluorescence determination. *Physiol. Plant.*, 43: 62-64.
- BONNER, J. 1933. The action of the plant growth hormone. *J. Gen. Physiol.*, 17: 63-76.
- CARUSO, J. L., SMITH, R. G., SMITH, L. M., CHENG, T.-Y. & DAVES, G. D., JR. 1978. Determination of Indole-3-Acetic Acid in Douglas Fir using a Deuterated Analog and Selected Ion Monitoring-comparison of Microquantities in Seedling and Adult Tree. *Plant. Physiol.*, 62: 841-845.
- CROZIER, A., LOFERSKI, K., ZAERR, J. B. & MORRIS, R. O. 1980. Analysis of Picogram Quantities of Indole-3-acetic Acid by High Performance liquid Chromatography-Fluorescence Procedures. *Planta*, 150: 366-370.
- DURING, H. 1977. Analysis of abscisic acid and indole-3-acetic acid from fruits of *Vitis vinifera* L. by high pressure liquid chromatography. *Experientia* 1977: 1666-1667.
- ELIASSON, L., STROMQUIST, L. H. & TILLBERG, E. 1976. Reliability of the indole- $\alpha$ -pyrone fluorescence method for indole-3-acetic acid determination in crude plant extracts. *Physiol. Plant.*, 36: 16-19.
- FRANKENBERGER, W. T., JR. & BRUNNER, W. 1983. Method of Detection of Auxin Indole-3-Acetic Acid in Soils by High Performance liquid chromatography. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47: 237-241.
- HEIKES, D. L. 1980. Mass Spectral Identification and Gas-liquid Chromatographic Determination of Methyl 4-Chloroindolyl-3-Acetate in Canned and Frozen Peas. *J. Assn. Offic. Anal. Chem.*, 63, 1.224-1.225.
- IINO, M., YU, R.S. T. & CARR, D. J. 1980. Improved Procedure for the Estimation of Nanogram Quantities of Indole-3-Acetic Acid in Plant Extracts Using the Indole- $\alpha$ -Pyrone Fluorescence Method. *Plant Physiol.*, 66: 1.099-1.105.
- KAMISAKA, S. & LARSEN, P. 1977. Improvement of the indole- $\alpha$ -pyrone fluorescence method for quantitative determination of endogenous indole-3-acetic acid in lettuce seedling. *Pl. Cell Physiol.*, 18: 595-602.
- KNEGT, E. & BRUINSMA, J. 1973. A rapid, sensitive accurate determination of indolyl-3-acetic acid. *Phytochemistry*, 12: 753-756.
- LITTLE, C. H. A., HEALD, J. K. & BROWING, G. 1978. Identification and Measurement of Indoleacetic and Abscisic Acids in the cambial Region of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. by Combined gas Chromatography Mass Spectrometry. *Planta*, 139: 133-138.
- LIU, S. & TILLBERG, E. 1983. Three-phase extraction and partitioning with the aid of dialysis - a new method for purification of indolyl-3-acetic and abscisic acids in plant materials. *Physiol. Plant.*, 57: 441-447.
- MARUMO, S., HATTORI, H., ABE, H. & MUNAKATA, K. 1968. Isolation of 4-chloroindolyl-3-acetic acid from immature seeds of *Pisum sativum*. *Nature*, 219: 959-960.
- MCDUGALL, J. & HILLMAN, J. R. 1978. Purification of IAA from Shoot tissues of *Phaseolus-vulgaris* and its analysis by GC-MS. *J. Exp. Bot.* 29: 375-386.
- MOUSDALE, D. M. A. 1980. Criteria for Assessing the Accuracy of the Pyrone Fluorimetric Assay for Indole-3-acetic Acid. *J. Exp. Bot.*, 31: 515-523.
- MOUSDALE, D. M. A., BUTCHER, D. N. & POWELL, R. G. 1978. Spectrophotofluorimetric methods of determining indole-3-acetic acid. In: HILLMAN, J. R. (Ed.), *Isolation of Plant Growth Substances*: 27-39. Cambridge University Press. London.

- MUKHERJEE, B. B., CHATTOPADHYAY, S. & GANGULY, S. N. 1981. Spectrofluorometric Determination of Endogenous level of IAA from tissues of *Nigella sativa* L. Grown *in vitro*. *Indian J. Exp. Biology*, 19: 295-297.
- PLIENINGER, H., MULLER, W. & WEINERTH, K. 1964. Indolo- $\alpha$ -pyrone und Indolo- $\alpha$ -pyridone. *Chem. Ber.*, 97: 667-681.
- SEELEY, S. D. & POWELL, L. E. 1974. Gas chromatography and detection of microquantities of gibberellins and indoleacetic acid as their fluorinated derivatives. *Anal. Biochem.*, 58: 39-46.
- STOESSL, A. & VENIS, M. A. 1970. Determination of submicrogram level of indole-3-acetic acid: A new, highly specific method. *Anal. Biochem.*, 34: 344-351.
- SWARTZ, H. J. & POWELL, L. E. 1979. Determination of indoleacetic acid from plant samples by an alkali flame ionization detector. *Physiol. Plant.*, 47: 25-28.
- WENT, F. W. & THIMANN, K. V. 1937. *Phytohormones*. Macmillan, New York.
- WEST, G., B. 1959. Indole derivatives in tomatoes. *J. Pharm. Pharmacol.*, Suppl. 11: (275T-277T).
- WURST, M., PRIKRYL, Z. & VANCURA, V. 1980. High-performance liquid chromatography of plant hormones. I.- Separation of plant hormones of the indole type. *J. Chromatography*, 191: 129-136.