

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA



T E S I S

Presentada para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

**FISIOLOGIA DE HONGOS PRODUCTORES DE
REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL**

Por

TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

Ing. Bioquímico Industrial

Sustentada el 30 de Enero de 1995 ante el jurado compuesto por:

| | |
|--|------------|
| DR. ERNESTO FAVELA TORRES | Presidente |
| M. C. MARIANO GUTIERREZ ROJAS | Secretario |
| M. C. ALEJANDRO AZAOLA ESPINOZA | Vocal |
| DR. RONALD FERRERA CERRATO | Vocal |

1995

A la memoria de mi abuelita *Hortensia González*:

A mis papás *Ibis y Victor*

A mi hermana *Karen*

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la realización de este trabajo contribuyeron muchas personas proporcionando nuevos conocimientos e información, haciendo críticas y apoyando con ideas. Agradezco infinitamente a todos ellos su valiosa colaboración y estímulo, pero en forma especial a las siguientes personas:

Al Dr. **Ernesto Favela**, quien pacientemente me orientó y auxilió durante mis estudios de maestría. Por su gran apoyo, colaboración, dirección, ideas y comentarios a lo largo de todo el trabajo.

Al M.C. **Mariano Gutiérrez**, por todas las aportaciones y sugerencias, además de su gran apoyo y dirección durante el tiempo de realización de este trabajo.

Al Dr. **Ronald Ferrera** y al M.C. **Alejandro Azaola** por su apreciable participación y atención a mi trabajo.

Al Dr. **Sevastianos Roussos**, responsable del Laboratorio de Biotecnología de ORSTOM, Montpellier, por los consejos y atenciones brindados a lo largo de mi estancia en esta institución. Una mención especial para **Angeles Torres** por todo su apoyo y palabras de aliento transmitidos a lo largo de mi estancia en dicha institución.

Al M.C. **Oscar Monroy**, por su apoyo en la parte experimental de este trabajo.

Al Dr. **Ronald Ferrera** y al M.C. **Jesús Pérez**, quienes me proporcionaron las cepas de hongos ectomicorrízicos que fueron utilizadas a lo largo del trabajo.

A la M.C. **Angeles Aquihuatl**, por la donación de cepas de hongos utilizados en el trabajo y por su colaboración e ideas.

Al M.C. **Javier Barrios**, quien me apoyó con acertados comentarios e ideas.

Al Dr. **Victor Volke**, por su gran apoyo en la parte estadística de este trabajo.

A la M.C. **Ibis Sepúlveda**, por su apoyo y colaboración durante la impresión de este documento.

Un reconocimiento especial al **CONACyT**, por el apoyo que me brindó al otorgarme la beca que hizo factibles mis estudios de maestría.

A la Ing. **Patricia Olgún** y al Ing. **Agustín Torres**, quienes pacientemente me apoyaron con su conocimiento en los análisis realizados por cromatografía de gases.

También expreso mi agradecimiento a todos los compañeros de la **Planta Piloto de Fermentaciones** de la UAM-I. Una mención especial para el Dr. **Gerardo Saucedo**, quien me apoyó con comentarios e ideas durante la realización del trabajo.

A mis amigos y a mi hermana **Karen**, quienes en momentos difíciles me transmitieron ánimos y por toda su paciencia y comprensión, especialmente a **Rosalinda**.

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue el de estudiar el efecto que provocan ciertas variables fisicoquímicas (temperatura, actividad de agua, fuente de carbono y concentración de CO₂) sobre el crecimiento de cuatro cepas de hongos productores de reguladores de crecimiento vegetal (*Suillus granulatus*, *Amanita rubescens*, *Pisolithus tinctorius* y *Gibberella fujikuroi*). La producción de ácido giberélico (AG₃) por *G. fujikuroi* como respuesta a la concentración de CO₂ fue evaluada por medio cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Se utilizaron bioensayos con semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) para la detección y cuantificación del ácido indolacético (AIA) producido por la cepa de *P. tinctorius* como respuesta a la presión parcial de CO₂.

El crecimiento de los hongos fue evaluado por medio de sus velocidades de crecimiento radial (VCR) y por la densidad de crecimiento (ρ_x) al tiempo final del experimento.

Se observó que al variar el nivel de la actividad de agua (A_w) en el medio de cultivo el crecimiento de las cuatro cepas se ve afectada: conforme dicho factor disminuye, se observa una disminución en la VCR y un aumento en ρ_x . Esta misma respuesta se observó para la concentración de CO₂: al aumentar el porcentaje de CO₂ en el ambiente de incubación, disminuye la VCR y aumenta la ρ_x .

Además de tener un efecto sobre el crecimiento de *P. tinctorius* y *G. fujikuroi*, el porcentaje de CO₂ en la atmósfera de incubación provoca un efecto en la producción de AIA y AG₃. Se detectó la presencia de AIA en los extractos de los medios en donde creció *P. tinctorius* a diferentes porcentajes de CO₂ iniciales, observándose la mayor concentración de este regulador en los extractos en donde la cepa fue incubada durante 406 horas con 30 % de CO₂ inicial.

Con respecto al análisis de los extractos del medio en donde creció *G. fujikuroi*, se observó que un cierto contenido inicial de CO₂ en la atmósfera de crecimiento del hongo, afecta de manera positiva la producción de AG₃, alcanzando una concentración de cerca de 10 mg/L a las 216 horas de incubación en una atmósfera con 30 % de CO₂. Esta respuesta resulta una contribución importante para el estudio de la producción de AG₃ por *G. fujikuroi*.

Palabras clave: Regulador de crecimiento vegetal; *Suillus granulatus*, *Amanita rubescens*, *Pisolithus tinctorius*, *Gibberella fujikuroi*; ácido giberélico, ácido indolacético; bioensayos.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| α | Amstrongs |
| ABA | Nivel de significancia |
| ADP | Acido abscisico |
| AG ₃ | Adenosin difosfato |
| AIA | Acido giberélico |
| AIB | Acido indolacético |
| AIP | Acido indolbutírico |
| AJ | Acido indolpropiónico |
| ANA | Acido jasmónico |
| APA | Acido naftalenacético |
| ATCC | Acido fenilacético |
| ATP | American Type Culture Coleccion |
| A _w | Adenosin trifosfato |
| C | Actividad de agua |
| CG | Concentración |
| CO ₂ | Cromatografia de gases |
| CR | Bióxido de carbono |
| DESV. STD. | Crecimiento radial |
| E | Desviación estándar |
| EM | Equivalentes |
| FC | Espectrometría de masas |
| G.L. | Fuente de carbono |
| HPLC | Grados de libertad |
| LR | Cromatografia líquida de alta presión |
| NRS | Longitud de raíz |
| ODS | Número de raíces secundarias |
| ORSTOM | Octadecil silano |
| % CO ₂ | Institut Français de Recherche Scientifique pour le |
| % G | Développement en Coopération |
| p(CO ₂) | Porcentaje de bióxido de carbono |
| PDA | Porcentaje de germinación |
| ρ_x | Presión parcial de bióxido de carbono |
| R ² | Medio de cultivo papa dextrosa agar |
| RCV | Densidad de crecimiento |
| RNA _t | Coefficiente de correlación |
| t | Regulador de crecimiento vegetal |
| T | Acido ribonucleico de transferencia |
| t _i | Tiempo |
| Trp | Temperatura |
| UV | Tiempo de incubación |
| | Triptofano |
| | Ultravioleta |

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. REVISION BIBLIOGRAFICA | 3 |
| 2.1. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (RCV) | 3 |
| 2.1.1. Características estructurales y función reguladora | 3 |
| 2.1.2. Efectos fisiológicos | 7 |
| 2.2. PRODUCCION DE RCV | 9 |
| 2.3. USOS Y APLICACIONES DE LOS RCV | 10 |
| 2.4. ANALISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE RCV | 12 |
| 2.4.1. Bioensayos | 12 |
| 2.4.1.1. Bioensayos con plantas | 12 |
| 2.4.1.2. Bioensayos con microorganismos | 14 |
| 2.4.2. Métodos fisicoquímicos | 14 |
| 2.4.2.1. Extracción de RCV | 15 |
| 2.4.2.2. Cuantificación de RCV | 17 |
| 2.4.3. Ensayos inmunológicos | 20 |
| 2.5. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE RCV | 21 |
| 2.5.1. Bacterias y actinomicetos | 21 |
| 2.5.2. Hongos | 23 |
| 2.5.2.1. Hongos filamentosos | 23 |
| 2.5.2.2. Hongos micorrízicos | 24 |
| 2.6. PRODUCCION DE RCV POR ECTOMICORRIZAS | 28 |
| 2.6.1. Requerimientos nutricionales para la producción de RCV | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3. MATERIALES Y METODOS | 33 |
| 3.1. MICROORGANISMOS | 33 |
| 3.1.1. Hongos productores de RCV | 33 |
| 3.1.2. Bioensayos con microorganismos | 35 |
| 3.2. MEDIOS DE CULTIVO | 35 |
| 3.2.1. Temperatura de incubación | 36 |
| 3.2.2. Actividad de agua (A_w) | 36 |
| 3.2.3. Fuente de carbono | 36 |
| 3.2.4. Presión parcial de CO_2 | 36 |
| 3.2.5. Bioensayos con semillas | 36 |
| 3.2.6. Bioensayos con microorganismos | 37 |
| 3.3. LLENADO DE VIALES CON CO_2 | 38 |
| 3.4. BIOENSAYOS | 39 |
| 3.4.1. Bioensayos con semillas | 39 |
| 3.4.2. Bioensayos con microorganismos | 39 |
| 3.5. ANALISIS DE MEDIOS DE CULTIVO POR HPLC | 40 |
| 3.5.1. Extracción de RCV del medio de cultivo | 41 |
| 3.6. EXPRESION DE RESULTADOS | 42 |
| 3.6.1. Velocidad de crecimiento radial | 42 |
| 3.6.2. Densidad de crecimiento | 42 |
| 3.6.3. Análisis estadístico | 43 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL | 44 |
| 4.2. EFECTO DE A_w EN EL CRECIMIENTO | 46 |
| 4.3. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL CRECIMIENTO | 52 |
| 4.4. EFECTO DEL PORCENTAJE DE CO_2 EN EL CRECIMIENTO | 56 |
| 4.4.1. Evolución de CO_2 | 60 |
| 4.5. ANALISIS DE RCV POR CROMATOGRAFIA | 62 |
| 4.5.1. Extracción de RCV del medio de cultivo | 62 |
| 4.5.2. Análisis de RCV en medios de cultivo | 63 |
| 4.6. BIOENSAYOS | 67 |
| 4.6.1. Bioensayos con semillas de alfalfa | 67 |
| 4.6.1.1. Acido indolacético | 67 |
| 4.6.1.2. Acido giberélico | 72 |
| 4.6.2. Bioensayos con microorganismos | 75 |
| 4.6.2.1. Bioensayos con levaduras | 76 |
| 4.6.2.2. Bioensayos con bacterias | 77 |
| 5. CONCLUSIONES | 80 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 82 |
| 7. GLOSARIO | 88 |
| 8. ANEXOS | 89 |

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son sustancias orgánicas que, en pequeñas concentraciones, provocan un efecto fisiológico en las plantas. Los RCV, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse en dos grandes grupos, los endógenos o fitohormonas, y los exógenos o sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Weaver, 1972; Salisbury y Ross, 1992).

Las fitohormonas son producidas por las plantas y, a bajas concentraciones tienen influencia en procesos fisiológicos en las mismas, entre los cuales se encuentran involucrados principalmente el crecimiento, diferenciación y desarrollo vegetal sin embargo, otros procesos tales como movimiento de estomas, también pueden ser afectados (Davies, 1987).

Los RCV exógenos, son compuestos sintetizados químicamente, o bien producidos por otros organismos diferentes de las plantas (Weaver, 1972; Salisbury y Ross, 1992). Para este tipo de sustancias se utiliza preferentemente el término de RCV, sin embargo este término no necesariamente está restringido a estos compuestos, si no que puede incluir también a las fitohormonas (Weaver, 1972; Larqué y Reyes, 1988).

De acuerdo a su estructura y funciones los RCV pueden ser clasificados principalmente en auxinas, giberelinas y citocininas, aunque también son considerados como RCV. otros compuestos como el etileno, el ácido abscísico, el ácido salicílico, las poliaminas y el ácido jasmónico entre otros (Davies, 1987; Salisbury y Ross, 1992).

Los RCV utilizados en la agricultura producen una amplia gama de respuestas fisiológicas, dentro de las que destacan: enraizamiento, promoción de floración, maduración de frutos, inhibición de brotes, estímulo o supresión del crecimiento y defoliación, aplicados sobre todo a cultivos de alto valor comercial. Se han utilizado también para mejorar la calidad de algunos frutos y como herbicidas (Larqué y Reyes, 1988).

Una alternativa para la producción de RCV naturales es el uso de microorganismos. Se ha reportado una gran cantidad de microorganismos habitantes de la microrrizósfera (bacterias, hongos y algunos actinomicetos) que producen este tipo de sustancias como resultado de su metabolismo secundario. Por una parte, se han estudiado bacterias, tanto simbióticas (fijadoras de nitrógeno), como fitopatógenas; y por otra, la formación de metabolitos extracelulares promotores del crecimiento vegetal por hongos simbióticos (principalmente micorrizicos), así como su efecto sobre las plantas hospederas (Slankis, 1974). Además de los hongos simbióticos, existen también algunos hongos fitopatógenos productores de RCV, tal es el caso de *Gibberella fujikuroi*, ampliamente estudiado desde los años 30 (Jones y Pharis, 1987) debido a la detección de ácido giberélico en filtrados de cultivos del hongo. Algunos otros hongos fitopatógenos estudiados por su capacidad de producción de RCV son los del género *Taphrina*, productores de citocininas (Greene, 1980), y recientemente el hongo *Botryodiplodia theobromae* por la producción de ácido jasmónico (Miersch, 1993).

Existe un grupo importante de hongos productores de RCV: los ectomicorrizicos. Este tipo de hongos se encuentra en asociación simbiótica con las raíces de algunas plantas.

principalmente árboles (Harley y Smith, 1983). La infección micorrízica generalmente incrementa la absorción de nutrientes por su hospedero, del cual el hongo obtiene directamente compuestos carbonados. Esta relación, implica también la liberación de metabolitos activos, dentro de los que se encuentran sustancias que tienen efectos de reguladores del crecimiento y hormonales sobre el desarrollo del tejido del hospedero, compuestos que tienen un efecto sobre la liberación de sustancias de las células del hospedero, así como nutrientes o factores de crecimiento (Harley y Smith, 1983).

El efecto de metabolitos extracelulares promotores del crecimiento liberados por hongos micorrízicos sobre las plantas hospederas se ha estudiado a fondo en experimentos *in vitro*, tanto en medio sólido (superficial) como en medio líquido.

En el presente trabajo, se ha realizado un estudio acerca de la fisiología de algunos hongos productores de reguladores de crecimiento vegetal, por una parte se han estudiado tres hongos ectomicorrízicos productores de auxinas: *Suillus granulatus*, *Amanita rubescens* y *Pisolithus tinctorius*; y por otra se ha estudiado una cepa del hongo productor de giberelinas *Gibberella fujikuroi*.

Se ha caracterizado la fisiología de dichos hongos en función a ciertas variables fisicoquímicas que resultan de importancia para su posible uso para la producción de RCV por fermentación en sustrato sólido: temperatura, actividad de agua (A_w), fuente de carbono y presión parcial de CO_2 ($p(\text{CO}_2)$).

Por otra parte, se montaron técnicas para el análisis cuantitativo y cualitativo de RCV (ácido indolacético y ácido giberélico) con el principal objetivo de que estas resultaran rápidas y sencillas de utilizar. Para el análisis cuantitativo del ácido indolacético y ácido giberélico se montó una técnica con el uso de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC); para el análisis cualitativo y semi-cuantitativo se montaron bioensayos, con el uso de microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Schwanniomyces castellii* y *Saccharomyces cerevisiae*) y con el uso de semillas de alfalfa.

REVISION BIBLIOGRAFICA

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

El término de Regulador de Crecimiento Vegetal (RCV) puede emplearse para cualquier sustancia que, en muy pequeñas concentraciones, provoca un efecto fisiológico en las plantas, ya sea inhibición o estímulo de alguna función.

En el presente capítulo, se dará una clasificación de este tipo de compuestos, de acuerdo a su origen, características estructurales y funciones. Se hablará de los efectos fisiológicos que causan sobre las plantas, así como de las diferentes formas por las que pueden obtenerse estos compuestos (natural o sintéticamente). Finalmente se mencionarán los usos y aplicaciones más frecuentes de los RCV. Cabe mencionar que una gran parte de conceptos contenidos en esta sección han sido tomados del libro "Fisiología vegetal" de Salisbury y Ross (1992), ya que son conceptos básicos y dicha cita resulta una recopilación actualizada para este fin.

De acuerdo a su origen, las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal pueden clasificarse en reguladores endógenos o fitohormonas, y en reguladores exógenos, conocidos en general como reguladores de crecimiento vegetal.

Una fitohormona es un compuesto orgánico, producto del metabolismo de plantas superiores, sintetizado en una parte de una planta y trasladado a otra parte de la misma, donde en pequeñas concentraciones este causa una respuesta fisiológica (Audus, 1972; Salisbury y Ross, 1992). Dentro de las fitohormonas se incluye también otra clase de compuestos, como son vitaminas del complejo B (Weaver, 1972).

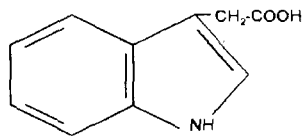
El término de regulador de crecimiento vegetal es empleado particularmente para los compuestos sintetizados ya sea químicamente, o bien producidos por organismos diferentes de las plantas. Estos, al igual que las fitohormonas, usados en concentraciones micromolares, promueven, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas. Su transporte y sitios de acción se llevan a cabo de la misma manera que las fitohormonas. El término RCV, no es necesariamente restringido a compuestos no sintetizados por las plantas, si no que puede también incluir a las fitohormonas (Weaver, 1976; Larqué y Reyes, 1988).

2.1.1 Características estructurales y función reguladora

A. Auxinas

Es un grupo de compuestos que se caracterizan por su capacidad para inducir la elongación de las células de brotes y la diferenciación celular en las plantas. Son compuestos ácidos o derivados de estos, que tienen un grupo carboxilo unido a otro grupo carbonado, generalmente $-CH_2-$, que a su vez está conectado a un anillo aromático. El ácido indolacético (AIA) tiene una estructura químicamente similar al triptofano y probablemente es sintetizado a partir de éste.

El AIA es el compuesto del tipo de las auxinas más conocido, sin embargo las plantas contienen otros tres compuestos estructuralmente similares al AIA (ácido 4-cloroindolacético, ácido fenilacético (APA) y ácido indolbutírico (AIB)) que provocan algunos efectos similares a este. La concentración de AIA en los tejidos vegetales generalmente se encuentra alrededor de 1 a 100 ng/g de peso fresco. A continuación se muestra la estructura que generalmente presentan los compuestos naturales que tienen actividad de auxinas (Weaver, 1972; Linskens y Jackson, 1987):

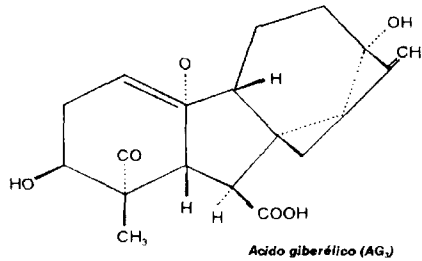


Ácido indolacético (AIA)

En contraste con el movimiento de azúcares, iones y otros solutos, el AIA generalmente no es transportado a través de los tubos del floema o a través del xilema, sino que ocurre principalmente a través de las células del parénquima. El transporte de las auxinas tiene características diferentes a las del transporte del floema: el movimiento es lento (cerca de 1 cm/h), el transporte es polar y requiere de energía metabólica (Davies, 1987; Salisbury y Ross, 1992). Todas las auxinas sintéticas aplicadas a las plantas se transportan de la misma manera en que el AIA lo hace.

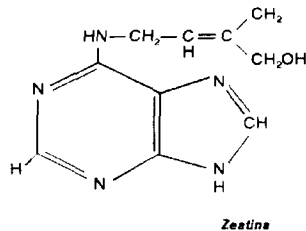
B. Giberelinas

Las giberelinas son compuestos isoprenoides, que tienen un esqueleto de giberelano y que estimulan la división o la elongación celular, o ambas. Específicamente, son diterpenos sintetizados a partir de unidades de acetato de acetil coenzima A (acetil CoA) por la ruta del ácido mevalónico. (Weaver, 1972). Todas las giberelinas son ácidas y contienen 19 o 20 átomos de carbono agrupados en cuatro o cinco sistemas de anillos, tienen un grupo carboxilo unido al carbono 7, y algunas en el carbono 4, así todas son llamadas ácidos giberélicos (AG), pero con un diferente subíndice para distinguirlas entre ellas. En general, las giberelinas que contienen 19 átomos de carbono son más activas que las que contienen 20, la estructura general de las giberelinas es como se muestra a continuación:



C. Citocininas

Son compuestos sustituidos de adenina (con un anillo de purina) que promueven la división celular (citoquinésis) en tejidos vasculares. Se encuentran también como constituyentes de ciertas moléculas de RNA, en muchos tipos de organismos (Greene, 1980). La estructura básica de las citocininas puede ser ácida o bien alcalina (Linskens y Jackson, 1987). Las citocininas más comunes en las plantas son la zeatina y la ribosil zeatina. Las citocininas también se encuentran como ribosidos y ribotidos. La estructura común de las citocininas naturales y sintéticas es la que se muestra a continuación:



La biosíntesis de citocininas es a través de una modificación química de la adenina. Los tejidos vegetales contienen una enzima llamada isopentenil AMP sintetasa, la cual es la primera enzima que interviene en la formación de la isopentenil adenina a partir del AMP, que finalmente puede ser oxidada a zeatina por la sustitución de un hidrógeno por un grupo -OH. Los niveles celulares de citocininas son afectados por su degradación y su conversión a derivados inactivos diferentes a los nucleósidos y nucleótidos (Davies, 1987; Salisbury y Ross, 1992).

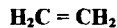
Existen evidencias para sugerir que el transporte es vía el xilema a partir de las puntas de raíces (en donde se sintetizan) hacia todas las partes restantes de la planta.

D. Otros reguladores de crecimiento vegetal

i) Etileno

El gas etileno es sintetizado a partir de la metionina en muchos tejidos vegetales como respuesta al estrés. En investigaciones recientes se ha descubierto que el etileno es derivado a partir de los carbonos 3 y 4 de la metionina. Es un compuesto no esencial para el crecimiento vegetativo normal (Davies, 1987).

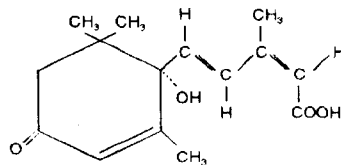
Por ser un gas, el etileno se mueve por difusión desde su sitio de síntesis. Un intermediario crucial en su producción es un compuesto inusual del tipo de los aminoácidos: el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), este puede ser transportado y puede ser el responsable de que el etileno cause efectos a cierta distancia del estímulo causal. La fórmula estructural del etileno es la siguiente:



ii) Acido abscísico (ABA)

Es una hormona que da a los órganos de una planta, la señal de que indica que están sometidos a estrés fisiológico (sequía, suelos salinos, altas temperaturas y frío). Generalmente causa respuestas que ayudan a la planta a protegerse contra estas situaciones. Este también ayuda a que se lleve a cabo normalmente la embriogénesis y a la formación de proteínas de almacenamiento en las semillas, además previene la germinación o crecimiento prematuros en muchas semillas.

El ABA es un sesquiterpenoide de 15 carbonos sintetizado una parte en los cloroplastos y otra en plástidos por la ruta del ácido mevalónico. Las primeras reacciones de la síntesis del ABA son idénticas a las de isoprenoides tales como las giberelinas, esteroides y carotenoides. La biosíntesis del ABA, en la mayoría de las plantas, ocurre indirectamente por la degradación de ciertos carotenoides presentes en plástidos. Se encuentra en todas las plantas vasculares; también está presente en algunos musgos, algunas algas verdes y algunos hongos, pero no en bacterias. La estructura del ABA se muestra a continuación:

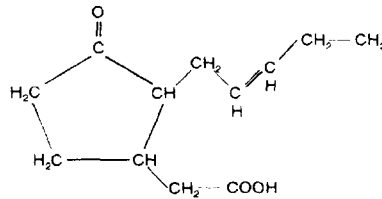


Acido abscísico (ABA)

El transporte del ABA ocurre a través del xilema y el floema y también en las células del parénquima unidas a la superficie vascular. El movimiento de este regulador en las plantas es similar al de las giberelinas (Davies, 1987).

iii) Acido jasmónico

El ácido jasmónico (AJ) y su metilester se han encontrado en diferentes especies de plantas (*Vicia faba*, *Artemisa absinthium*) como inhibidor del crecimiento vegetal y como promotor de la senescencia, y en el aceite esencial de jazmín (*Jasminum grandiflorum*) (Dathe, 1992). Los jasmonatos han sido encontrados en 150 familias y 206 especies (incluyendo hongos, musgos y helechos). Estos compuestos se forman biosintéticamente a partir del ácido linolénico libre, probablemente como resultado de la acción de la enzima lipoxigenasa. Se ha demostrado que los jasmonatos inhiben el crecimiento de ciertas partes de la planta y promueve fuertemente la senescencia de hojas. Su estructura se muestra a continuación:



Acido jasmónico

El AJ fue aislado inicialmente de filtrados del hongo *Botryodiplodya theobromae* y reportado como un inhibidor del crecimiento vegetal (López y col., 1984). Se ha observado que el ácido jasmónico provoca algunos efectos fisiológicos sobre las plantas similares a los del ABA (Ueda y col., 1991).

2.1.2. Efectos fisiológicos

Los reguladores de crecimiento vegetal, tanto hormonas como compuestos no sintetizados por las plantas, provocan una serie de respuestas fisiológicas en diferentes lugares y etapas de desarrollo en una planta. En la Tabla 2.1 se resumen los efectos más comunes producidos por estas sustancias sobre las plantas (Bidwell, 1979; Davies, 1987; Salisbury y Ross, 1992). Es conveniente aclarar que los efectos que se mencionan a continuación, son los que se presentan cuando se utilizan cantidades pequeñas (concentraciones micromolares) de RCV. Sin embargo, si esta concentración se aumenta, el efecto producido será el contrario del mencionado. Muchas sustancias que funcionan como reguladores de crecimiento a bajas concentraciones se pueden emplear como herbicidas en concentraciones mayores (Austin, 1988).

Tabla 2.1. Efectos fisiológicos de algunos RCV

| EFEECTO | Auxinas | Giberelina | Citocinina | Etileno | Acido abscísico |
|---|---------|------------|------------|---------|-----------------|
| Elongación celular | + | + | | - | |
| División celular | + | + | + | | |
| Formación de órganos | + | - | + | | |
| Diferenciación del tejido vascular | + | | | | |
| Iniciación de raíces | + | | + | | |
| Respuestas tropísticas | + | | | | |
| Dominancia apical | + | | | | |
| Senescencia de hojas | - | - | - | + | |
| Abscisión | + | | | + | + |
| Maduración de frutos | - | - | | + | |
| Promueve la floración | + | + | | + | |
| Elongación del tallo | | + | | | |
| Germinación de semillas | | + | | | |
| Producción de enzimas durante la germinación | | + | | | |
| Contrarresta el letargo | | + | + | + | - |
| Movilización de nutrientes en células de almacenamiento en semillas | | + | | | + |
| Desarrollo de yemas laterales | | | + | | - |
| Desarrollo de cloroplastos y síntesis de clorofila | | | + | | |
| Crecimiento y diferenciación de raíces y brotes | | | | + | |
| Cierre de estomas | | | | | + |
| Letargo en semillas y brotes | | - | - | - | + |

* Fuente: Davies, 1987; Salisbury y Ross, 1992. El signo (+), indica un estímulo en la respuesta descrita; el signo (-), indica una respuesta inhibitoria.

A continuación se explican algunos de los efectos fisiológicos indicados en la Tabla 2.1 (Davies, 1987; Weaver, 1972).

- ◆ **División celular:** las auxinas estimulan la división celular en el cambium y, en combinación con citocininas, en cultivo de tejidos.
- ◆ **Diferenciación del tejido vascular:** estímulo en la diferenciación del floema y el xilema.
- ◆ **Respuestas tropísticas:** las auxinas, en general, son mediadoras de las respuestas tropísticas de brotes y raíces a la gravedad y a la luz. El tropismo es el movimiento de una parte o partes de una planta como respuesta a un estímulo.
- ◆ **Dominancia apical:** se refiere al efecto de represión de la formación de brotes laterales.
- ◆ **Senescencia:** o envejecimiento, es la fase del crecimiento celular que se extiende desde la madurez completa hasta la muerte, y se caracteriza por una acumulación de productos metabólicos y una pérdida en el peso seco, especialmente de hojas y frutos. Otro evento propio de la senescencia es el amarillamiento de hojas.

- ♦ **Abscisión:** es la separación de una parte de una planta (hojas, flores, frutos) del resto de la planta.
- ♦ **Letargo:** el crecimiento de una planta se detiene por factores externos (temperatura, suministro de agua) o bien internos.

2.2. PRODUCCION DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Este tipo de compuestos pueden producirse artificialmente, por síntesis química, o bien en la naturaleza, ya sea por plantas o por microorganismos.

Al hablar de reguladores de crecimiento producidos naturalmente, se habla solamente de los compuestos que son producidos de manera natural, ya sea por organismos del reino vegetal, o bien por microorganismos (generalmente del suelo). Sin embargo, en esta sección del capítulo sólo se mencionará la producción por plantas (fitohormonas), ya que se dedica un capítulo completo a la producción de reguladores por microorganismos.

Dentro de los RCV sintéticos se producen principalmente auxinas, citocininas y giberelinas. Las estructuras de estos compuestos están basadas en la estructura que generalmente se presenta en los de origen natural.

A. Auxinas

El ácido indolacético (AIA) ha resultado ser la auxina encontrada más frecuentemente en plantas superiores, por lo que los compuestos sintéticos del tipo de las auxinas, tienen una composición química similar. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los siguientes ácidos: indolbutírico (AIB), α y β -naftalenacético (ANA), fenilacético, antracenacético, indolpirúvico, β -naftoxoacético, fenoxiacético y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 4-clorofenoxiacético, 2-fenoxipro-piónico, entre otros (Zimmerman y Hitchcock, 1942; Weaver, 1972; Salisbury y Ross, 1992). Otro importante grupo son los derivados del ácido benzóico, como el ácido 2,3,6-trimetilbenzóico (Weaver, 1972).

El AIA ha sido identificado como un constituyente endógeno de un gran número de plantas superiores. Las auxinas no se encuentran como moléculas libres, sino que forman complejos. Se sintetizan en el ápice del tallo y en tejidos jóvenes y se mueve principalmente hacia abajo del tallo (Bidwell, 1979).

Las plantas contienen otros tres compuestos que son estructuralmente similares al AIA y provocan muchas respuestas iguales a este, estos pueden como hormonas del tipo de las auxinas: ácido 4-cloroindolacético, ácido fenilacético (APA), y ácido indolbutírico (IBA).

B. Giberelinas

Algunos compuestos que son precursores de las giberelinas y que han mostrado actividad del tipo de éstas son el kaureno, o sus productos de oxidación, kaurenol, kaurenal y ácido kaurenoico (Weaver, 1972). Dichos compuestos pueden ser sintetizados de manera artificial.

Las giberelinas existen en angiospermas, gimnospermas, helechos, y tal vez en musgos, algas y por lo menos en 2 hongos. Son sintetizadas a partir del ácido mevalónico en tejidos jóvenes de brotes y semillas inmaduras. Es incierto si su síntesis ocurre también en las raíces (Davies, 1987), sin embargo se sabe que la mayoría de las células vegetales tienen cierta capacidad de sintetizar giberelinas. En las hojas jóvenes es en donde se detecta la mayor síntesis de estos compuestos. Las semillas inmaduras generalmente son las mejores fuentes de giberelinas naturales (Skene, 1970).

Hasta 1990, se habían descubierto 84 giberelinas en varias plantas y hongos (revisado por Sponsel, 1987; Graebe, 1987; Takahashi y col., 1990, citados por Salisbury y Ross, 1993). De estas 84, 73 se han detectado en plantas superiores, 23 en hongos del género *Gibberella* y 14 en ambos.

C. Citocininas

Se han encontrado compuestos sintéticos derivados de purinas 6-sustituidas, que son más potentes que las citocininas naturales. Algunos de éstos compuestos son: la cinetina (el más potente, no encontrado de manera natural en las plantas) o 6-furfurilamniopurina, 6-bencilaminopurina (BAP), 6-(bencilamino)-9-(2-tetrahidropropanil)-9-purina (PBA) (Weaver, 1972).

Las citocininas más comúnmente detectadas y fisiológicamente más activas en las plantas son, la zeatina, dihidrozeatina y la isopenteniladenina (IPA).

Desde 1964, se han encontrado citocininas con estructuras del tipo de la adenina similares a la zeatina y a la cinetina, en varias partes de semillas. La síntesis de citocininas ocurre principalmente en las puntas de raíces y en semillas desarrolladas, se ha detectado también que existen altos niveles de citocininas en órganos jóvenes (frutos y hojas). Se han encontrado estos compuestos en musgos, algas rojas y cafés, aparentemente en algunas diatomeas y en algunas angiospermas y coníferas.

D. Etileno

En particular, el etileno es sintetizado en tejidos sometidos a senescencia o maduración. Esencialmente todas las partes de las semillas producen este gas como respuesta a una condición de estrés (Davies, 1987; Salisbury y Ross, 1992). Las algas no sintetizan dicho compuesto. Un análogo sintético del etileno es el etepon o ácido 2-cloroetilfosfónico (Weaver, 1972).

2.3. USOS Y APLICACIONES DE LOS RCV

Los RCV utilizados en la agricultura producen una amplia gama de respuestas fisiológicas, dentro de estas destacan las siguientes: mejora de rendimientos y calidad, aumento de producción, enraizamiento, floración, maduración de frutos, abscisión, inhibición de brotes, supresión del crecimiento y defoliación, producción de frutas sin semilla, control de la deterioración de vegetales almacenados; se aplican sobre todo a cultivos de alto valor comercial. Para considerarse útiles estas sustancias deben ser efectivas al aplicarse en muy bajas concentraciones (Austin, 1988; Larqué y Reyes, 1988).

Se han empleado ampliamente como vastaguicidas (regulación del crecimiento en el cultivo de tabaco), para mejorar la calidad de algunos frutos (giberelinas) y como herbicidas al aplicarse en concentraciones mayores. Los RCV con frecuencia son tan efectivos que unos pocos miligramos por metro cuadrado pueden alterar considerablemente las diferentes respuestas del cultivo (Austin, 1988; Larqué y Reyes, 1988).

En la Tabla 2.2 se resumen los principales usos agrícolas de los reguladores de crecimiento vegetal en México (Larqué y Reyes, 1988).

Tabla 2.2. Usos agrícolas de los RCV en México

| USOS Y CULTIVOS | RCV |
|---|---|
| Germinación Gramíneas/hortalizas/papa | Acido giberélico Auxinas y citocininas Culbac*, Citozyme |
| Enraizamiento Ornamentales/frutales | AIB + ANA ^o AIB + Naftilacetamida |
| Transplante Ornamentales | AIB + ANA |
| Reducción del crecimiento vegetativo Algodón Manzana Ornamentales Tabaco Vid | Mepiquat* Daminozide (ácido succínico) Ancimidol* Hidracina maléica* Cloromequat* |
| Estimulante del crecimiento Gramíneas/hortalizas Tubérculos | Acido giberélico Extracto vegetal*, Citozyme Folcisteina* |
| Inducción y promoción de floración Hortalizas Ornamentales Piña Vid | Acido giberélico, Etephon Acido giberélico Etileno, Etephon Etephon |
| Incremento de azúcares Caña de azúcar | Diquat*, Gliofosina* |
| Incremento del flujo de latex Hule | Etephon |
| Prevención de la abscisión Frutales | Acido indolacético + Naptalam* |
| Control de tamaño y forma de frutos Manzana Vid y otros | BAP ^o + Giberelinas G ₄ /G- Acido giberélico |
| Maduración y abscisión de frutos Hortalizas/Vid/varios | Etephon |
| Maduración postcosecha de frutos Plátano | Etileno |
| Dstrucción de la clorofila de frutos Naranja | Etileno |
| Curado de la hojas Tabaco | Etephon |

^o AIB: Acido indolbutírico; ANA: Acido naftalenacético; BAP: Bencilaminopurina

Tabla 2.2. (cont.) Usos agrícolas de los RCV en México

* Los principios activos de estos compuestos son los siguientes: Culbac: productos solubles de la fermentación del ácido láctico (por *Lactobacillus acidophilus*); Citozyme: es un concentrado de algas marinas que contiene auxinas, citocininas y giberelinas; Mepiquat: cloruro de n,n dimetil piperidinium; Ancimidol: ciclopropil-4- metoxi-(pirimidin-5il) bencil alcohol; Hidrazina maléica: 6-hidroxi-3(2)-piridazinona; Cloromequat: cloruro de 2-cloro etiltrimetil- amonio; Extracto vegetal: contiene auxinas y citocininas; Folcisteína: ácido 3- acetil-tiazolidin-4- carboxílico; Etephon: ácido 2-cloroetil fosfónico; Diquat: ión (dibromo 1,1, etileno 2,2 dipiridilio); Glifosina: n,n bis(fosfonometil) glicina; Naptalam: ácido n-1-naftitalámico.

2.4. ANALISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE LOS RCV

Los RCV producidos en las plantas generalmente se encuentran, sobre bases de peso fresco, a niveles de 1 a 100 ng/g para AIA, de 1 a 1000 ng/g para giberelinas, y de 1 a 100 ng/g para citocininas. Lo anterior implica que se requiere de procedimientos de análisis para la detección de cantidades traza, para la correcta identificación y cuantificación de estas sustancias (Brenner, 1981).

Para el análisis cuantitativo y cualitativo de estos compuestos, existen varios métodos, que dependiendo de la técnica usada, se dividen en bioensayos, métodos fisicoquímicos e inmunoensayos.

2.4.1. Bioensayos

Un bioensayo es una prueba realizada sobre organismos vivos con el objeto de detectar moléculas biológicamente activas que provocan algún efecto sobre estos.

Los bioensayos han jugado un papel esencial en el descubrimiento e identificación de los RCV, sin embargo la mayoría de los bioensayos tienen amplias curvas de respuesta, que generalmente cubren diferentes ordenes de magnitud, además de que la varianza asociada a este rango de respuestas es proporcional a la respuesta. Otra desventaja de los bioensayos es que presentan curvas de respuesta a concentraciones log-lineal, lo cual hace imposible determinar pequeñas diferencias en las cantidades de RCV entre muestras (Brenner, 1981). Por otra parte, los bioensayos tienen la gran ventaja de la gran sensibilidad y especificidad de ciertas partes de plantas o bien de mutantes genéticos deficientes en ciertas hormonas.

2.4.1.1. Bioensayos con plantas

Este tipo de bioensayos miden la respuesta de una planta o parte de una planta a una cantidad conocida de un RCV o a extractos de tejido. Se basan en las respuestas fisiológicas manifestadas en alguna parte de una planta, y estas pueden tanto estimular al crecimiento, o bien inhibirlo, dependiendo de la concentración usada.

Los bioensayos tienen la ventaja de la gran sensibilidad y especificidad de ciertas partes de la planta a los diferentes reguladores de crecimiento. Ayudan a establecer la presencia de una clase dada de RCV, sin embargo, no pueden usarse para identificar un compuesto específico. (Brenner, 1981; Salisbury y Ross, 1992).

Las auxinas son capaces de incrementar la tasa de elongación celular en coleoptilos y tallos, además de causar formación de raíces. Las giberelinas promueven la elongación celular, particularmente en células intactas. Las citocininas estimulan la síntesis de proteínas y contrarrestan la senescencia de hojas. Tomando en cuenta estas propiedades de los RCV, algunos bioensayos son realizados con cortes de secciones de coleoptilos puestos en cajas Petri con diferentes concentraciones de los RCV, así se observan las respuestas fisiológicas para cada concentración (Weaver, 1972).

Algunos de los principales métodos de bioensayos para determinar la presencia de auxinas se mencionan a continuación (Audus, 1973).

- ◆ **Prueba de curvatura de coleoptilos (prueba de Avena de Went).** Ha sido la prueba mas usada por los fisiólogos vegetales y continúa teniendo gran importancia hasta la fecha. Se basa en el efecto que provocan las auxinas sobre las respuestas de curvatura a un estímulo direccional (tropismos). La respuesta observada es que al aumentar la concentración de la auxina, aumenta la curvatura del coleoptilo.
- ◆ **Pruebas de crecimiento de segmentos rectos.** Se basa en la medición de la curvatura obtenida por la aplicación unilateral de la auxina, este mide el incremento total en la tasa de crecimiento de pequeños cilindros cortados del coleoptilo.
- ◆ **Pruebas de curvatura con órganos abiertos.** El material usado consiste en porciones de tallos jóvenes de chícharo que han sido crecidos en la oscuridad durante una semana. También se basa en el efecto de curvatura que provocan las auxinas.
- ◆ **Pruebas de crecimiento de raíces.** Este método hace uso del efecto de las auxinas sobre la elongación de las raíces. Concentraciones de auxinas capaces de estimular el crecimiento de coleoptilos, inhiben el crecimiento de raíces, pero a pequeñas concentraciones (1 parte en 10^6) se percibe un ligero estímulo del crecimiento radical. Las especies de semilla pequeña son las mas adecuadas para realizar esta prueba.

A continuación se mencionan algunos de los bioensayos mas usados para la determinación de giberelinas.

- ◆ **Pruebas en semillas.** La aplicación de giberelinas en semillas enteras intactas son mucho mas sensitivas que en órganos aislados. La prueba consiste en aplicar una solución con giberelinas a semillas germinadas, lo cual provoca un incremento en la elongación del hipocotilo. La respuesta observada es generalmente proporcional al logaritmo de la concentración de giberelina.
- ◆ **Prueba de endospermos en cebada.** Uno de los efectos mas reconocidos de las giberelinas es su capacidad para promover y a veces inducir la germinación de semillas. La prueba consiste en cortar transversalmente los granos de cebada y colocarlos en la superficie de la solución que contiene giberelinas. Después de dos días de incubación, la cantidad de azúcares reductores liberados del endospermo hacia la solución resulta proporcional a la concentración de giberelinas en el medio.

- ◆ **Prueba de senescencia de hojas.** A bajas concentraciones, el ácido giberélico retarda la senescencia y posterior pérdida de clorofila en discos aislados de hojas de *Diente de León*. Los discos son colocados en la oscuridad en soluciones que contienen giberelina, al cabo de 4 o 5 días la clorofila del control ha desaparecido. La clorofila es extraída de los discos y cuantificada por espectrofotometría, la concentración del pigmento es proporcional a la concentración de giberelina.

2.4.1.2. Bioensayos con microorganismos

La mayoría de métodos de bioensayos para RCV se basan en la medición de respuestas en el crecimiento de plantas superiores, sin embargo en dicha técnica existen grandes variaciones en los resultados obtenidos. Una gran ventaja que presentan los bioensayos con microorganismos, es que las poblaciones microbianas resultan mas homogéneas (en relación a las poblaciones vegetales), además de su rápido crecimiento, lo cual implica una menor variación en los resultados obtenidos (Barea, 1974).

Greene (1980), cita una serie de autores que han investigado acerca de la respuesta de diferentes microorganismos a la presencia de RCV, sin embargo aún no se han estudiado bien sus efectos sobre el crecimiento microbiano.

La adición de concentraciones apropiadas de cinetina al medio de cultivo estimula el crecimiento de diferentes microorganismos (Maruzzella y Garner, 1963; Farbwerke, 1964; Atmar y col., 1976; citados por Greene, 1980), pero inhibe el crecimiento de *Corynebacterium michiganense* (Maruzzella y Graner, 1963) y tiene un ligero efecto sobre el crecimiento de *Saprolegnia australis* (Elliott, 1967; citado por Greene, 1980). El crecimiento de *Escherichia coli* es estimulado por cinetina, pero aparentemente no por isopentenil adenina. La adición de citocininas al medio de cultivo causa una disminución en la concentración del AMP cíclico en *E. coli* (Coppola, 1976, citado por Greene, 1980). La cinetina promueve la formación de estructuras reproductivas por algunos microorganismos (Jones, 1978) e induce la degradación de celulosa por *Clostridium thermocellum* (Quinn y col., 1963).

Barea y col. (1974), han desarrollado un método para la detección de RCV, basado en la respuesta de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S₁₈). La densidad óptica y el número de células, al cabo de 24 horas, se incrementa linealmente de acuerdo a la concentración de cinetina, ácido giberélico o auxina añadidas al medio. Este procedimiento fue usado para demostrar actividad de citocininas, auxinas y giberelinas.

2.4.2. Métodos fisicoquímicos

Los procedimientos fisicoquímicos de detección, cuando son combinados con técnicas de purificación adecuados, son capaces de detectar un compuesto específico. Anterior al análisis por métodos fisicoquímicos, es necesario hacer una extracción de la molécula de interés por medio de solventes orgánicos. Sin embargo, la selección de un solvente apropiado para la extracción de RCV de tejidos, es uno de los aspectos mas confusos en el análisis de estas sustancias, además de que estos procedimientos a menudo son diseñados para la detección solo de las formas libres de los RCV. En los procesos de extracción debe tomarse en cuenta la alteración que puede ocurrir en la estructura del RCV en estado original durante el proceso.

Esta alteración puede deberse a la hidrólisis, acción enzimática o derivatización química del compuesto original (Brenner, 1981). Para la detección de fracciones biológicamente activas durante los pasos de purificación, es necesario la utilización de los diversos bioensayos específicos para cada tipo de RCV (Reeve y Crozier, 1980).

Son necesarios procesos selectivos para el estudio de RCV, y es importante que estos procesos detecten, inclusive, niveles traza. Se deben combinar procesos de separación selectiva y además métodos de selección. Existen diversos métodos fisicoquímicos para el análisis cuantitativo de los RCV, dentro de los más utilizados se encuentran el HPLC, cromatografía de gases, espectrometría de masas, cromatografía de capa fina, entre otros (Shindy y col., 1975; Crozier y col., 1980; Brenner, 1981; Linskens y Jackson, 1987;). A continuación se detallan algunas técnicas para la extracción y detección de reguladores de crecimiento, las cuales resultan sensitivas con menos de 100 ng del compuesto a probar (Brenner, 1981; Horgan, 1987; Weaver, 1972).

2.4.2.1. Extracción de RCV

A. Auxinas

El AIA es un ácido orgánico con un pK_a de 4.8, es un compuesto muy lábil, que fácilmente sufre oxidación no enzimática en presencia de luz, oxígeno y peróxidos. Generalmente la descomposición de este ácido ocurre durante los procesos de extracción y purificación anteriores al análisis (Ernstsen y col., 1986).

El metanol y, en algunos casos, el etanol son los compuestos más comúnmente usados para la extracción de los indoles, sin embargo esto implica la posible esterificación parcial de los ácidos carboxílicos a sus respectivos metil y etil ésteres. La acetona, el dietileter, el cloroformo y el acetato de etilo también han sido usados para la extracción de indoles de tejidos vegetales (Brenner, 1981; Linskens y Jackson, 1987).

Crozier y col. (1980) llevaron a cabo la extracción de AIA a partir de callos de *Pseudotsuga menziesii* con metanol, a continuación los extractos metanólicos fueron reducidos a la fase acuosa y finalmente se añadió una solución amortiguadora de fosfatos a pH 8.

Hemberg y Tillberg (1980) experimentaron diferentes métodos de extracción para el AIA, usando como solventes metanol al 100, 90 y 80 %, dietileter recién destilado, acetona al 100 y 90 % y diclorometano. También se variaron las temperaturas (-24, 4 y 30° C) y el tiempo (3 a 24 horas) de la extracción. El mayor rendimiento de AIA se obtuvo al usar metanol como agente de extracción y rendimientos significativamente menores se obtuvieron con dietileter y diclorometano. La duración del periodo de extracción aumentó el rendimiento en todos los casos. El aumento en la temperatura también resultó un factor favorable para el aumento del rendimiento de AIA.

Ek y col. (1983), llevaron a cabo la extracción de AIA a partir del micelio de hongos ectomicorrízicos con metanol al 80 %, el micelio homogeneizado en metanol fue dejado a 5° C durante 20 horas. El metanol fue evaporado y a la fase acuosa residual se le agregó una solución amortiguadora a pH 8, a continuación el pH fue ajustado a 2.7 y la solución extraída con acetato de etilo.

Rouillon y col. (1986) realizaron la extracción de indóles de la siguiente manera: el filtrado que contenía los indóles se concentró, se le ajustó el pH a 3, después se hizo una extracción con acetato de etilo (se desechó la fase acuosa), una evaporación a sequedad y se solubilizó nuevamente con acetato de etilo.

B. Giberelinas

Para el aislamiento de las giberelinas se han reportado diversos procedimientos, cada uno de estos con sus propias características para hacerlo el más apropiado para la extracción y separación de las diferentes giberelinas (Barendse, 1987).

En general, el material vegetal ha sido extraído por homogeneización en metanol, o menos frecuentemente en una solución acuosa de acetona al 80 %, seguida por filtración tres o cuatro veces. Linskens y Jackson (1987) reportan como un procedimiento general, el fraccionamiento con solventes, utilizando en los extractos metanol o acetona, seguido de una evaporación, ajuste de pH (2.5-3), extracción con benceno, extracción con acetato de etilo, extracción con NaHCO_3 en solución acuosa, extracción con *n*-butanol, secado y concentración y finalmente el ajuste del pH a 6.5.

Por otra parte Kurogochi y col. (1979) reportan como procedimiento general para la extracción de giberelinas de tejidos de plantas de arroz el siguiente: homogeneización de los tejidos en metanol, evaporación del extracto metanólico, ajuste del pH (7) del residuo acuoso, partición con acetato de etilo, ajuste del pH (2.5) de la solución acuosa y finalmente una segunda partición con acetato de etilo para obtener una fracción ácida.

El etanol, agua y soluciones diluidas de NaOH han sido usados comúnmente como solventes para el AG_3 . du Preez y Kilian (1993) han probado la estabilidad del ácido giberélico en diferentes solventes, ellos encontraron que una solución de NaOH 0.1 M resulta muy eficiente en la extracción de este RCV, sin embargo no recomiendan su uso debido a que encontraron que el AG_3 es transformado a su correspondiente ácido dicarboxílico en solución alcalina.

De acuerdo con Barrios (1994), el ácido giberélico puede ser extraído de una solución ácida con el uso de solventes no polares como el hexano o el acetato de etilo, y de una solución alcalina con agua o metanol.

Todas las giberelinas libres son inestables en ácido. Sin embargo, las giberelinas con doble enlace entre los carbonos 1 y 2 y las que contienen un grupo 3β -hidroxilo (como AG_3) son inestables bajo condiciones ácidas. Estas últimas son estables a pH entre 8 y 8.5 por relativamente cortos periodos de tiempo (Linskens y Jackson, 1987).

C. Citocininas

Ng y col. (1982) reportan la extracción de citocininas con la adición de etanol al 70 % a un extracto que contenía estos compuestos.

Para prevenir cualquier degradación enzimática de las citocininas, el material del cual se extraerán, debe ser inmediatamente congelado o bien el proceso de extracción debe hacerse al instante de su recolección.

El paso inicial en la extracción de citocininas, es la homogeneización del material vegetal con un solvente miscible en agua, tales como etanol o metanol, y a continuación es sujeto a una partición con solventes. Algunos solventes de extracción que han sido usados son los siguientes: etanol al 95 %; etilacetato frío, seguido de etanol y butanol; metanol al 80 %, entre otros (Linskens y Jackson, 1987). También se ha reportado la extracción de estos compuestos con el uso de agua o una solución amortiguadora (Brenner, 1981).

2.4.2.2. Cuantificación de RCV

A. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Recientes estudios en la técnica de análisis por HPLC han mostrado que esta técnica actualmente resulta muy adecuada para el análisis de fitohormonas en general, y para giberelinas en particular. La gran disponibilidad de arreglos de soportes con diferentes selectividades y columnas con altas eficiencias que permiten rápidas velocidades de análisis a temperatura ambiente, contribuyen a la completa efectividad de esta técnica de cromatografía líquida para el análisis de RCV. El HPLC puede usarse con instrumentos tanto preparativos como analíticos que pueden emplearse en combinación. Además de lo anterior, existen ya una gran cantidad de detectores altamente sensitivos los cuales, particularmente usados en combinación, aumentan en gran medida la sensibilidad y la selectividad de la técnica (Linskens y Jackson, 1987).

El material de empaque de columnas de HPLC mas popular hasta la fecha ha sido el *octadecil silano* (ODS o C₁₈), el cual consiste de una cadena de octadecil carbono unida a micropartículas de sílica. Se han utilizado columnas preparativas C₁₈ para recuperar fracciones que contienen ABA, auxinas, citocininas y giberelinas provenientes de extractos vegetales (Brenner, 1981).

i) Detección por radiación UV

Es uno de los detectores más usados para HPLC. Este método puede considerarse solo parcialmente selectivo para RCV, ya que solo se detectan moléculas que absorben luz UV a ciertas longitudes de onda. Cantidades tan pequeñas como 4 ng de citocininas pueden detectarse a 254 nm; el límite reportado para AIA a 280 nm es de 5 a 20 ng. Las giberelinas absorben radiación UV solo abajo de 220 nm (Brenner, 1981).

Rouillon y col. (1986), utilizaron para el análisis de compuestos indólicos, una columna Microbondapak C₁₈, con el siguiente sistema de solventes: 10 % de etanol, 89.99 % de agua y 0.01 % de ácido acético (CH₃COOH). Los compuestos indólicos fueron detectados a 280 nm.

Thibert (1994) recomienda el uso de una columna *Spherisorb ODS con una fase móvil* de una solución amortiguadora de fosfatos (pH 4.6)/metanol (75:25 v/v), con el uso de un detector UV a 210 nm, para el análisis del ácido giberélico.

ii) Detección por fluorescencia

Ofrece mayor sensibilidad y selectividad que la detección por radiación UV, se utiliza especialmente con indóles. La fluorescencia natural del AIA permite la detección de otros compuestos no derivados, lo cual evita el problema de posibles interferencias en el análisis. La detección de AIA tiene un límite de 10 a 20 pg. El uso de ésteres de metoxicumaril de ciertos estándares de giberelina, facilitan su detección para límites inferiores a 5 pg.

Un método fluorimétrico que resulta muy sensitivo para la determinación de la presencia de AIA en soluciones, se basa en la ocurrencia de fluorescencia cuando H_2SO_4 y $CuSO_4$ se añaden a la solución. La cantidad de fluorescencia obtenida bajo luz ultravioleta, puede medirse fotoeléctricamente con un fluorímetro. La fluorescencia es verde a bajas concentraciones y amarilla a altas.

Cuando los cromatogramas se preparan con un reactivo de ácido perclórico, existe una relación lineal entre el área manchada y el logaritmo de la cantidad de AIA de 0.25 y 8 μg . Para AIB y AIP, la relación va desde 2.0 a 20 μg (Weaver, 1972).

Ernstsen y col. (1986) reportan el uso de una columna Nucleosil C-18 $5\mu m$ (Sandberg y col., 1981) con un detector espectrofluorimétrico (excitación a 280 nm, emisión a 350 nm), y una fase móvil de fosfato de sodio 0.05 M (pH 6.5) con sulfato de tetrabutilamonio 0.02 M en metanol (65:35, v/v), para la detección de compuestos indólicos.

Crozier y col. (1980) utilizaron una columna Hypersil-ODS utilizando HPLC en fase reversa eluyendo con un gradiente creciente de etanol en una solución amortiguadora de acetato de amonio (20 mM, pH 3.5), para el análisis de AIA. Las muestras eluidas fueron registradas con un detector espectrofluorimétrico.

iii) Detectores electroquímicos

Cuando estos aparatos son operados en el modo oxidativo, resultan sensitivos y selectivos para AIA y otras auxinas indólicas. Puede detectarse también zeatina, pero no su ribósido.

B. Cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM)

El espectrómetro requiere de muestras altamente purificadas. Para la detección por EM-CG, todos los RCV, excepto el etileno, deben ser derivatizados para hacerlos volátiles. Hasta recientemente, todas las muestras de RCV se han ionizado bombardeándolas con electrones de alta energía, y de esta manera se ha logrado analizar una gran cantidad de RCV: derivados del ABA y compuestos relacionados; AIA, derivados y conjugados de AIA; citocininas y derivados de estas; y giberelinas, derivados y conjugados de giberelinas. El uso de EM-CG, es especialmente importante en el estudio de las giberelinas, ya que causan pocas respuestas únicas (Brenner, 1981).

Una ventaja de este método es que las muestras no necesitan ser purificadas antes del análisis, siempre y cuando estas no contengan sustancias que puedan interferir con el análisis (Ek y col., 1983).

i) Detectores de ionización de flama

Detectan cualquier compuesto que se ioniza tras la combustión en una flama de hidrógeno. Este tipo de detector, es esencialmente no selectivo y son capaces de detectar cantidades tan pequeñas como 1.0 ng de un compuesto.

ii) Detectores de captura de electrones

Responde solo a compuestos electronegativos (halogenados y ciertos compuestos aromáticos hidrocarbonados). Es un detector altamente selectivo y considerablemente sensitivo. Se ha empleado principalmente para la detección de ácido abscisico.

iii) Detectores de ionización de flama básico

Puede utilizarse para detectar selectivamente, moléculas que, contienen fósforo o nitrógeno. Se ha utilizado para detectar metil ésteres de AIA y citocininas permetiladas. Se han reportado límites de detección en el rango de 5 pg para ambos tipos de compuestos, sin embargo, muestra sensibilidad solo para 1 ng por inyección.

iv) Espectrometría de masa

El espectrómetro de masa (EM) resulta ser un detector muy selectivo, este puede acoplarse a un cromatógrafo de gases (CG), lo cual permite la combinación del poder de separación del cromatógrafo con la calidad de detección selectiva del espectrómetro.

Ek y col. (1983), utilizaron esta técnica para el análisis de AIA. Los extractos que contenían el AIA fueron disueltos en piridina y *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) con el objeto de "sililar" el ácido. Después de esta reacción el AIA fue cuantificado con el uso de una columna de vidrio *OV 101*. La espectrometría de masas fue operada en el modo de detección de iones múltiple. El espectro de masas fue corrido con 70 eV.

C. Cromatografía de capa fina

Hasta recientemente, en la mayoría de los procedimientos de análisis para RCV se ha incorporado al menos un paso que incluya la cromatografía en capa fina. Sin embargo, una desventaja de esta técnica es la pérdida substancial de las citocininas polares y giberelinas por el uso de láminas de sílica. También se ha reportado que láminas de cubierta de sílica causan un decremento en la recuperación de AIA comparado con las láminas con cubierta de celulosa (Brenner, 1981).

Rouillon y col. (1986), utilizaron esta técnica para el análisis de compuestos indólicos. Los extractos concentrados contenidos en la fase con etil acetato (posterior a la extracción) fueron aplicados a láminas de sílica gel *G60* sin indicador de fluorescencia, y fueron corridas en una mezcla de acetato de metilo/isopropanol/hidróxido de amonio 25 % (45:35:20 por volumen). El desarrollo de los cromatogramas ascendentes se pararon a los 15 cm del punto inicial; los cromatogramas fueron asperjados con el reactivo de Salkowski o Van Urk.

Por otra parte, Kurigochi y col. (1979), reportan el uso de láminas de sílica gel GF₂₅₄ y PF₂₅₄ con el sistema de solventes: acetato de etilo/cloroformo/ácido acético (20:8:1, v/v), para el análisis de giberelinas de extractos de plantas de arroz.

2.4.3. Ensayos inmunológicos

Además de los bioensayos y métodos fisicoquímicos, existe un tercer método para la cuantificación de RCV, los inmunoensayos, los cuales implican un método de detección extremadamente sensitivo y de alta selectividad. El procedimiento requiere de la formación de un anticuerpo antihormona (o bien anti-RCV), hecho por células animales, el cual se hace reaccionar con el regulador de interés en el ensayo. Son más rápidos y sensitivos que cualquier bioensayo, pero están comúnmente sujetos a interferencias positivas o negativas por parte de los compuestos presentes en muestras relativamente crudas en la reacción antígeno-anticuerpo. Una de las desventajas que presenta esta técnica, es la preparación o adquisición en el mercado del anticuerpo, lo cual generalmente no resulta fácil.

Los radioinmunoensayos, una técnica desarrollada por Berson y Yalow (1959), ha resultado ser una técnica muy específica y extremadamente sensible para el análisis de metabolitos vegetales secundarios o fitohormonas. Se han elaborado inmunoensayos sensitivos y específicos para la detección de ABA, AIA, citocininas y giberelinas. Los mas sensitivos de estos ensayos, son igual o, en la mayoría de los casos, mucho mas sensibles que los métodos fisicoquímicos mas avanzados (Weiler, 1982).

La mayor ventaja de los inmunoensayos sobre otras técnicas es su potencial para analizar muestras impuras. Normalmente muestras de 100 a 500 mg de tejido fresco, son suficiente para el análisis de los RCV.

Las curvas de respuesta de los inmunoensayos son lineales en un rango de aproximadamente un orden de magnitud (Salisbury y Ross, 1992).

2.5. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE RCV

En el presente capítulo se hablará de microorganismos que habitan la rizósfera, algunos fitopatógenos y otros simbióticos, y que tienen la propiedad de producir RCV. Por una parte se hará referencia a bacterias y actinomicetos, muchos fitopatógenos y otros simbióticos, capaces de producir estos compuestos; y por otra parte de las micorrizas, específicamente de los hongos ectomicorrízicos, debido a que se ha reportado una gran cantidad de géneros de dichos hongos como productores de RCV.

2.5.1. Bacterias y actinomicetos

Existe un gran número de bacterias y algunos actinomicetos, que por lo general habitan la micorrizósfera, que son capaces de producir reguladores de crecimiento vegetal.

A. Auxinas

Se ha reportado que varias especies de *Rhizobium* (bacteria fijadora de nitrógeno en leguminosas), pueden convertir el triptofano a AIA y compuestos relacionados (revisado por Greene, 1980). *Rhizobium spp.* tienen la capacidad de estimular la división celular en la corteza debido a la liberación de auxinas y citocininas en la superficie de la raíz o en el lugar infectado.

Pseudomonas savastanoi, bacteria que provoca la enfermedad llamada nudo de olivo en plantas leñosas de la familia *Oleaceae*, produce auxinas y citocininas en cultivo puro. Cuando el medio contiene L-triptofano, la bacteria produce indol-acetamida (probablemente un intermediario en la formación de AIA) y ácido indolacético (AIA) (revisado por Greene, 1980).

Salmeron y col. (1990), reportan la producción de auxinas, citocininas y giberelinas por una cepa de *Azotobacter chroococcum* (bacteria fijadora de nitrógeno) aislada de raíz de *Zea mays* (maíz). La producción de estos compuestos estuvo correlacionada con la cantidad de fosfato solubilizado, este afecta positivamente la producción de auxinas citocininas y giberelinas. La fuente de fosfato soluble usada fue K_2HPO_4 .

Se han estudiado varias especies de *Arthrobacter* y *Streptomyces*, y dos cepas de *Bacillus circulans* aisladas de la micorrizósfera de pino (*Pinus silvestris L.*). De estos, solo dos especies de *Arthrobacter* produjeron pequeñas cantidades de auxinas en un medio sin triptofano. En presencia de triptofano todos los microorganismos estudiados produjeron auxinas. Las mayores cantidades de auxinas fueron producidas por dos especies de *Arthrobacter* (0.238 y 0.290 mg de AIA/ml de medio) (Strzelczyk y Pokojska, 1989).

B. Giberelinas

Se han identificado giberelinas A_1 , A_2 e iso- A_3 , en un cultivo aséptico de *Azospirillum lipoferum*, cepa op 33 (sobreproductora de auxinas). El microorganismo fue cultivado en medio líquido durante 48 h a 32° C, pH 6.5 - 6.8, con aireación (Bottini y col., 1988).

Atzorn, y col. (1988) reportan la producción de giberelinas en cultivos de cepas silvestres y mutantes de *Rhizobium phaseoli*. Todas las cepas estudiadas excretaban ácido indolacético (AIA), pero no es claro que exista relación entre las cantidades de AG y AIA acumuladas. Los cultivos se mantuvieron en agar inclinado con levadura y manitol, a 25° C.

C. Citocininas

Phillips y Torrey (1972), estudiaron la producción de un compuesto del tipo de la zeatina en filtrados de cultivos de *Rhizobium leguminosarium* y *Bradyrhizobium japonicum*.

Se ha detectado actividad de citocininas en el filtrado de un cultivo de *B. japonicum*, equivalente a aproximadamente 1 µg de cinetina por litro. La actividad observada correspondía a zeatina, ribosilzeatina y metiltiozeatina. El medio de cultivo utilizado contenía como fuente de carbono manitol (10 g/l) y vitaminas. El pH del medio fue de 6.8, y se incubó a 27° C en agitación continua (Sturtevant y Taller, 1988).

Thimann y Sachs (1966), demostraron por primera vez la producción de citocininas en un medio definido por *Corynebacterium fascians*, bacteria que provoca una enfermedad en plantas superiores, conocida como "fasciación". Se han identificado siete citocininas (isopentenil adenosina, isopentenil adenina, ribosil-zeatina, cis trans-zeatina, metiltio-cis-zeatina) en cultivos de *C. fascians*. Las citocininas predominantes en cultivos de *C. fascians*, en términos de actividad biológica, son la isopentenil adenina y la zeatina (revisado por Greene, 1980). De acuerdo a resultados obtenidos por Murai (1980; Greene, 1980), se puede decir que un plásmido de alto peso molecular puede relacionarse con la patogenicidad del microorganismo y con la producción de altos niveles de citocininas. Los síntomas de la enfermedad (fasciación), se asocian con el incremento de los niveles de citocininas y quizás disminución de los niveles de auxinas en tejidos enfermos.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que produce formación de tumores en plantas dicotiledóneas, y se ha reportado que ésta produce, por sí misma, auxinas y citocininas. La producción de citocininas por *A. tumefaciens* fue reportada por primera vez por Klämbt (1967), y confirmada por Upper y col. (1970, citados por Greene, 1980); dicho compuesto fue identificado como isopentenil adenina. Mas tarde se identificaron siete citocininas, de las cuales, las especies predominantes fueron isopentenil adenina, trans-zeatina y metil- tioisopentenil adenosina. Se sugiere que los ribósidos en el medio de cultivo podrían ser productos del catabolismo del RNA_i (revisado por Greene, 1980).

Varios autores han reportado la producción de citocininas por bacterias de la rizósfera. Además de bacterias, también se ha detectado la producción de estos compuestos por el actinomiceto *Streptomyces flaveolus* (Greene, 1980).

Akiyoshi y col. (1987) publicaron que se han identificado en los géneros *Agrobacterium* y *Pseudomonas*, cepas productoras de transzeatina. Cepas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* produjeron trans-zeatina en cultivo en cantidades de 0.5 a 44 µg/l. *P. solanacearum* y *P. syringae* pv. *savastanoi*, produjeron trans-zeatina a niveles arriba de 1 mg/l.

2.5.2. Hongos

2.5.2.1. Hongos filamentosos

Ulrich (1960), reporta que desde 1928, Nielsen demostró actividad de auxinas en extractos de cultivos del hongo *Rhizopus suinus*. Más tarde, el mismo detectó la producción de AIA por el hongo filamentoso *Coprinus comatus*.

En los años 30, Yabuta y Hayashi aislaron un compuesto activo del hongo *Gibberella fujikuroi*, ascomiceto que provoca enfermedades en el arroz, al cual llamaron giberelina. En 1954, Curtis y Cross detectaron la presencia de ácido giberélico (AG₃) en un filtrado de un cultivo de *Gibberella fujikuroi*. Hasta 1990, se habían encontrado 25 giberelinas en hongos del género *Gibberella* (revisado por Salisbury y Ross, 1992)

Hasta la fecha se ha detectado la producción de giberelinas por tres hongos filamentosos: *G. fujikuroi*, *Fusarium moniliforme* (la forma imperfecta de *G. fujikuroi*) y recientemente por *Neurospora crassa* (Brückner y Blechschmidt, 1986).

Varios autores (Vass y Jefferys, 1979; Jones y Pharis, 1987) han reportado que la producción significativa de giberelinas por *G. fujikuroi*, empieza en el momento que la fuente de nitrógeno se agota en el medio.

Jones y Pharis (1987) investigaron la producción de giberelinas por células libres e inmovilizadas de *Gibberella fujikuroi*. La cantidad de giberelinas producidas resultó mayor con células libres que con inmovilizadas. Por otra parte, Kumar y Lonsane (1987, 1988) han estudiado la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* en fermentación sólida, con la utilización de almidón de maíz como fuente de carbono. Con los resultados obtenidos, lograron determinar que por la técnica de cultivo en fed-batch, es posible aumentar el rendimiento de ácido giberélico en un 18.2 %, comparándola con el cultivo en batch.

El género *Taphrina* es un ascomiceto que causa malformaciones en los tejidos de plantas superiores, varios autores han encontrado producción de citocininas por diferentes especies de este género. Desde 1961 se han encontrado evidencias acerca de la producción de citocininas por *Taphrina deformans*, uno de los compuestos detectados fue la cinetina (Greene, 1980).

También se ha encontrado actividad de citocininas en filtrados de cultivos de *T. cerasi* (Barthe y Bulard, 1974; Johnston y Trione, 1974; citados por Greene, 1980), uno de los compuestos activos presentes fue la zeatina. Kern y Naef-Roth (1975) confirmaron la presencia de citocininas activas en filtrados de cultivos de *T. deformans* y *T. cerasi*, y también detectaron actividad en filtrados de *T. amentorum* y *T. betulina* (Greene, 1980).

Norberg (1968, citado por Greene, 1980) investigó la producción de reguladores de crecimiento por varias especies de *Exobasidium*, un basidiomiceto que infecta plantas de la familia *Ericaceae*. Se han detectado citocininas activas en extractos de filtrados de cultivo de *E. myrtilli* y *E. uvae-ursi*, cuando estas especies se crecieron en medio con nitrógeno inorgánico.

También se ha detectado actividad de citocinina en filtrados de los hongos fitopatógenos *Monilia fructicola*, *M. fructigena* y *M. laxa* (los cuales causan podredumbre en algunos frutos), además de una especie de *Cytospora* (Greene, 1980).

Por otra parte, Husain y col. (1993) recientemente han encontrado que la enfermedad “die-back” (en la que se observa una disminución en la calidad y producción de las flores), padecida por rosas ornamentales sometidas a condiciones de estrés por agua, es causada por el hongo *Botryodiplodia theobromae*, el cual ha sido reportado por varios autores como productor de ácido jasmónico (AJ), que en altas concentraciones resulta ser tóxico.

En sistemas fúngicos, solamente se han encontrado dos especies capaces de producir jasmonatos (ácido jasmónico, entre otros): *B. theobromae* y *G. fujikuroi*. Filtrados de cultivos de *B. theobromae* contienen (+)-7-iso-ácido jasmónico y varios hidroxilados del ácido jasmónico. En *G. fujikuroi* se han identificado compuestos conjugados de AJ y 9,10-dihidro-AJ, pero no sus ácidos libres (Miersch y col., 1993).

2.5.2.2. Hongos micorrízicos

Esta parte de la revisión bibliográfica se enfocará a los hongos formadores de micorrizas, y particularmente a los hongos ectomicorrízicos, ya que han sido reportados desde hace años atrás como hongos que tienen la capacidad de producir RCV así como otros metabolitos secundarios (como antibióticos).

Una micorriza consiste en la asociación simbiótica entre la hifa de cierto tipo de hongos (llamados micorrízicos) y las raíces de plantas superiores. La infección micorrizica, generalmente incrementa la eficiencia de absorción de nutrientes por su hospedero, del cual el hongo obtiene directamente compuestos carbonados. En las micorrizas, siempre hay alguna penetración de tejidos, o bien una estructura reconocible conformando alguno de los patrones comunes (Harley y Smith, 1983).

A. Clasificación de las micorrizas

Existen principalmente 3 clases de micorrizas: 1) Endomicorrizas o micorriza vesicular-arbuscular, en las que el micelio del hongo permanece incluido entre y dentro del tejido de la raíz, pertenecen a la clase *Zygomycetes* y a la subdivisión *Endogonaceae*. 2) Ectomicorrizas, en la cual, las hifas del hongo forman una extensa cubierta o manto alrededor del exterior de la raíz con solo una pequeña penetración de las hifas hacia el tejido cortical. La cubierta fúngica, en las ectomicorrizas, tiene un grosor entre 20 y 100 μm , la mayoría en el rango de 30 a 40 μm y comprende de un 25 a 40 % del peso seco del hongo (Harley, 1952 y Melin, 1958; citados por Harley y Smith, 1983). 3) Ectendomicorriza, presenta características tanto de las endo- micorrizas como de las ectomicorrizas, la cubierta formada puede ser muy reducida o ausente, las hifas también penetran en las células del hospedero. Los mismos hongos que forman ectomicorrizas pueden, sobre diferentes especies de plantas o en condiciones diferentes, formar ectendomicorrizas (Harley y Smith, 1983; Brock, y col., 1984; Marx y Krupa, 1978).

En las ectomicorrizas, el hongo (septado o aseptado) forma una estructura llamada manto o cubierta que encierra a las raíces. La principal característica de las ectomicorrizas, es

que se encuentran formando una red fúngica intracelular en la corteza de la raíz (red de Hartig). Esta estructura no penetra, o lo hace muy ligeramente, al interior de las células. En ocasiones, o como una etapa del desarrollo, la red de Hartig puede estar total o parcialmente ausente.

B. Hábitat natural de las ectomicorrizas

Ya se ha mencionado que las ectomicorrizas son asociaciones de cierto tipo de hongos con plantas, existen ciertos árboles que se encuentran formando ectomicorrizas con hongos específicos.

Los hongos ectomicorrízicos se encuentran en asociación, particularmente, con plantas leñosas en regiones templadas e incluyen especies que tienen importancia desde un punto de vista agrícola. En particular, las asociaciones ectomicorrízicas predominan en diferentes familias de árboles de importancia económica (Harvey, 1991).

Algunos árboles tropicales y subtropicales pueden ser ectomicorrízicos durante algunos periodos del año por razones del medio ambiente. Una buena parte de fanerógamas forman ectomicorrizas. El género *Eucalyptus* es un componente importante de bosques y matorrales en Australasia tropical y templada. La familia *Dipterocarpaceae*, son árboles dominantes de regiones de monzón y húmedo-tropicales (Harley y Smith, 1983).

Se han encontrado gran cantidad de ectomicorrizas en bosques de pinos templados sub-húmedos, en altitudes de 1000 a 4000 metros de altura sobre el nivel del mar. También se han encontrado en bosques de encino templados húmedos a alturas de 1000 a 2500 metros (Guzmán, 1979).

C. Hongos que forman ectomicorrizas

Los hongos formadores de ectomicorrizas incluyen miembros de muchas familias de *Basidiomicetos*, algunos *Ascomicetos* con cuerpo fructífero, y *Fungi imperfecti* (como *Cenococcum*), así como otros hongos *Basidiomicetos* y *Ascomicetos* desconocidos.

Muchos de estos hongos que se encuentran formando ectomicorrizas se han identificado observando que existen asociaciones consistentes de los cuerpos fructíferos con una especie particular de árbol, y a menudo la hifa del hongo se encuentra unida tanto al cuerpo fructífero como a una raíz micorrízica.

En la Tabla 2.3, se enlistan algunos géneros de hongos de importancia, de los cuales, una o más especies se han reportado como ectomicorrízicos (Harley y Smith, 1983).

Tabla 2.3. Familias y géneros de hongos formadores de ectomicorrizas

| Familia | Género | Familia | Género |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| <i>Basidiomycetes</i> | | <i>Gasteromycetes</i> | |
| <i>Agaricaceae</i> | <i>Lepiota</i> | <i>Hymenogastraceae</i> | <i>Rhizopogon</i> |
| <i>Amanitaceae</i> | <i>Amanita</i> | <i>Geastraceae</i> | <i>Geastrum</i> |
| <i>Boletaceae</i> | <i>Boletus</i> | <i>Lycoperdaceae</i> | <i>Calvatia</i> |
| | <i>Suillus</i> | <i>Phallaceae</i> | <i>Phallus</i> |
| <i>Cortinaceae</i> | <i>Cortinarius</i> | <i>Pisolithaceae</i> | <i>Pisolithus</i> |
| | <i>Hebeloma</i> | <i>Sclerodermataceae</i> | <i>Scleroderma</i> |

Tabla 2.3. (cont.) Familias y géneros de hongos formadores de ectomicorrizas

| Familia | Género | Familia | Género |
|--------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|
| Basidiomycetes | | Ascomycetes | |
| <i>Gomphideaceae</i> | <i>Gomphidius</i> | <i>Balsamiaceae</i> | <i>Balsamia</i> |
| <i>Hygrophoraceae</i> | <i>Hygrophorus</i> | <i>Elaphomycetaceae</i> | <i>Elaphomyces</i> |
| <i>Paxillaceae</i> | <i>Paxillus</i> | <i>Geneaceae</i> | <i>Genea</i> |
| <i>Rhodophyllaceae</i> | <i>Rhodophyllus</i> | <i>Geoglossaceae</i> | <i>Cudonia</i> |
| <i>Russulaceae</i> | <i>Lactarius</i> | <i>Helvellaceae</i> | <i>Helvella</i> |
| <i>Stobilomycetaceae</i> | <i>Boletellus</i> | <i>Hydnotryaceae</i> | <i>Bassia</i> |
| | <i>Strobilomyces</i> | | <i>Choiromyces</i> |
| <i>Tricholomataceae</i> | <i>Laccaria</i> | <i>Otidaceae</i> | <i>Otidia</i> |
| <i>Cantharellaceae</i> | <i>Cantharellus</i> | <i>Pyronemaceae</i> | <i>Geopora</i> |
| <i>Hydnaceae</i> | <i>Hydnum</i> | | <i>Sepultaria</i> |
| <i>Telephoraceae</i> | <i>Telephora</i> | | |
| | | Phycomycetes | |
| | | <i>Endogonaceae</i> | <i>Endogone</i> |
| | | Imperfecti | |
| | | | <i>Cenococcum</i> |

Fuente: Harley y Smith, 1983

Bajo condiciones normales de suelo en los bosques un árbol o una especie de árboles o bien un segmento de una raíz lateral, tendrán varias especies de hongos involucrados en la formación de ectomicorrizas. Así como una especie de árbol puede mantener relación con varias especies de hongos ectomicorrízicos, una especie de hongo puede entrar en asociación con numerosas especies de árboles. Sin embargo, algunos hongos aparentemente resultan ser muy específicos para un hospedador en especial, mientras que otros se encuentran formando ectomicorrizas con géneros de árboles de diversas familias (Meyer, 1974; citado por Marx y Krupa, 1978).

D. Requerimientos nutricionales y ambientales para el crecimiento

Existe una estrecha relación entre los hongos ectomicorrízicos y los tejidos de las raíces de árboles. Esta relación implica la liberación de metabolitos activos en las etapas de acercamiento e infección, así como en las etapas de maduración tardía de la formación de micorrizas, cuando se intercambian compuestos entre los dos simbioses. Por estas razones ha existido interés para realizar trabajos experimentales sobre la liberación de productos metabólicos al medio de cultivo, para tratar de interpretar la actividad de los simbioses en condiciones naturales. Este tipo de compuestos son importantes porque dentro de ellos, se encuentran sustancias que tienen efectos de reguladores del crecimiento y hormonales sobre el desarrollo del tejido del huésped, compuestos que tienen un efecto sobre la liberación de sustancias de las células del huésped, sustancias que podrían ayudar a competir a los hongos ectomicorrízicos con otros organismos de la rizósfera, además de nutrientes o factores de crecimiento requeridos por el huésped (Harley y Smith, 1983).

i) Requerimientos fisicoquímicos

Se sabe que tanto factores físicos como químicos tienen influencia sobre el desarrollo de las ectomicorrizas, dichos factores son dependientes de cada especie.

- ♦ **Temperatura.** La temperatura óptima para el crecimiento micelial de la mayoría de estos hongos esta entre 18 y 27° C (Harley, 1969; citado por Marx y Krupa, 1978). En general, el crecimiento cesa a temperaturas por arriba de los 35° C y por debajo de los 5° C (Harvey, 1991).
- ♦ **pH.** En general, los hongos ectomicorrízicos son considerados acidófilos. Todos los experimentos hechos *in vitro* en relación a este parámetro, indican que el mejor crecimiento se presenta entre un pH de 3.2 y 6.5, con un óptimo, para la mayoría de los hongos, entre 4.5 y 5.5 (Hung, 1983). Sin embargo, debe considerarse que el pH óptimo para el crecimiento es específico de cada especie.
- ♦ **Aireación.** Muchos reportes indican que estos organismos son aerobios obligados. Se ha reportado también, que la tasa de crecimiento es mucho mayor cuando el hongo es crecido en cultivo sumergido con agitación (Harvey, 1991).
- ♦ **Humedad.** Se ha reportado que los hongos ectomicorrízicos poseen cierta resistencia a condiciones de baja humedad, lo cual adquiere importancia sobre todo en plantas de zonas semi-áridas (Gupta, 1992, citado por Aquiahuatl, 1994). En general, el crecimiento microbiano se ve disminuido al bajar el nivel de actividad de agua (Troller, 1980).

ii) Requerimientos nutricionales

Para la investigación del crecimiento de los hongos ectomicorrízicos se han empleado técnicas de cultivo en medio sólido y líquido, en los cuales las concentraciones iniciales de nutrientes son generalmente excesivamente altas, lo que provoca cambios en la concentración, osmolaridad, pH, y condiciones gaseosas de la atmósfera y el medio durante el crecimiento (Harley y Smith, 1983).

Fuente de carbono. La mayoría de las especies presentan dificultad para crecer sobre fuentes de carbono complejas, como basura y humus, y no pueden utilizar lignina o celulosa. Trabajos recientes han confirmado que la mayoría de los hongos ectomicorrízicos requieren de carbohidratos simples, como glucosa o manosa, para su crecimiento. Solo algunos son capaces de utilizar carbohidratos mas complejos, como algunos alcoholes (manitol y sorbitol) y disacaridos como sacarosa, celobiosa, maltosa y trealosa. Por otra parte, se ha demostrado que en presencia de fuentes de carbono sencillas al inicio, muchos hongos son capaces de metabolizar posteriormente carbohidratos más complejos (como celulosa, pectina y glucógeno) (Marx y Krupa, 1978; Harley y Smith, 1983). En general, la actividad celulolítica de estos hongos es muy limitada, o carecen de ella (lo cual no ha resultado consistente). Sin embargo puede decirse que son capaces de utilizar mono y oligosacáridos sencillos (Harley y Smith, 1983).

Fuente de nitrógeno. La mayor parte de los hongos ectomicorrízicos crecen más rápido sobre compuestos que contienen amonio, y algunos pueden utilizar nitrato. Algunos estudios han indicado que este tipo de hongos dependen de fuentes de nitrógeno orgánico simples (amino-ácidos, urea, glutamina, etc.). Sin embargo, también se ha demostrado que son capaces de utilizar proteínas (caseína hidrolizada, extracto de malta y de levadura) como única fuente de nitrógeno, las que además estimulan su crecimiento vegetativo. En general, sales de amonio, aminoácidos y otras fuentes orgánicas más complejas de nitrógeno, son fácilmente utilizadas.

La dietilamina, prolina y piridina, así como nitratos, no son utilizados o resultan tóxicos para la mayoría de los hongos ectomicorrízicos (Marx y Krupa, 1978; Harley y Smith, 1983; Vogt, y col. 1991).

Fósforo. Una fuente de fosfato es esencial para todos los hongos micorrízicos. Son capaces de utilizar fosfatos orgánicos (presentes en el humus), así como inorgánicos. Al igual que con el nitrógeno, las micorrizas juegan un papel importante en el ciclo y conservación del fósforo en los ecosistemas. Se ha observado que las cubiertas micorrízicas pueden retener más del 90 % del fósforo absorbido del medio. Una variedad de hongos ectomicorrízicos crecidos en cultivo puro, pueden producir *fosfatasas* capaces de liberar el fósforo ligado orgánicamente. Por las razones anteriores, es posible explicar los efectos positivos de las micorrizas sobre la nutrición con fósforo de las plantas (Harley y Smith, 1983; Vogt, 1991).

Otros nutrientes inorgánicos. Hasta ahora no se ha observado nada acerca del requerimiento de potasio por los hongos ectomicorrízicos que los diferencie de otros hongos. El calcio es requerido en trazas por la mayoría de los hongos, sin embargo se ha observado que *Asco-micetos* y *Basidiomicetos* pueden requerirlo en mayores cantidades que el resto de los hongos.

Vitaminas. Muchos hongos ectomicorrízicos requieren ciertas vitaminas del grupo B para su crecimiento y formación de la micorriza (principalmente tiamina y biotina). La fuente de vitaminas podría estar contenida en exudados de la raíz y/o ser excretadas por microorganismos asociados con las micorrizas. Se han reportado ciertos hongos heterotróficos para inositol, ácido nicotínico y ácido pantoténico. Algunas de estas vitaminas en concentraciones excesivas pueden resultar inhibitorias para el crecimiento (Marx y Krupa, 1978; Strzelczyk y Pokojnska, 1989).

2.6. PRODUCCION DE RCV POR HONGOS ECTOMICORRIZICOS

El efecto de metabolitos extracelulares promotores del crecimiento liberados por hongos micorrízicos sobre las plantas hospederas se ha estudiado a fondo en experimentos *in vitro*. La formación de estos metabolitos por hongos simbióticos se ha demostrado en cultivos axénicos bajo condiciones de laboratorio estrictamente controladas (Slankis, 1974).

A. Auxinas

Moser (1959, citado por Harley y Smith, 1983) usando un medio con 2.04 g/l de triptofano como fuente de nitrógeno, creció micelio de hongos micorrízicos de varias especies, y algunas especies de hongos de otros grupos ecológicos. La mayoría de los hongos micorrízicos producían AIA en las condiciones de cultivo empleadas, sin embargo 3 especies de *Phlegmacium* (*Cortinarius*), liberaron ácido indolpropiónico (AIP). Otras cepas de *Phlegmacium* produjeron AIA además de AIP, y dos especies de *Suillus* produjeron AIA y AIB. En todos estos casos se usó triptofano como única fuente de nitrógeno en el medio.

Ulrich (1960) mostró que *Suillus variegatus*, *S. granulatus* y *S. luteus*, pueden formar AIA sobre el medio de Hagem (con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno) en ausencia

de triptofano. Se ha probado que muchos, aunque no todos los hongos ectomicorrizicos producen auxinas en cultivo puro (Slankis, 1973), algunos producen AIA en medio sin triptofano.

Varias especies de *Amanita* producen otros compuestos indólicos a partir de triptofano, *Boletus badius* produce AIA en fases iniciales del cultivo y después lo oxida.

Harley y Smith (1983) reportan que se ha encontrado que ciertas especies de *Phlegmaceum* (*Cortinarius*) derivados de *Picea abies* eran capaces de sintetizar indoles a partir de ácido paraminobenzóico, y entonces con alanina producir triptofano, a partir del cual el AIA podía liberarse.

Se ha estudiado la capacidad de producción de AIA en varios hongos formadores de micorriza con *Pinus sylvestris*, y otros *Basidiomycetes* y *Ascomycetes* no micorrizicos. Sobre un medio simple con agar y tartrato de amonio como fuente de nitrógeno, cerca de la mitad de 55 hongos probados produjeron AIA, este fue identificado en el micelio o en el medio, o bien en ambos (revisado por Harley y Smith, 1983).

Tomaszewski y Wojceichowska (1973, citados por Harley y Smith) cultivaron basidiomicetos micorrizicos en un medio con maltosa y glucosa como fuente de carbono, y con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, observando que cierto número de *Boletaceae* producían pigmentos oscuros, en estas especies se observó una mayor producción de auxinas. Después usaron un medio con triptofano, y se demostró que la adición de polifenoles aumenta la producción, tal vez por la prevención de la destrucción enzimática de compuestos indólicos, por *S. bovinus* y *S. variegatus* y dos especies de *Scleroderma aurantium* y *Amanita muscaria*, los cuales no forman auxinas en ausencia de triptofano.

Ek, y col. (1983) estudiaron la producción de auxinas en 16 hongos formadores de micorriza (*S. luteus*, *S. variegatus*, *S. granulatus*, *S. bovinus*, *Boletus badius*, *A. muscaria*, *Pisolithus tinctorius*, *Tricholoma imbricatum*, *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Lactarius rufus* y *Cenococcum graniforme*). En general, la cantidad de AIA en el medio resultó ser mucho mayor que en el micelio (por un factor de 10 a 20). Una cepa de *P. tinctorius* fue la que presentó los mayores niveles (18970 ± 3180 ng AIA/mg de peso seco, en el medio de cultivo). El grupo de *Suillus* fue relativamente homogéneo en el contenido de AIA, excepto por dos cepas de *S. bovinus* que mostraron un contenido mucho mayor. Una de las cepas de *H. crustuliniforme* mostró cantidades no detectables de AIA. Solo en *C. graniforme* se detectó mayor cantidad de AIA en el micelio que en el medio.

Strzelczyk y Pokojka (1984) aislaron 5 hongos ectomicorrizicos, *Amanita muscaria*, *Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *S. bovinus* y *Rhizopogon luteolus*, de la micorrizósfera de pino (*Pinus silvestris*). De estos, solo 3 hongos produjeron pequeñas cantidades de auxinas en medio sin triptofano. En medio con triptofano, todos los hongos estudiados presentaron producción de auxinas. El hongo que mayor producción presentó fue *Rhizopogon luteolus* (78.5 mg E de AIA/g de masa seca).

Todas las especies de *Hebeloma* estudiadas por Gay y Debaud (1987) liberaron compuestos indólicos cuando se incubaron con triptofano 50 mM. Estos compuestos fueron identificados como AIA, ácido indol-3-carboxílico e indol-3-aldehído. La actividad específica

del AIA sintetizado por 12 especies del género *Hebeloma* se encuentra entre 50.7 y 345.4 nmol de AIA sintetizado/h-mg de prot. micelial.

Rudawska y Gay (1989) reportan la producción de AIA por los hongos *Paxillus involutus*, *Amanita rubescens*, *Suillus bovinus*, *Pisolithus tinctorius*, *S. granulatus* y *Rhizopogon luteolus* sobre un medio de agar (Bjerkman, 1942) con triptofano 10 mM.

Strzelczyk y Pokojcka (1989) han estudiado la producción de AIA por *A. muscaria*, *S. bovinus* y *R. luteolus*, crecidos en medio Melin-Rama Das suplementado con vitaminas del grupo B y con triptofano (200 mg/l).

B. Citocininas

Miller (1967) fue el primero que reportó la producción de citocininas por un hongo micorrízico. El identificó dos compuestos activos del tipo de las citocininas, en un filtrado de un cultivo de *Rhizopogon roseolus*: trans-zeatina y ribosil-trans-zeatina. En 1968, Miller detectó actividad de citocinina en extractos de n-butanol de *Amanita rubescens*. Miller (1971) y Crafts y Miller (1974) demostraron que *Rhizopogon roseolus*, *Suillus cothurnatus*, *Suillus punctipes* y *Amanita rubescens* producen citocininas.

Ng y col. (1982) estudiaron la producción *in vitro* de citocininas por *R. luteolus*, *Boletus elegans* y *Suillus luteus*. Los filtrados del cultivo en donde crecieron los hongos, presentaron actividad de citocinina al cabo de 2 semanas. La actividad de las citocininas en el filtrado del cultivo, se vio incrementada al aumentar el periodo de incubación. Se detectó actividad de citocininas en *R. luteolus* pero no en *B. elegans*. Se detectaron compuestos que corresponden a la zeatina y ribo-zeatina.

Kampert y Strzelczyk (1989) reportan la producción de citocininas por los hongos micorrízicos *Rhizopogon luteolus* y *Suillus bovinus* sobre el medio de Lamb sin NH₄Cl, pero suplementado con aminoácidos.

C. Giberelinas

Gogala (1967, 1971; citado por Slankis, 1973 y Greene, 1980) observó que los cuerpos fructíferos, micelio y medio de cultivo de *Boletus edulis* var. *pinicolus* contenían tres compuestos relacionados con las giberelinas (ácido giberélico, un complejo de compuestos considerados ésteres giberélicos y uno no identificado) y una citocinina (probablemente zeatina).

Strzelczyk y Pokojcka (1984), han reportado la producción de giberelinas, en muy baja concentración, por los hongos micorrízicos *Suillus luteus* (2.1 µg de E de AG₃/g de masa seca) y *Rhizopogon luteolus* (0.3 µg/g de masa seca).

D. Etileno

Lynch (1972) estudió la producción de etileno por varios hongos del suelo, de los cuales, el que lo produjo en mayor cantidad fue *Mucor hiemalis* sobre un medio con agar, sales minerales, metionina y glucosa. El hongo fue cultivado a 25° C, durante 7 días.

Es probable que cierto número de hongos sean capaces de producir etileno, este ha sido identificado como producto de *Mucor hiemalis* y de *Penicillium digitatum*, *Blastomyces dermatidis*, *Fusarium oxysporum* y ciertas levaduras (Lynch, 1972; Lynch y Harper, 1974).

Graham y Linderman (1979, citados por Harley y Smith, 1983), reportan la producción de etileno por hongos micorrízicos en cultivo líquido con metionina 10 mM. Se hizo un estudio particular con *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* y *Cenococcum graniforme*, todos estos produjeron etileno, y *Pisolithus tinctorius* solo lo hizo si el medio era frecuentemente renovado.

2.6.1. Requerimientos nutricionales para la producción de RCV

A lo largo de varios años, se han llevado a cabo gran cantidad de experimentos para aumentar la producción de RCV por ectomicorrizas, variando la concentración o bien la naturaleza de ciertos nutrientes.

A. Auxinas

Harley y Smith (1983) reportan la producción de compuestos indólicos en un medio con triptofano como única fuente de nitrógeno. Con el uso de otra fuente de nitrógeno, la producción de dichos compuestos se ve reducida. La alanina, asparagina, ácido aspártico, glutamina y glicina, fueron inhibitorios para la producción de AIA, sin embargo incrementaron el crecimiento de micelio.

Ciertas vitaminas del grupo B resultan esenciales o estimulantes para el crecimiento de los hongos micorrízicos y la formación de micorrizas (Davey, 1971; Slankis, 1973).

Rudawska y Gay (1989), probaron los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno (amonio y nitrato) sobre la producción de AIA en 7 hongos ectomicorrízicos diferentes (2 cepas de *Paxillus involutus*, *Amanita rubescens*, 2 cepas de *Suillus bovinus*, *Pisolithus tinctorius*, *S. granulatus* y *Rhizopogon luteolus*). En general, se observó que la síntesis de AIA fue mayor en los cultivos con nitrato que en los que contenían amonio como fuente de nitrógeno.

Strzelczyk y Pokojka (1989), encontraron que la mayoría de las vitaminas retardan la producción de auxinas en un medio suplemento con triptofano. Ellos estudiaron 3 hongos ectomicorrízicos de pino: *A. muscaria*, *S. bovinus* y *R. luteolus*. La vitamina que resultó ser mas inhibitoria fue la piridoxina. Solo *Suillus bovinus* produce mayor cantidad de auxinas en presencia de biotina (71.6 µg de E. de AIA/g de masa seca) y ácido pantoténico (94.8 µg/g de masa seca), y *Amanita muscaria* presenta la mayor producción con tiamina y biotina (41 µg/g).

B. Citocininas

Kampbert y Strzelczyk (1989) encontraron que los diferentes aminoácidos pueden estimular la producción de biomasa y la síntesis de citocininas por los hongos ectomicorrízicos *Rhizopogon luteolus* y *Suillus bovinus* (aislados de *Pinus sylvestris*). Sin embargo no existe

una correlación entre la producción de biomasa y citocininas en *R. luteolus*. En *R. luteolus*, La lisina presenta un efecto fuertemente estimulante sobre la producción de estas sustancias (1.69 E. de cinetina $\mu\text{mg/g}$ de peso seco), para este caso el peso seco del micelio fue de 3.4122 g/l. Sin embargo, se obtuvo mayor cantidad de micelio en un medio con ácido aspártico (9.13 g/l), y la producción de citocininas fue menor (0.07 E. cinetina $\mu\text{g/g}$). El hongo produce ribosido 6 (γ,γ -dimetilalilamino) purina y zeatina. Para *S. bovinus*, los aminoácidos aplicados, excepto la alanina (0.0258 E. de cinetina $\mu\text{g/g}$), no afectan la producción de citocininas.

C. Etileno

Lynch (1972) y Lynch y Harper (1974) encontraron que la producción de etileno por hongos micorrízicos solo ocurre en suelos que contienen una fuente de carbono y metionina.

MATERIALES Y METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MICROORGANISMOS

3.1.1. Hongos productores de RCV

El presente trabajo se ha llevado a cabo con cuatro cepas de hongos productores de reguladores de crecimiento vegetal, tres de los cuales son hongos ectomicorrizicos de los géneros *Amanita*, *Pisolithus* y *Suillus*, productores de ácido indolacético, y un hongo productor de ácido giberélico del género *Gibberella*. En la Tabla 3.1 se presenta la especie, la cepa y el origen de cada uno de los hongos estudiados.

Tabla 3.1. Género, especie y lugar de origen de las cepas estudiadas

| ESPECIE | CEPA | ORIGEN |
|------------------------------|------|--|
| <i>Suillus granulatus</i> | H13 | Colegio de Postgraduados, México |
| <i>Amanita rubescens</i> | H38 | Colegio de Postgraduados, México |
| <i>Pisolithus tinctorius</i> | P3 | Universidad Autónoma Metropolitana, México |
| <i>Gibberella fujikuroi</i> | RE11 | ORSTOM, Francia |

En las Láminas 3.1 a 3.4 se muestra el crecimiento en caja de Petri de las cuatro cepas estudiadas.



Lámina 3.1. Cepa de *Suillus granulatus* (H13) cultivada durante 10 días sobre medio Papa Dextrosa Agar

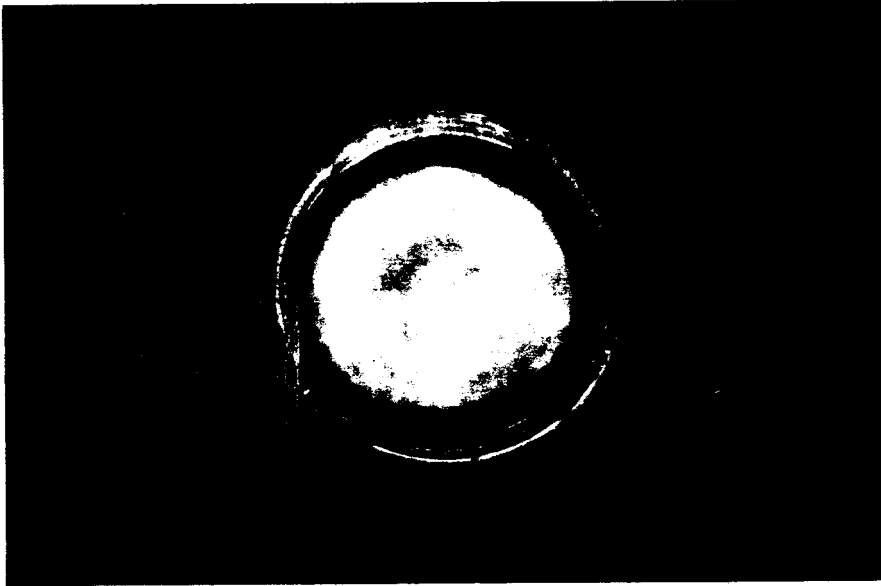


Lámina 3.2. Cepa de *Amanita rubescens* (H38) cultivada durante siete días sobre PDA.

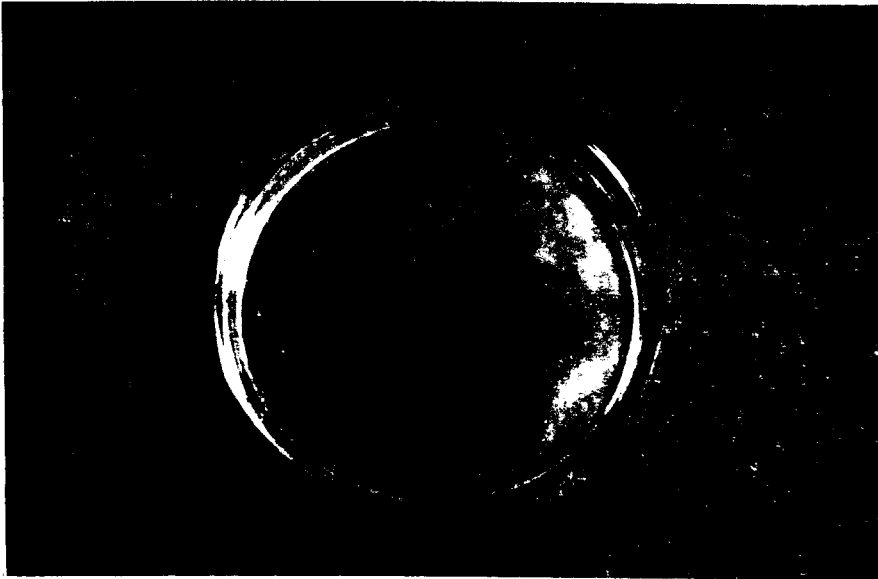


Lámina 3.3. Cepa de *Pisolithus tinctorius* (P3) cultivada durante 10 días sobre PDA.



Lámina 3.4. Cepa de *Gibberella fujikuroi* (RE11) crecida sobre PDA durante diez días

3.1.2. Bioensayos con microorganismos

Además de los hongos estudiados, se adquirieron cepas de bacterias y levaduras para realizar bioensayos con microorganismos. En la Tabla 3.2, se presentan las cepas ensayadas.

Tabla 3.1. Género, especie y lugar de origen de las cepas estudiadas en los bioensayos con microorganismos

| ESPECIE | CEPA | ORIGEN |
|---------------------------------|------------|--|
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC | Universidad Autónoma Metropolitana, México |
| <i>Escherichia coli</i> | F7 | Universidad Autónoma Metropolitana, México |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ATCC 32120 | Universidad Autónoma Metropolitana, México |
| <i>Schwanniomyces castellii</i> | CBS 2863 | Universidad Autónoma Metropolitana, México |

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los experimentos realizados en los hongos productores de RCV, fueron hechos sobre medios con agar en cajas de Petri de plástico de 100 x 15 mm (*S* y *M* laboratorios). Las variables estudiadas para cada cepa fueron: temperatura de incubación, actividad de agua (A_w), fuente de carbono y presión parcial de CO_2 . A continuación se describen los medios de cultivo utilizados para cada experimento. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados durante 15 minutos a 15 lb/plg².

3.2.1. Temperatura de incubación

Para el estudio de esta variable fueron probadas dos temperaturas: 25 y 30° C. El medio utilizado para el experimento fue Papa Dextrosa Agar, PDA (*DIFCO*).

3.2.2. Actividad de agua

Para el estudio de esta variable, se utilizó como medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (*DIFCO*). Para lograr diferentes valores de actividades de agua (A_w), se utilizó etilenglicol (*Baker*) en el medio como depresor de la actividad de agua (Aquihuatl y col., 1994). Las concentraciones del depresor en el medio fueron 0, 5, 10, 15 y 20 % (v/v), logrando de esta manera valores de A_w de 0.999, 0.980, 0.960, 0.943 y 0.932, respectivamente.

3.2.3. Fuente de carbono

Este experimento fue realizado con tres fuentes de carbono diferentes: glucosa, sacarosa y almidón. El medio usado para glucosa y sacarosa, fue el medio Hagem modificado (Miller, 1967), su composición en g/L es la siguiente: glucosa/sacrosa, 10; KH_2PO_4 , 0.5; NH_4Cl , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; FeCl_3 , 0.005; extracto de levadura, 1; agar bacteriológico, 15; pH 5.5. El medio con almidón usado tiene la siguiente composición en g/L: almidón soluble, 20; extracto de malta, 2; urea, 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; KH_2PO_4 , 0.8; agar bacteriológico, 15; pH 6.2. El pH de ambos medios fue ajustado con hidróxido de sodio (1 N), o bien con ácido fosfórico (1 N), con el uso de un potenciómetro *Conductronic* (modelo pH 20).

Los hongos fueron incubados a la temperatura en que se observó una mayor velocidad de crecimiento radial durante el tiempo requerido para cada caso.

3.2.4. Presión parcial de CO_2

En este caso el experimento fue realizado en viales de vidrio de 125 ml con tapón de hule hermético, de manera que la proporción de gases dentro de los viales fuera siempre conocida. El medio utilizado para el caso de los hongos productores de AIA (*S. granulatus* y *P. tinctorius*), fue PDA (*BIOXON*) suplementado con 50 mg/l de L-triptofano (*SIGMA*), esterilizado con un filtro estéril con tamaño de poro de 0.45 μm (*Millipore*), debido a que este aminoácido se ha reportado como precursor de este RCV (Ek y col., 1983; Strzelczyk y col., 1984). Para el caso de *Gibberella fujikuroi* el medio utilizado fue el medio con almidón descrito anteriormente, ya que Kumar y Lonsane (1988 y 1990) reportan que existe una mejoría en la producción del ácido giberélico cuando se utiliza almidón como fuente de carbono.

3.2.5. Bioensayos con semillas

Los medios de cultivo utilizados para los bioensayos son los mismos medios de cultivo en donde crecieron los hongos productores de RCV. El medio de cultivo control para el caso del ácido giberélico (producido por *G. fujikuroi*), es el medio con almidón ya descrito; para el caso del ácido indolacético (producido por los hongos ectomicorrícicos) se trata de PDA con triptofano. Ambos medios son los medios utilizados para la producción de los RCV (con almidón para el AG₃ y con triptofano para el AIA).

Cabe mencionar que estos bioensayos fueron realizados únicamente para analizar los medios de cultivo en donde crecieron *P. tinctorius* y *G. fujikuroi* bajo diferentes atmósferas de CO₂.

Las curvas patrón para ambos compuestos fueron realizadas en los medios ya mencionados, con la adición de diferentes cantidades de una solución patrón (1 mg/ml) de ácido indolacético o ácido giberélico para así obtener concentraciones finales de 0, 0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L.

La solución patrón de ácido indolacético fue preparada con 50 mg de ácido indolacético (*SIGMA*), disueltos en 500 µl de una solución de NaOH 1 N y aforada a 50 ml con agua destilada. Para el ácido giberélico (*SIGMA*), se disolvieron 50 mg de este compuesto en 500 µl de una solución de etanol (*Baker*) al 50 %, para finalmente aforar con agua destilada hasta 50 ml.

En la Figura 3.1 se describe el procedimiento seguido para el empleo de los medios de cultivo en donde crecieron los hongos para correr los bioensayos con semillas de alfalfa.

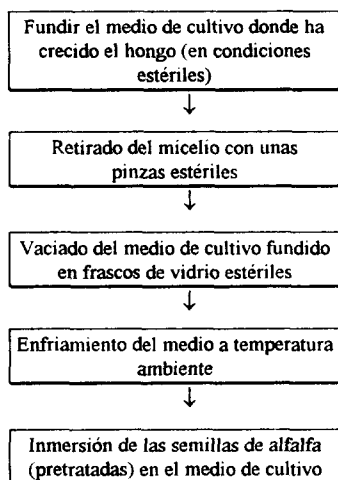


Figura 3.1. Procedimiento seguido para el uso de los medios de cultivo en donde crecieron los hongos productores de RCV.

3.2.6. Bioensayos con microorganismos

Los bioensayos con microorganismos fueron realizados en tubos de ensaye de vidrio de 25 ml. con tapones de baquelita. El medio de cultivo utilizado en todos los casos fue medio Czapek líquido (ATCC, 1993) con la siguiente composición en g/L: NaNO₃, 3; K₂HPO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0.5; KCl, 0.5; sacarosa, 30; agua destilada, 1 litro. Al medio se le adicionaron diferentes cantidades de una solución patrón de ácido indolacético y ácido giberélico para obtener concentraciones finales de 0, 0.6, 1 y 3 mg/L Finalmente el pH de los medios se ajustó a 5.7 para el caso de las levaduras, y a 6.5 para las bacterias.

3.3. LLENADO DE VIALES CON CO₂

Para llevar a cabo el experimento con diferentes presiones parciales de CO₂ fue necesaria la utilización de viales cerrados herméticamente, y de esta manera se manejaron diferentes proporciones de CO₂/aire. Las proporciones iniciales (teóricas) fueron 0/100, 30/70, 60/40, de manera que el porcentaje inicial de oxígeno en la atmósfera fue de 21 %, 14.7 % y 6.3 %, respectivamente. La metodología correspondiente a este experimento se describe en la Figura 3.2.

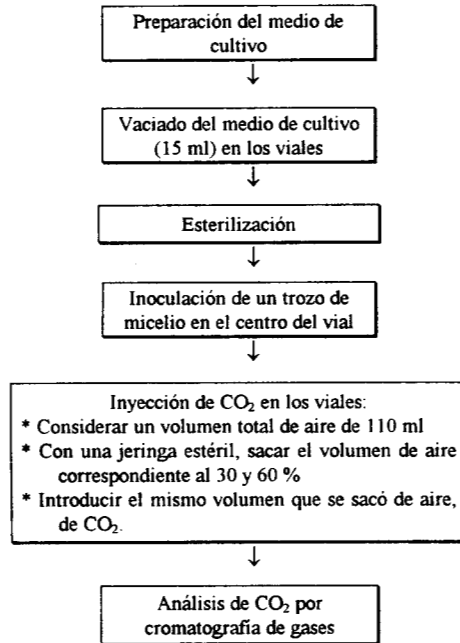


Figura 3.2. Procedimiento realizado para la inoculación del micelio y posterior llenado de viales con CO₂.

Para determinar la composición en CO₂/aire de la atmósfera de los viales, se utilizó un cromatógrafo de gases (*GOW MAC*) serie 550 (modelo 69-550), con las siguientes características: columna 1/4" x 4' DC-200; detector de conductividad térmica y usando como gas acarreador helio, 10-100 ml/min. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Temperatura de la columna: | 140° C |
| Temperatura del detector: | 190° C |
| Temperatura del inyector: | 170° C |
| Presión del gas acarreador: | 50 PSI |
| Flujo del gas acarreador: | 30 ml/min |
| Volumen de inyección: | 15 µl |

Para determinar el contenido de CO₂ en los viales, se corrió una curva patrón con proporciones conocidas de CO₂/aire (0/100, 25/75, 50/50, 75/25 y 100/0). Las muestras fueron tomadas a diferentes tiempos de incubación de los hongos y fueron inyectadas en el cromatógrafo con una jeringa para gases de 50 µl (DYNATECH, Modelo A-2 gas).

3.4. BIOENSAYOS

Los bioensayos se realizaron para detectar la presencia de moléculas activas de reguladores de crecimiento vegetal en los medios de cultivo en donde han crecido los hongos productores. El material vegetativo utilizado son semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) de variedad *Moappa*.

3.4.1. Bioensayos con semillas

Para llevar a cabo cualquier tipo de bioensayo con semillas es necesario trabajar y obtener condiciones asépticas en las semillas utilizadas, con este fin es necesario seguir un tratamiento de desinfección que no dañe el material vegetativo. En la Figura 3.3 se describe el tratamiento de desinfección seguido para las semillas de alfalfa.

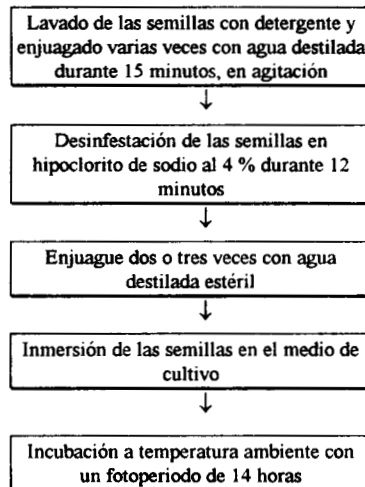


Figura 3.3. Tratamiento de desinfección seguido para las semillas de alfalfa empleadas en los bioensayos

3.4.2. Bioensayos con microorganismos

Como inóculo para los bioensayos con microorganismos, se utilizó una suspensión del microorganismo a estudiar, hecha en medio Czapek 24 horas antes de realizar la inoculación. Se utilizaron tubos de ensaye de 25 ml con tapón de baquelita y 5 ml de medio de cultivo.

En la Figura 3.4 se describe la metodología seguida en los bioensayos con microorganismos.

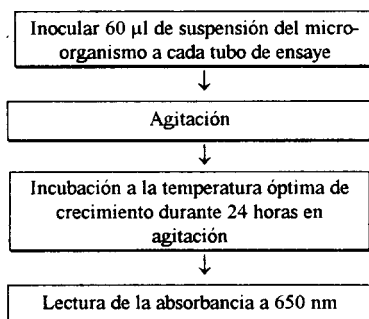


Figura 3.4. Metodología para los bioensayos con microorganismos

Inicialmente los tubos de ensaye contenían 5 ml de medio de cultivo. Al final del periodo de incubación, la densidad óptica de la suspensión se determinó a 650 nm (Barea y col., 1974).

3.5. ANALISIS DE MEDIOS DE CULTIVO POR HPLC

Para detectar reguladores de crecimiento vegetal en los medios de cultivo en donde crecieron los hongos productores de estos compuestos, se montaron técnicas para la detección de ácido indolacético y ácido giberélico por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Presión). Inicialmente la técnica fue montada con muestras líquidas con concentraciones conocidas de RCV.

Para el análisis por HPLC se utilizó un cromatógrafo *Perkin Elmer* (Binary LC Pump 250), conectado a un detector ultravioleta *Perkin Elmer* (UV/Vis Spectrophotometric Detector LC 290) a 280 nm para la detección de ácido indolacético y a 260 nm para ácido giberélico. Para ambos casos se usó como fase móvil buffer de fosfatos pH 4.6 / metanol en proporción 75:25 (Thibert, 1993). Se utilizó una precolumna recomendada para la columna correspondiente. A continuación se presentan las características de la columna utilizada para el análisis de ambas moléculas.

| | |
|----------------------|---|
| Columna: | <i>Spherisorb</i> 5 μ , ODS-2 (Phase Sep) |
| Material de empaque: | Octa Decil Silano (2) |
| Tamaño de partícula: | 5 μ |
| Tamaño de poro: | 80 Å |
| Volumen de poro: | 0.5 ml/g |
| Area de superficie: | 220 m ² /g |
| Carga de carbono: | 12 %, monomérica |

Las condiciones de operación usadas para el análisis del ácido indolacético y del ácido giberélico se muestran en seguida.

| | |
|-------------------------|------------|
| Flujo de la fase móvil: | 0.9 ml/min |
| Temperatura: | ambiente |
| Presión: | 2400 PSI. |
| Volumen de inyección: | 20 μ l |

Previo al análisis por HPLC, las muestras se filtraron con filtros de membrana (*Phenomenex*) de 13 mm, con un tamaño de poro de 0.45 μ m. La fase móvil fue desgasificada (en un sonicador *Branson 2200*) y filtrada con filtros de membrana de 47 mm (*Millipore*) con un tamaño de poro de 0.45 μ m. De esta manera, finalmente las muestras se inyectaron con una jeringa (*Hamilton*) de 100 μ l.

3.5.1. Extracción de RCV del medio de cultivo

Anterior al análisis por HPLC es necesario hacer la extracción de la molécula de interés por medio de solventes orgánicos. Con este fin, el ácido indolacético fue extraído del medio de cultivo sólido, con metanol puro (grado HPLC, *Baker*) durante 24 horas, y resuspendido en un buffer de fosfatos 20 mM a pH de 7.5 (Crozier y col., 1980; Ernstsén y col., 1986; Hemberg y Tillberg, 1980; Linskens y col., 1987).

El ácido giberélico se extrajo de los medios de cultivo con acetato de etilo (*Baker*), durante 24 horas y se resuspendió para su análisis en un buffer de fosfatos 20 mM, pH = 2.5 (Audus, 1972; Linskens y col., 1987; Yamaguchi, 1979). En la Figura 3.5 se describe la metodología seguida para ambos casos.

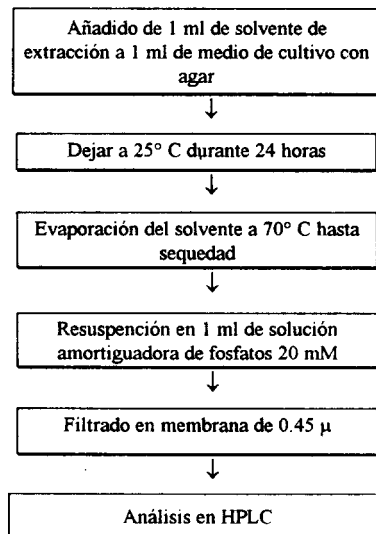


Figura 3.5. Procedimiento seguido para la extracción de ácido indolacético y ácido giberélico de medios de cultivo con agar.

3.6. EXPRESION DE RESULTADOS

En esta sección se describe como se llevaron a cabo y la manera de expresar algunos de los resultados que son fundamentales para la interpretación de los datos obtenidos en los diferentes estudios realizados.

3.6.1. Velocidad de crecimiento radial

Para determinar la velocidad de crecimiento radial (VCR) de las cepas estudiadas, se llevó a cabo una medición del radio del micelio cada 24 horas durante el tiempo necesario para que las diferentes cepas invadieran la caja de Petri. De esta manera se obtuvo una curva del crecimiento radial del hongo en función del tiempo, a partir de esta se calculó la pendiente en la fase de crecimiento logarítmico, obteniendo de esta manera la velocidad de crecimiento radial en unidades de longitud por tiempo.

3.6.2. Densidad de crecimiento

La densidad de crecimiento es una medida que ha sido usada para estimar la cantidad de biomasa (en peso seco) que hay en una superficie dada. La biomasa de los hongos fue estimada al tiempo final del experimento, el procedimiento seguido para cuantificarla se muestra en la Figura 3.6.

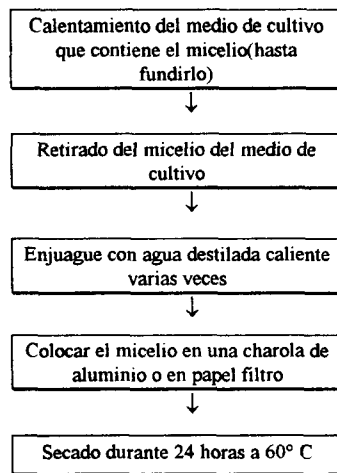


Figura 3.6. Procedimiento seguido para la cuantificación de biomasa por peso seco.

El diámetro del micelio fue medido al tiempo final del experimento y de esta manera, junto con el peso seco de la biomasa, la densidad de crecimiento fue estimada en miligramos por centímetro cuadrado (mg/cm^2).

3.6.3. Análisis estadístico

Para los diferentes experimentos se llevaron a cabo análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.01 ($\alpha = 0.01$) para así determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados con el uso de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 0.05$). La prueba estadística de Tukey consiste en la determinación de un coeficiente en función de los cuadrados medios del error, se lleva a cabo una comparación entre las medias de la población (Steel y Torrie, 1960; Volke, 1994). En los anexos se muestran los análisis de varianza para cada tratamiento.

Para el caso de los bioensayos, se realizó una regresión con las curvas patrón de AIA y AG₃, para de esta manera interpolar los datos obtenidos en los bioensayos realizados sobre los medios en donde crecieron los hongos productores de estas sustancias y así poder determinar la concentración del RCV en dichos medios.

Los análisis de varianza y las regresiones se realizaron con el paquete estadístico SAS (Helwig y Council, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL

Los hongos ectomicorrízicos se ven mayormente afectados por la temperatura que otras especies de hongos, sin embargo presentan grandes variaciones en su temperatura óptima de crecimiento entre diferentes cepas de la misma especie. Para la mayoría de estos hongos la temperatura óptima de crecimiento fluctúa entre los 8 y los 27° C. Redmond (1955) observó que si la temperatura en los suelos aumenta o disminuye en 2° C, la densidad del manto fúngico se ve alterada (Harley y Smith, 1983).

El objeto de estudiar esta variable surgió de la necesidad de encontrar una temperatura a la cual el hongo productor de RCV mostrara una mayor velocidad de crecimiento radial (VCR), para así poder realizar el resto de los experimentos a la temperatura de mejor crecimiento.

Para determinar el efecto que tiene la temperatura sobre el crecimiento de los hongos estudiados, se utilizaron dos temperaturas de incubación: 25 y 30° C, las cepas fueron crecidas en PDA durante 312 horas. Para el resto de los experimentos, las cepas fueron incubadas a la temperatura en la cual presentaron una mayor velocidad de crecimiento radial.

En la Tabla 4.1 se muestran la velocidades de crecimiento radial (VCR) en función a la temperatura de incubación para las diferentes cepas estudiadas.

Tabla 4.1. Efecto de la temperatura (25 y 30° C) en las velocidades de crecimiento radial

| CEPA | TEMPERATURA (° C) | VCR (mm/día) | * |
|----------------------|----------------------|-----------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | 25 | 2.085 | A |
| | 30 | 2.049 | A |
| <i>A. rubescens</i> | 25 | 2.933 | A |
| | 30 | 2.188 | B |
| <i>P. tinctorius</i> | 25 | 1.595 | B |
| | 30 | 2.651 | A |
| <i>G. fujikuroi</i> | 25 | 3.367 | A |
| | 30 | 2.248 | B |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Como puede verse en la Tabla 4.1, las cepas de *A. rubescens*, *P. tinctorius* y *G. fujikuroi* responden de una manera significativa a la temperatura de incubación. Para la cepa de *S. granulatus* no se observaron diferencias significativas en el crecimiento radial por efecto de esta variable (Figura 4.1).

Para las cepas de *A. rubescens* y *G. fujikuroi* la VCR a 25°C es significativamente mayor que a 30°C. En este último caso, el resultado obtenido no concuerda con lo reportado por Vass y Jefferys (1979) quienes mostraron que con la cepa de *G. fujikuroi* que ellos utilizaron, se obtiene la máxima tasa de crecimiento a los 31°C.

Para *P. tinctorius* se observa que la temperatura de incubación tiene un efecto significativo en la VCR, detectándose un incremento en dicha variable a los 30°C, esto concuerda con lo reportado por Schramm (1966), quien observó que *P. tinctorius* es una especie que se adapta a temperaturas relativamente altas (Meyer, 1973). Marks y Foster (1973), también han reportado que un gran número de especies del género *Pisolithus* tienen la capacidad de crecer a temperaturas mayores que la mayoría de los hongos ectomicorrízicos.

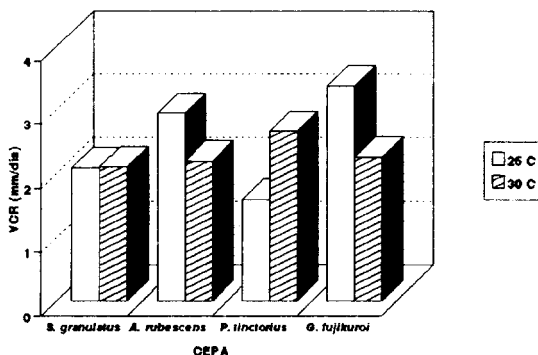


Figura 4.1. Efecto de la temperatura de incubación en la velocidad de crecimiento radial de las cepas. En las ordenadas se grafica la VCR en milímetros por día. Las barras blancas representan los 25°C, y las barras rayadas los 30° C.

Marx (1970) encontró que el efecto que tiene la temperatura sobre el crecimiento de hongos micorrízicos depende de la especie del hongo, *P. tinctorius* es menos sensible a las fluctuaciones de temperatura que otras especies de ectomicorrizas (Marks y Foster, 1973). En este caso también se observó que la cepa de *S. granulatus* resulta una cepa poco sensible a los cambios de temperatura, ya que no se detectaron diferencias significativas en su VCR entre los 25 y los 30° C.

Por otra parte, Kumar y Lonsane (1987, 1988) han observado que la temperatura mas adecuada para el cultivo y producción de AG₃ por este hongo es a 28° C (en una cepa diferente a la utilizada por Vass y Jefferys, 1979). Esto indica que la temperatura a la que se detecta un mejor crecimiento, no necesariamente corresponde con la temperatura en la que se obtienen mejores resultados en producción de AG₃, además de que este resultado es dependiente también de la cepa utilizada.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos puede decirse que la cepa de *S. granulatus* es una cepa poco sensible a cambios de temperatura, ya que no se observan diferencias en el crecimiento por efecto de esta variable. La cepa de *P. tinctorius* presenta una VCR significa-

tivamente mayor a 30 °C que a 25°C, lo cual indica que dicha cepa (P3), es capaz de adaptarse a temperaturas relativamente altas.

Las cepas de *A. rubescens* y *G. fujikuroi* resultaron ser cepas sensibles al cambio de temperatura. A los 30 °C se observó una disminución significativa en sus velocidades de crecimiento radial.

4.2. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA (A_w) EN EL CRECIMIENTO

El estudio del efecto de la actividad de agua (A_w) como un parámetro para definir condiciones de cultivo sólido resulta de gran importancia debido a que los sustratos sólidos generalmente tienen bajos contenidos de humedad que puede limitar el crecimiento y metabolismo del microorganismo de interés. La actividad de agua (A_w) es una medida de la cantidad de agua disponible en un sustrato, definida como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con la de dicho sustrato (Sandhya, 1992).

El metabolismo de microorganismos se ve fuertemente influenciado por las condiciones de A_w en un medio de cultivo, en la mayoría de los casos se observa un marcado efecto sobre su fisiología en el rango de 0.80 a 0.99 (Gervais, 1989).

Se ha encontrado que la actividad de agua en el medio tiene un efecto sobre el crecimiento radial y la producción de biomasa, así como en la producción de metabolitos secundarios y de ciertas enzimas en algunas especies de hongos filamentosos (Grajek y Gervais, 1987; Molin y col., 1992). En general, se ha observado que al disminuir la actividad de agua en el medio, el crecimiento microbiano se ve reducido, al mismo tiempo que la producción de ciertos metabolitos se ve especialmente influenciada (Troller, 1980). Otros autores también han observado que en sustratos sólidos este parámetro provoca un efecto importante sobre el metabolismo de hongos (Gervais y Christophe, 1986). El valor óptimo de actividad de agua para la extensión radial depende de cada especie de microorganismo (Molin y col., 1992). Para el caso específico de los hongos micorrízicos, se ha reportado que existe una gran variación entre especies en su capacidad para tolerar bajos potenciales de agua. Se ha sugerido que las ectomicorrizas que producen rizomorfos pueden presentar una mayor capacidad para adaptarse a ambientes secos (Harley y Smith, 1983).

Debido a los antecedentes presentados, se estudió el efecto de este parámetro sobre el crecimiento radial y producción de biomasa en los hongos productores de RCV. De esta manera se evaluó el efecto de cuatro niveles de actividad de agua: 0.998, 0.980, 0.960 y 0.943 (sobre PDA). El efecto en el crecimiento fue cuantificado como la velocidad de crecimiento radial (VCR), y la producción de biomasa se evaluó como la densidad de crecimiento (ρ_x) medida en mg de biomasa (peso seco) por cm^2 .

La importancia de estimar la VCR y la ρ_x como una medida del crecimiento, es que la mayoría de las cepas estudiadas son hongos de crecimiento lento, de manera que es necesario establecer ciertas condiciones que favorezcan tanto su capacidad de invasión como su densidad de crecimiento en el medio en que se desarrollan, para que así tengan la posibilidad de competir con otros microorganismos contaminantes de rápido crecimiento.

El crecimiento radial expresado en VCR, es una variable que proporciona una idea acerca de la capacidad de colonización que tienen los hongos estudiados. En la Tabla 4.2 se comparan las velocidades de crecimiento radial en función a la actividad de agua para las cuatro cepas.

Tabla 4.2. Velocidades de crecimiento radial en función a la actividad de agua (A_w), los valores de A_w fueron: 0.999, 0.980, 0.960 y 0.943.

| CEPA | A_w | VCR (mm/día) | * |
|----------------------|-------|-----------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | 0.998 | 2.094 | A |
| | 0.980 | 1.459 | B |
| | 0.960 | 0.122 | C |
| | 0.943 | 0 | D |
| <i>A. rubescens</i> | 0.998 | 3.173 | A |
| | 0.980 | 1.300 | B |
| | 0.960 | 0.148 | C |
| | 0.943 | 0 | D |
| <i>P. tinctorius</i> | 0.998 | 2.651 | A |
| | 0.980 | 0.865 | B |
| | 0.960 | 0 | C |
| | 0.943 | 0 | C |
| <i>G. fujikuroi</i> | 0.998 | 3.486 | A |
| | 0.980 | 2.103 | B |
| | 0.960 | 0.797 | C |
| | 0.943 | 0.301 | D |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Como puede observarse en la Tabla 4.2, existen diferencias significativas en la VCR de todas las cepas por efecto de la actividad de agua. En todos los casos, al disminuir el nivel de A_w disminuye significativamente la VCR. Solamente la cepa de *G. fujikuroi* presentó crecimiento a un nivel de A_w de 0.943.

La respuesta observada en la velocidad de crecimiento radial por efecto de A_w , coincide con lo reportado por Molin y col. (1992). En general, la disminución en A_w provoca un efecto negativo en la velocidad de crecimiento radial de las cuatro cepas estudiadas (Figura 4.2). En el caso de las cepas *S. granulatus* y *A. rubescens* podría sugerirse que ambas son especies de hongos ectomicorrízicos capaces de crecer a bajos valores de A_w (hasta 0.960) lo cual es importante considerar debido a que a estos valores de A_w se dificulta el crecimiento de algunas bacterias y levaduras. La cepa de *G. fujikuroi* resulta ser una cepa que crece también a bajos valores de A_w (hasta 0.943) y de acuerdo con resultados obtenidos por Kumar y Lonsane (1990) la producción de ácido giberélico por este hongo ha resultado mayor con un contenido inicial de humedad del 50 %.

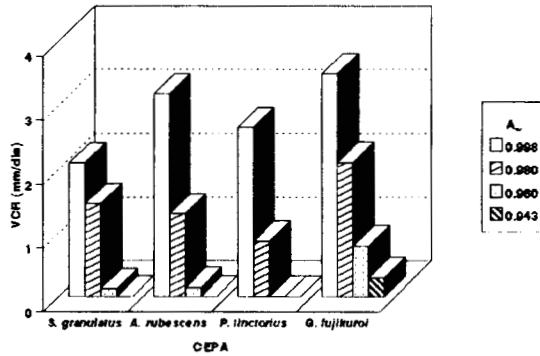


Figura 4.2. Efecto de la A_w en la VCR de las cepas estudiadas (graficadas en las abscisas). En las ordenadas se muestra la VCR en mm/día.

Se estudió el efecto que provoca la actividad de agua sobre la densidad de crecimiento (peso del micelio por unidad de superficie), observándose un cambio en esta conforme la A_w disminuye. En general, pudo observarse que al disminuir el nivel de A_w en el medio de cultivo, la densidad de crecimiento se ve incrementada, efecto contrario al observado en la VCR, en donde dicha variable disminuye junto con el nivel de A_w . En la Tabla 4.3 se presenta la comparación de medias de la densidad de crecimiento (ρ_x) en función a la A_w .

Tabla 4.3. Comparación de medias de la variable ρ_x en función a la actividad de agua (A_w)

| CEPA | A_w | ρ_x PROMEDIO (mg/cm ²) | * |
|----------------------|-------|--|---|
| <i>S. granulatus</i> | 0.998 | 6.330 | B |
| | 0.980 | 11.827 | B |
| | 0.960 | 63.743 | A |
| | 0.943 | 0 | C |
| <i>A. rubescens</i> | 0.998 | 3.303 | C |
| | 0.980 | 8.767 | B |
| | 0.960 | 24.873 | A |
| | 0.943 | 0 | D |
| <i>P. tinctorius</i> | 0.998 | 2.863 | B |
| | 0.980 | 7.623 | A |
| | 0.960 | 0 | C |
| | 0.943 | 0 | C |
| <i>G. fujikuroi</i> | 0.998 | 1.940 | B |
| | 0.980 | 2.030 | B |
| | 0.960 | 4.160 | A |
| | 0.943 | 0.043 | C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey).

Como se observa en la Tabla 4.3, existen diferencias significativas entre las ρ_x por efecto de la A_w . La única cepa que creció a una A_w de 0.943 fue *G. fujikuroi*. En las cepas de *S. granulatus* y *G. fujikuroi* existe una diferencia significativa en ρ_x a una A_w de 0.960 con respecto a la biomasa con 0.980 y 0.998, sin embargo entre estas dos últimas no hay diferencias. Para el caso de *A. rubescens* y *P. tinctorius* existen diferencias en el valor de la biomasa para todos los tratamientos (Figura 4.3).

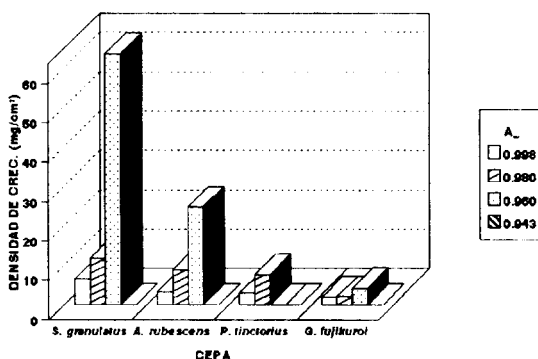


Figura 4.3. Efecto de A_w en la densidad de crecimiento (ρ_x). En las abscisas se muestran las cepas y en las ordenadas la ρ_x en mg/cm^2 . A la derecha se indican los niveles de A_w .

Como se observa en la Figura 4.3, la disminución de la A_w provocó un marcado aumento en la densidad de crecimiento en la cepa de *S. granulatus*, lo cual se ve claramente en el nivel de A_w de 0.960, en donde ρ_x aumenta hasta más de $60 \text{ mg}/\text{cm}^2$ (Láminas 4.1 a 4.3). Para las cepas *A. rubescens* y *G. fujikuroi* se detectó una ρ_x mayor a 0.960 de A_w . Para el caso de la cepa de *P. tinctorius* no hubo crecimiento a una A_w de 0.960, sin embargo si se detectó un aumento en su densidad de crecimiento al disminuir la A_w .

El análisis de los resultados obtenidos sobre el efecto que provoca la A_w en la VCR y la ρ_x muestra que existe una relación inversa entre ambas variables. La disminución en el nivel de A_w provoca una marcada reducción en la VCR y un incremento en la ρ_x . Esta respuesta se debe esencialmente a que existe una mayor frecuencia de ramificación de las hifas y un menor crecimiento apical (Aquiuhuatl, 1994). La VCR ha sido relacionada por Steele y Trinci (1975) en base a la longitud total de las hifas y al número de puntas micelio total; este último parámetro refleja el nivel de ramificación del micelio.



Lámina 4.1. Densidad de crecimiento de la cepa *S. granulatus* (H13) a una A_w de 0.998

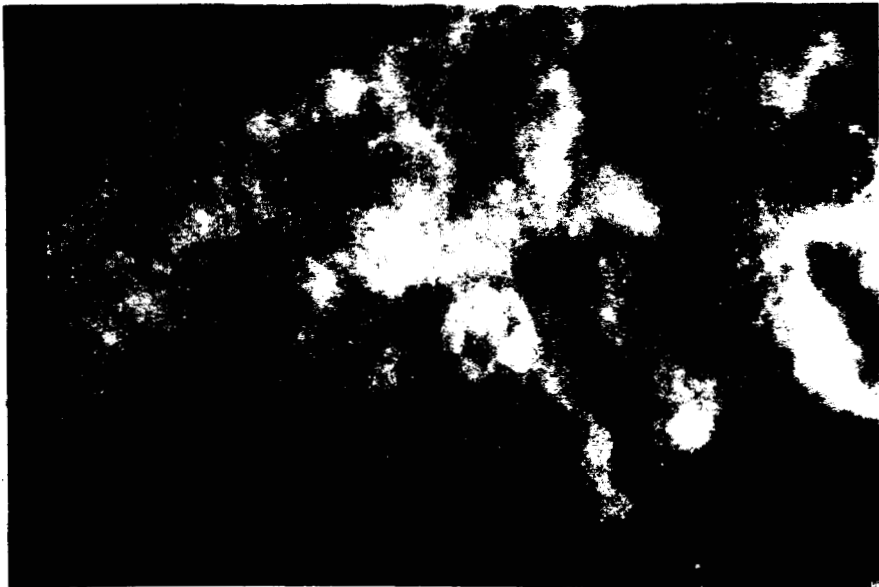


Lámina 4.2. Se observa la densidad de crecimiento de la cepa de *S. granulatus* a un valor de A_w de 0.980

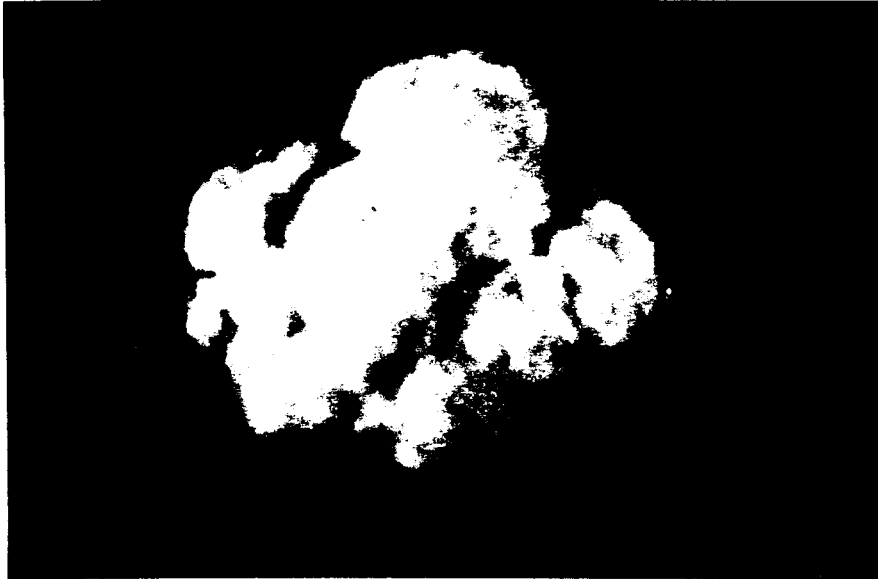


Lámina 4.3. Densidad de crecimiento de la cepa de *S. granulatus* a un nivel de A_w de 0.960.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, las velocidades de crecimiento radial en las cuatro cepas disminuye conforme el nivel de A_w lo hace. Sin embargo para la cepa de *G. fujikuroi* se detectó crecimiento, aunque muy pobre, hasta un nivel de A_w de 0.943. Esto resulta de gran importancia por que aún a 0.960 de A_w se observó un buen crecimiento de la cepa, lo cual es favorable para disminuir las probabilidades de contaminación por otros microorganismos (bacterias y levaduras) en el medio de crecimiento del hongo.

En general, para las cuatro cepas estudiadas se observó la misma tendencia: al disminuir el nivel de actividad de agua la densidad de crecimiento aumenta. Esto coincide con lo que reporta Molin y col.(1992): la producción de biomasa se ve afectada por el nivel de A_w .

Entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos por efecto de la A_w , al aumentar un factor de estrés para el hongo, la velocidad de crecimiento radial se ve disminuida y la densidad de crecimiento aumentada.

4.3. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL CRECIMIENTO

El principal objetivo de estudiar esta variable fue el de determinar la capacidad de los hongos estudiados para crecer a partir de diferentes fuentes de carbono. Tres fuentes de carbono fueron estudiadas: glucosa, sacarosa y almidón.

El interés de probar un medio con sacarosa como única fuente de carbono fue que este azúcar es la fuente de carbono más común y más barata, por lo que puede ser fácilmente utilizada para fermentaciones en sustrato sólido. Por otra parte, se ha reportado que la glucosa reprime la síntesis de metabolitos y el crecimiento de muchos microorganismos.

Es importante estudiar el efecto que tienen diversas fuentes de carbono en el crecimiento de estos hongos debido a que, si posteriormente estos son usados para la producción de RCV puede ser necesario agregar al sustrato un medio suplementario para promover el inicio de producción de biomasa, inducir la síntesis de enzimas, proveer condiciones de crecimiento balanceado o prolongar la producción de metabolitos secundarios (Demain y Solomon, 1986).

Las principales fuentes de carbono involucradas en el metabolismo de los hongos ectomicorrízicos generalmente son sacarosa, glucosa y fructosa, azúcares que obtienen a partir de las raíces de sus hospederos. Ciertas especies pueden, sin embargo, poseer enzimas para hidrolizar celulosa y otros carbohidratos complejos (por ejemplo almidón), pero esta característica no resulta muy común en este tipo de hongos (Marks y Kozłowski, 1973).

Los requerimientos nutricionales suplementarios para un sistema microbio-sustrato en desarrollo, deben ser determinados por experimentación preliminar en cultivos sumergidos o de superficie sólida a escala de laboratorio (Demain y Solomon, 1986).

Una de las razones de escoger almidón como una fuente de carbono a evaluar, ha sido debido a que Kumar y Lonsane (1987), han reportado que en la producción de ácido giberélico en cultivo sumergido existe represión catabólica por efecto de fuentes de carbono de rápida asimilación, y han observado que este mismo fenómeno ocurre en fermentación en sustrato sólido, demostrando finalmente que el almidón estimula la producción de ácido giberélico por *G. fujikuroi* (Kumar y Lonsane, 1988).

El crecimiento de las cepas fue evaluado en base a su velocidad de crecimiento radial y a la densidad de crecimiento.

En la Tabla 4.4 se presenta la comparación de las velocidades de crecimiento radial de las cepas estudiadas, en función a la fuente de carbono utilizada: PDA (control), almidón, glucosa y sacarosa (la composición de los medios se presenta en la sección de materiales y métodos).

Tabla 4.4. Comparación del efecto que tiene la fuente de carbono sobre la velocidad de crecimiento radial

| CEPA | FUENTE DE CARBONO | VCR (mm/día) | * |
|----------------------|-------------------|--------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | PDA | 1.925 | B |
| | Almidón | 1.499 | B |
| | Sacarosa | 2.016 | A |
| | Glucosa | 0.912 | C |
| <i>A. rubescens</i> | PDA | 3.313 | A |
| | Almidón | 1.260 | B |
| | Sacarosa | 1.434 | B |
| | Glucosa | 0.999 | C |
| <i>P. tinctorius</i> | PDA | 1.958 | A |
| | Almidón | 0.520 | D |
| | Sacarosa | 1.156 | C |
| | Glucosa | 1.594 | B |
| <i>G. fujikuroi</i> | PDA | 3.852 | A |
| | Almidón | 2.540 | B |
| | Sacarosa | 1.492 | C |
| | Glucosa | 1.428 | C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

De acuerdo con el análisis estadístico se observa que hay diferencias significativas en el crecimiento radial como efecto de la fuente de carbono empleada. En general, el PDA es el medio de cultivo que resulta mejor para un mayor crecimiento radial, esto debido a que es un medio completo y rico en nutrientes. Del resto de los medios de cultivo empleados, a partir de almidón se obtiene una mayor VCR en la cepa de *G. fujikuroi*. Para la cepa de *S. granulatus* no hay una diferencia significativa en el crecimiento radial entre el PDA y el medio con almidón. Para *S. granulatus*, *A. rubescens* y *G. fujikuroi* se observa un mejor crecimiento (con diferencias significativas) en el medio con sacarosa que en el medio con glucosa, al contrario de la respuesta que se tiene para la cepa de *P. tinctorius*, en donde el crecimiento radial con glucosa es significativamente mejor que con sacarosa (Figura 4.4).

A excepción de la cepa de *P. tinctorius*, en el caso del resto de las cepas la velocidad de crecimiento radial resulta mayor a partir de almidón y sacarosa que a partir de glucosa. Este último azúcar afecta considerablemente la VCR de *S. granulatus* y, en menor medida las de *A. rubescens* y *G. fujikuroi*. Este efecto puede explicarse debido a la fuerte represión catabólica ejercida cuando la glucosa se utiliza directamente como única fuente de carbono. A diferencia del resto de las cepas, *P. tinctorius* presentó una mayor VCR a partir de glucosa que a partir de sacarosa o almidón.

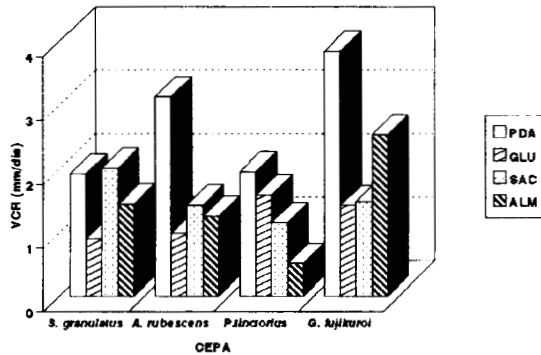


Figura 4.4. Efecto de la fuente de carbono: PDA, glucosa, sacarosa y almidón, en la velocidad de crecimiento radial. En las abscisas se grafica la cepa contra la VCR en las ordenadas. A la derecha se indica la fuente de carbono.

Puede decirse que la cepa de *P. tinctorius* es una cepa que no posee enzimas capaces de degradar fuentes complejas de carbono ya que la VCR observada en el medio con almidón resultó ser muy pequeña. Por otra parte, el crecimiento de esta cepa sobre almidón empezó hasta las 168 horas a diferencia de las otras fuentes de carbono en las que el crecimiento, por lo general, empezó desde las 96 horas; por la razón anterior puede decirse que es posible que esta cepa de *P. tinctorius* posea enzimas inducibles para la degradación de fuentes complejas de carbono, tales como el almidón.

Al igual que para la actividad de agua, en este caso también la densidad de crecimiento fué evaluada como variable para determinar el efecto que tiene la fuente de carbono sobre el crecimiento de las cepas estudiadas.

En la Tabla 4.5 se muestran las densidades de crecimiento para los diferentes medios de cultivo al tiempo final del experimento.

Como se observa en la Tabla 4.5, para las cepas *A. rubescens* y *G. fujikuroi* no existe diferencia significativa en la densidad de crecimiento como respuesta a la fuente de carbono. Para la cepa *S. granulatus* se observa una diferencia significativa en ρ_x del medio con glucosa con respecto a los medios PDA y con sacarosa entre los cuales no existe diferencia. Finalmente la cepa de *P. tinctorius* no presenta diferencias significativas en ρ_x entre los medios PDA y con glucosa y estos a su vez son significativamente diferentes del medio con sacarosa (Figura 4.5).

Tabla 4.5. Comparación de la densidad de crecimiento promedio como respuesta a la fuente de carbono empleada

| CEPA | FUENTE DE CARBONO | ρ_x PROMEDIO (mg/cm ²) | * |
|----------------------|-------------------|---|---|
| <i>S. granulatus</i> | PDA | 5.940 | B |
| | Glucosa | 10.348 | A |
| | Sacarosa | 3.754 | B |
| <i>A. rubescens</i> | PDA | 3.863 | A |
| | Glucosa | 3.263 | A |
| | Sacarosa | 2.066 | A |
| <i>P. tinctorius</i> | PDA | 3.752 | A |
| | Glucosa | 2.598 | A |
| | Sacarosa | 0.277 | B |
| <i>G. fujikuroi</i> | PDA | 2.680 | A |
| | Glucosa | 2.674 | A |
| | Sacarosa | 1.604 | A |

* Medias con la misma letra no son significativamente (prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$))

En términos generales la densidad de crecimiento es mayor en todos los casos cuando se adiciona glucosa al medio de cultivo que cuando se adiciona sacarosa. Análogamente a los resultados obtenidos sobre el efecto de la A_w sobre la VCR y ρ_x , en este caso la fuente de carbono con la que se obtiene una menor VCR provoca una mayor densidad de crecimiento, indicando nuevamente diferencias importantes en cuanto a la fisiología de crecimiento del micelio de las diferentes cepas, a saber, a mayor velocidad de crecimiento radial se observa una menor densidad de crecimiento, debido a un mayor crecimiento apical y menor frecuencia de ramificación.

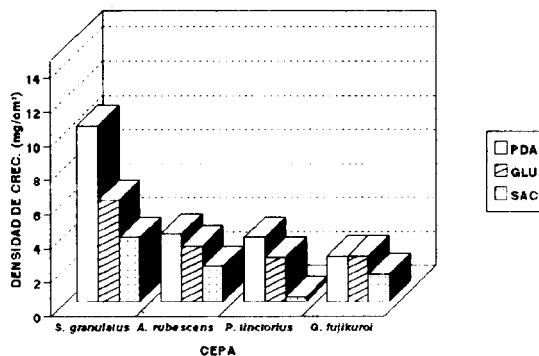


Figura 4.5. Efecto de la fuente de carbono en la densidad de crecimiento. En las abscisas se muestra la cepa y en las ordenadas la densidad de crecimiento en mg/cm². A la derecha se indica el medio de cultivo: PDA, glucosa y sacarosa.

CONCLUSIONES

La velocidad de crecimiento radial de los hongos estudiados, así como su densidad de crecimiento, se ven afectadas por la fuente de carbono empleada en el medio. Para la cepa *P. tinctorius* puede observarse que aunque la VCR en el medio con sacarosa no resultó deficiente en comparación con los demás, la densidad de la biomasa en este medio fue muy pequeña, por lo que se puede decir que esta no resulta una buena fuente de carbono para el crecimiento de esta cepa.

En general, se observa una tendencia por efecto de la fuente de carbono en la variable densidad de crecimiento. Para las cuatro cepas, ρ_x resulta mayor en el medio con glucosa que en el medio con sacarosa, lo cual sugiere que, tal y como se ha reportado, existe un cierto grado de represión en el crecimiento por efecto de esta fuente de carbono.

Nuevamente, al igual que en el caso del efecto provocado por la A_w sobre la VCR y la ρ_x , se ha observado que al aumentar un factor de estrés en el medio de crecimiento de las cuatro cepas, en este caso la fuente de carbono, se detecta una disminución en la VCR y un aumento en la ρ_x . Para este caso puede decirse que la presencia de glucosa (un fuerte represor catabólico) en el medio de cultivo como única fuente de carbono implica una condición estresante para las cepas de *S. granulatus*, *A. rubescens* y *G. fujikuroi*.

4.4. EFECTO DEL PORCENTAJE DE CO₂ EN EL CRECIMIENTO

La aireación es un parámetro crítico para obtener un adecuado suministro de oxígeno y así mantener condiciones de aerobiosis y remover el exceso de bióxido de carbono durante una fermentación (Demain y Solomon, 1986). Los reguladores de crecimiento vegetal son sustancias producidas por microorganismos durante el metabolismo secundario. Existe poca información acerca de que es lo que ocurre con la producción de RCV por ectomicorizas por efecto de la presión parcial de oxígeno. Para el caso de la producción de ácido giberélico por *G. fujikuroi*, se ha reportado que esta se favorece incrementando los niveles de aireación (Vass y Jefferys, 1979).

Harley (1956) demostró que la respiración de las raíces micorrícicas es sensible a la temperatura y que el consumo de oxígeno depende del suministro del mismo. Harley y Jennings (1958) sugieren que los efectos respiratorios que provocan los azúcares y las sales pueden deberse al aumento de la disponibilidad de ADP a partir del cual se forma el ATP. Estos autores concluyen que la utilización de carbohidratos por las micorizas es en gran parte confinada al manto fúngico. HacsKaylo (1965, reportado por Harley y Smith, 1983), estudió las tasas de respiración de algunos hongos ectomicorrícicos a varias temperaturas en cultivo puro, encontrando que la máxima tasa de respiración no siempre coincide con la temperatura a la cual se observó el mejor crecimiento.

Estudios realizados por Bajracharya y Mudgett (1980) sugieren que ambientes gaseosos controlados pueden regular los metabolismos primario y secundario en fermentaciones aeróbicas y ser dirigidos a un proceso de optimización de la formación de productos y consumo de energía.

Con el fin de observar el efecto que provoca una baja presión parcial de oxígeno en el crecimiento y, en este caso, en la producción de RCV de las cepas estudiadas se realizó este experimento (los medios de cultivo utilizados se presentan en el capítulo de materiales y métodos).

Nuevamente, para estudiar el efecto que provoca la concentración de CO₂ en la atmósfera sobre el crecimiento de los hongos productores de RCV, se evaluaron la VCR así como la densidad de crecimiento.

Tres de las cepas fueron crecidas en diferentes atmósferas iniciales de CO₂, con una proporción inicial de CO₂/aire, se ensayaron tres proporciones iniciales diferentes: 0/100, 30/70 y 60/40. De esta manera se evaluó el crecimiento radial de los hongos por el efecto del porcentaje de CO₂. Paralelamente a los experimentos con atmósferas iniciales de CO₂, se corrió un control en caja de Petri, de manera que el micelio permaneciera constantemente aireado. En la Tabla 4.6 se comparan las velocidades de crecimiento radial de las cepas de *S. granulatus*, *P. tinctorius* y *G. fujikuroi* en función del porcentaje de CO₂.

Tabla 4.6. Velocidades de crecimiento radial en función del porcentaje de CO₂.

| CEPA | % DE CO ₂ INICIAL | VCR (mm/día) | * |
|----------------------|---------------------------------|-----------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | control | 3.088 | A |
| | 0 | 1.940 | B |
| | 30 | 0.869 | C |
| | 60 | 0.180 | D |
| <i>P. tinctorius</i> | control | 2.824 | A |
| | 0 | 2.204 | B |
| | 30 | 0.449 | C |
| | 60 | 0 | D |
| <i>G. fujikuroi</i> | control | 5.299 | A |
| | 0 | 2.808 | B |
| | 30 | 2.616 | C |
| | 60 | 2.131 | D |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey

Para las tres cepas estudiadas se observa que los resultados obtenidos a diferentes niveles de CO₂ son diferentes significativamente. El crecimiento radial mas alto se da con 0 % inicial de CO₂ seguido por el nivel de 30 % y finalmente el de 60 % (Figura 4.6).

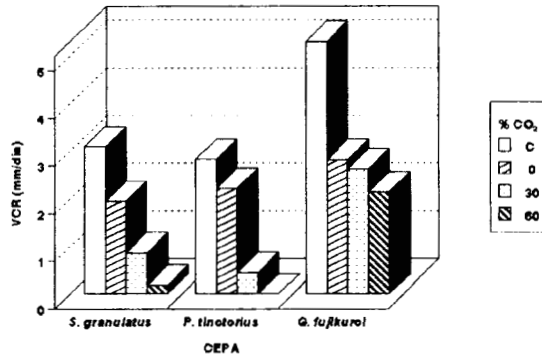


Figura 4.6. Efecto del porcentaje de CO₂ en la velocidad de crecimiento radial. En las abscisas se muestra la cepa, y en las ordenadas la VCR. A la derecha se muestran los niveles de CO₂ estudiados y se indica con una C el control corrido en caja Petri.

En general, puede observarse que el aumento en la concentración inicial de CO₂ en el ambiente de crecimiento provoca una fuerte disminución en la VCR de las tres cepas estudiadas. Sin embargo, la forma en que esta se ve disminuida varía para cada una de las cepas.

El crecimiento de *S. granulatus* y *P. tinctorius* se ve afectado de manera importante por efecto de la concentración de CO₂. Para el caso de *S. granulatus*, con un 60 % inicial de CO₂ se obtiene tan solo el 6 % de la VCR alcanzada en el cultivo control (sin limitación de oxígeno). Para el caso de *P. tinctorius* no hubo crecimiento con 60 % de CO₂, sin embargo es importante hacer notar que dicha cepa mostró una menor disminución en su VCR (en comparación con las otras dos cepas) con 0 % de CO₂ inicial, en donde se observó que dicha variable disminuyó solo un 22 % con respecto a la VCR del control (sin limitación de oxígeno). Por otra parte, el crecimiento de *G. fujikuroi* a partir de diferentes concentraciones de CO₂ no se modifica considerablemente. Respecto al control se obtiene el 53, 49 y 40 % de crecimiento en atmósferas con concentraciones iniciales de CO₂ de 0, 30 y 60 %, respectivamente.

La densidad de crecimiento fue otro parámetro que resultó de importancia para poder evaluar el crecimiento en función al contenido de CO₂ en el ambiente. En la Tabla 4.7 se presenta la comparación de medias de la densidad de crecimiento en relación al porcentaje de CO₂. Las densidades de crecimiento presentadas en esta Tabla son las correspondientes al tiempo final del experimento. En este caso la densidad de crecimiento en el control no fue estimada.

Tabla 4.7. Comparación de medias de la variable densidad de crecimiento en función al porcentaje de CO₂.

| CEPA | % DE CO ₂ INICIAL | ρ_x PROMEDIO (mg/cm ³) | * |
|----------------------|------------------------------|---|---|
| <i>S. granulatus</i> | 0 | 3.020 | C |
| | 30 | 6.590 | B |
| | 60 | 11.770 | A |
| <i>P. tinctorius</i> | 0 | 1.799 | B |
| | 30 | 3.187 | A |
| | 60 | 0 | C |
| <i>G. fujikuroi</i> | 0 | 0.653 | B |
| | 30 | 1.591 | A |
| | 60 | 0.442 | C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

En la Tabla 4.7 puede verse que en las tres cepas al aumentar el % de CO₂ inicial, aumenta significativamente la densidad de crecimiento, con excepción del nivel de 60 % de CO₂ para *P. tinctorius* y *G. fujikuroi*, en donde se observó una disminución significativa en ρ_x . Para el caso de la cepa *P. tinctorius* no se observó crecimiento en la atmósfera con 60 % de CO₂ inicial. En la Figura 4.7 se ilustra esta respuesta.

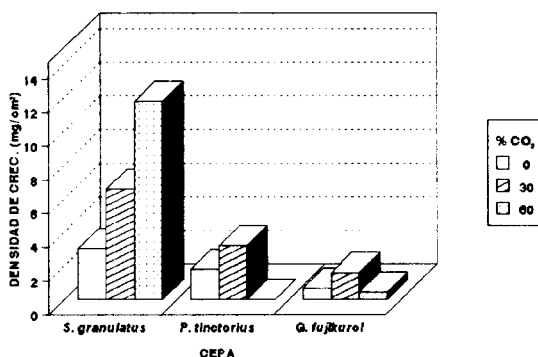


Figura 4.7. Efecto de el porcentaje de CO₂: 0, 30 y 60 % en la densidad de crecimiento para *S. granulatus*, *P. tinctorius* y *G. fujikuroi*. En las ordenadas se muestra la densidad de crecimiento. A la derecha de la gráfica se muestran los niveles de CO₂ inicial.

Para la cepa de *S. granulatus* puede apreciarse que la densidad de crecimiento tiene un aumento de casi el doble a medida que el CO₂ aumenta. En las cepas *P. tinctorius* y *G. fujikuroi* ocurre lo mismo pero a menor escala, alcanzándose en *P. tinctorius* un valor máximo de biomasa de 3.187 mg/cm² y en *G. fujikuroi* de 1.592 mg/cm² a 30 % de CO₂, a diferencia del valor máximo de biomasa (11.77 mg/cm²) que alcanza la cepa *S. granulatus* a 60 % de CO₂.

4.4.1. Evolución de CO₂

Otro parámetro que se estimó en este experimento fue la evolución de bióxido de carbono durante el tiempo de incubación. En las Figuras 4.8 y 4.9 se muestra la evolución de CO₂ en el tiempo (medido por cromatografía de gases) para las cepas *P. tinctorius* y *G. fujikuroi*. Las cinéticas de CO₂ solamente fueron corridas para estas dos cepas.

En la Figura 4.8, puede observarse que para el 0 % inicial de CO₂ este aumenta casi un 15 % por efecto del metabolismo del hongo. Para la cinética de 22.5 % de CO₂ inicial, el contenido del gas aumenta un poco menos de 10 %. Para la cinética de CO₂ con un porcentaje inicial de 60, no se observan cambios en el contenido del gas debido a que no hubo crecimiento del hongo.

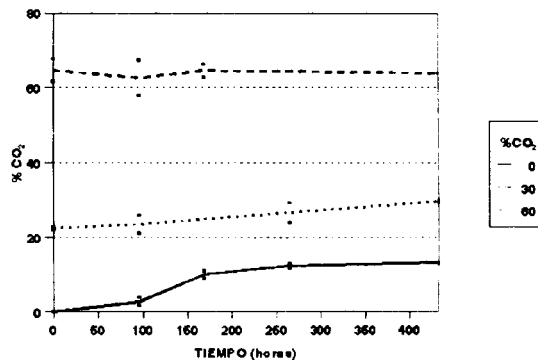


Figura 4.8. Cinética de CO₂ en función al tiempo de incubación de la cepa *P. tinctorius*. Se grafica en las abscisas el tiempo de incubación contra el % de CO₂ en las ordenadas. A la derecha se indica el porcentaje inicial (teórico) de bióxido de carbono. Las líneas verticales muestran la desviación estándar.

En la Figura 4.9 puede observarse que es lo que pasa con el contenido de bióxido de carbono a través del tiempo para la cepa *G. fujikuroi*.

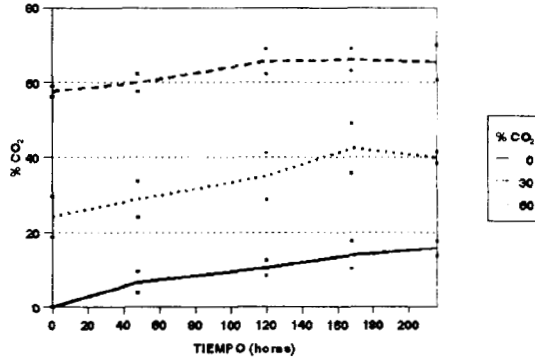


Figura 4.9. Evolución del bióxido de carbono en función del tiempo para la cepa *G. fujikuroi*. En las abscisas se muestra el tiempo de incubación de la cepa y en las ordenadas el porcentaje de CO₂. A la derecha se indica el % de CO₂ teórico inicial. Las líneas verticales muestran la desviación estándar de las mediciones del gas.

De acuerdo con la Figura 4.9 puede observarse que para un 0 % inicial de CO₂, este aumenta aproximadamente un 15 %. Para un 25 % de CO₂, el gas aumenta casi en 15 unidades como efecto del metabolismo del hongo y finalmente para 60 % el porcentaje se ve aumentado casi en cinco unidades.

CONCLUSIONES

Para este caso, al igual que para el estudio de la A_w , se observó una tendencia general en el crecimiento de las tres cepas estudiadas: a medida que el factor de estrés fue aumentado (en este caso la concentración de CO₂) la VCR disminuyó y la densidad de crecimiento aumentó. Sin embargo en el caso de la cepa de *G. fujikuroi* se observó un aumento estadísticamente significativo en la densidad de crecimiento al nivel de 30 % de CO₂ inicial con respecto a 0 y 60 % y una disminución en dicha variable con 60 % de CO₂ inicial.

En general, se ha observado que al aumentar una condición de estrés a la que son sometidas las cepas estudiadas provoca tendencias generales tanto en la VCR como en ρ_x . En todos los casos se pudo ver que, al aumentar la condición de estrés la VCR se ve disminuida y la ρ_x aumentada.

4.5. ANALISIS DE RCV POR CROMATOGRAFIA

Existen diversos métodos fisicoquímicos para el análisis cuantitativo de los reguladores de crecimiento vegetal, dentro de los mas utilizados se encuentran las siguientes técnicas: cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), con el uso de detectores UV principalmente; cromatografía de gases-espectrometría de masas, con el uso de detectores de ionización de flama; cromatografía de capa fina; cromatografía gas-líquido, entre otros (Brenner, 1981; Crozier y col., 1980; Linskens y col., 1987; Shindy y col., 1975).

Recientes investigaciones en cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) han demostrado que esta técnica resulta muy adecuada para el análisis de reguladores de crecimiento vegetal en general, y particularmente para giberelinas (Linskens y col., 1987).

Por la razón anterior es que se decidió montar una metodología para la detección de RCV con el uso de HPLC, sin embargo existe una gran diversidad de soportes de columnas con diferente selectividad, que pueden ser empleadas con este fin. De acuerdo con lo anterior y con la idea de montar una metodología sencilla y rápida para el análisis de ácido indolacético y ácido giberélico se seleccionó una columna Spherisorb ODS (5 μ) con una fase móvil de buffer de fosfatos (Thibert, 1994).

4.5.1. Extracción de RCV del medio de cultivo

Anterior al análisis por métodos fisicoquímicos, es necesario hacer una extracción de la molécula de interés por medio de solventes orgánicos con el fin de concentrar dicha molécula. Sin embargo, la selección de un solvente apropiado para la extracción de RCV de tejidos, es uno de los aspectos mas confusos en el análisis de estas sustancias, además de que estos procedimientos a menudo son diseñados para la detección solo de las formas libres de los RCV. En los procesos de extracción debe tomarse en cuenta la alteración que puede ocurrir en la estructura del RCV en estado original durante el proceso. Esta alteración puede ser deberse a la hidrólisis, acción enzimática o derivatización química del compuesto original (Brenner, 1981). Para la detección de fracciones biológicamente activas durante los pasos de purificación, es necesario la utilización de los diversos bioensayos específicos para cada tipo de RCV (Reeve y Crozier, 1980).

Con el fin de extraer el ácido indolacético y el ácido giberélico del medio de cultivo en donde crecieron los hongos que los producen, el primero fue extraído con metanol (en proporción 1:1 v/v) durante 24 horas (Crozier, 1980; Ernstsén y col., 1986; Hemberg y Tillberg, 1980; Linskens y Jackson, 1987). Para el caso del ácido giberélico se utilizó acetato de etilo durante 24 horas (Barrios, 1994). En ambos casos, el porcentaje de recuperación fue de un 30 % del contenido inicial de RCV en el medio (determinado con curvas patrón con concentraciones conocidas).

Para el ácido giberélico también se probó el hexano (en proporción 1:1 v/v) como solvente de extracción, con el cual se obtuvo un 35 % de recuperación en la curva patrón, sin embargo al hacer el análisis de los medios de cultivo no se detectó la presencia de la molécula. Esta respuesta puede deberse a que el proceso de extracción es dependiente del pH del medio

en que se encuentra el RCV (Barrios, 1994). En el medio de cultivo utilizado en la curva patrón el pH fue de 6.2. Con seguridad el pH de los medios de cultivo en donde había crecido *G. fujikuroi* después de un cierto tiempo se encontraba más ácido que el inicial, lo cual sugiere que a este pH el acetato de etilo resultó ser un mejor agente de extracción.

En la Tabla 4.8 se presentan los solventes probados para la extracción del ácido giberélico y del ácido indolacético de los medios de cultivo patrón (con concentraciones conocidas), así como los porcentajes de recuperación obtenidos con cada solvente, determinados por HPLC.

Tabla 4.8. Porcentajes de recuperación del ácido indolacético y ácido giberélico con diferentes solventes

| RCV | SOLVENTE DE EXTRACCION | % RECUPERACION |
|-----------------|------------------------|----------------|
| AIA | Metanol | 30 |
| | Acetona | 12 |
| AG ₃ | Acetato de etilo | 40 |
| | Hexano | 30 |

La acetona no fue utilizada como solvente de extracción para el AIA debido al bajo porcentaje de recuperación detectado.

4.5.2. Análisis de RCV en medios de cultivo

Los medios de cultivo en donde crecieron los hongos productores de RCV con efecto de diferentes porcentajes de CO₂ fueron analizados por HPLC, con el objeto de tener una idea de que es lo que ocurre en la producción de RCV por efecto de la concentración de CO₂ en la atmósfera de crecimiento.

Para el caso de las cepas de *S. granulatus* y *P. tinctorius*, cepas productoras de ácido indolacético, no se detectó la presencia de dicha molécula en los diferentes medios de cultivo, lo cual no necesariamente implica que no lo producen, si no que probablemente las cantidades de AIA producidas fueron tan pequeñas que no se detectaron por esta técnica.

Con respecto a la cepa de *G. fujikuroi*, productora de ácido giberélico, se detectaron diferentes cantidades de este RCV en función al tiempo de incubación y al porcentaje de CO₂. En las Tablas 4.9 y 4.10 puede observarse el promedio de la cantidad de ácido giberélico presente en los diferentes medios de cultivo en función al tiempo de incubación y a la concentración de CO₂.

Resulta de importancia evaluar el contenido de AG₃ en el medio de cultivo en función al tiempo de incubación, ya que existen variaciones en relación a esta variable. Kumar y Lonsane (1987 y 1988) han reportado que la producción de esta molécula empieza alrededor de las 120 horas (5 días) de incubación, alcanzando valores máximos (1.4 mg/g de biomasa en peso seco) cerca de las 192 horas, y detectándose finalmente inhibición por sustrato (incluso en fermentación sólida) en la formación de ácido giberélico.

Tabla 4.9. Comparación de medias de la concentración de ácido giberélico presente en el medio de cultivo en función de el tiempo de incubación.

| TIEMPO DE INCUB. (horas) | AG ₃ (mg/L) | * |
|-----------------------------|---------------------------|---|
| 48 | 0.000 | D |
| 120 | 1.990 | C |
| 168 | 4.110 | B |
| 216 | 5.000 | A |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey)

Tabla 4.10. Comparación de medias de la concentración de ácido giberélico en los medios de cultivo en función al porcentaje de CO₂.

| % CO ₂ | AG ₃ (mg/L) | * |
|-------------------|---------------------------|---|
| 0 | 2.596 | B |
| 30 | 4.336 | A |
| 60 | 1.393 | C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey)

En las Tablas 4.9 y 4.10 se presentan los análisis de varianza realizados para determinar el efecto que provoca el tiempo de incubación y la concentración de CO₂ en el contenido de ácido giberélico en los medios de cultivo en donde creció la cepa de *G. fujikuroi*. Puede verse que el contenido mas alto de ácido giberélico en el medio de cultivo se detectó a las 216 horas de incubación y existe una diferencia significativa con respecto a los demás tiempos de incubación. Con respecto a los tratamientos en función al porcentaje de CO₂ existen diferencias significativas entre estos, detectándose una mayor cantidad de ácido giberélico en los medios en los que creció *G. fujikuroi* con un 30 % de CO₂ con un tiempo de incubación de 216 horas.

En la Tabla 4.11 se presentan los promedios de la concentración de ácido giberélico en función al tiempo de incubación así como al porcentaje de CO₂ (análisis estadístico global).

Tabla 4.11. Efecto del tiempo de incubación en la concentración de ácido giberélico en función al porcentaje de CO₂.

| % CO ₂ | TIEMPO DE INCUB. (horas) | AG ₃ (mg/L) | * |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------|---|
| 0 | 48 | 0 | B |
| | 120 | 2.670 | A |
| | 168 | 4.056 | A |
| | 216 | 3.658 | A |
| 30 | 48 | 0 | D |
| | 120 | 3.301 | C |
| | 168 | 5.619 | B |
| | 216 | 8.426 | A |
| 60 | 48 | 0 | B |
| | 120 | 0 | B |
| | 168 | 2.655 | A |
| | 216 | 2.915 | A |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$))

Como puede verse en la Tabla 4.11, para el tratamiento con 0 % inicial de CO₂ no existen diferencias significativas en la concentración de ácido giberélico en función al tiempo de incubación. Para el tratamiento con 30 % inicial de CO₂ se observan diferencias en el contenido de AG₃ en función del tiempo de incubación, detectándose una mayor concentración a las 216 horas. Con 60 % inicial de CO₂ no se observaron diferencias significativas en el contenido de AG₃ a las 216 y 168 horas de incubación. En todos los casos a las 48 horas de incubación no se detectó la presencia de ácido giberélico. En la Figura 4.10 se muestran las curvas de producción de ácido giberélico por *G. fujikuroi* en función al tiempo de incubación y al contenido inicial de CO₂.

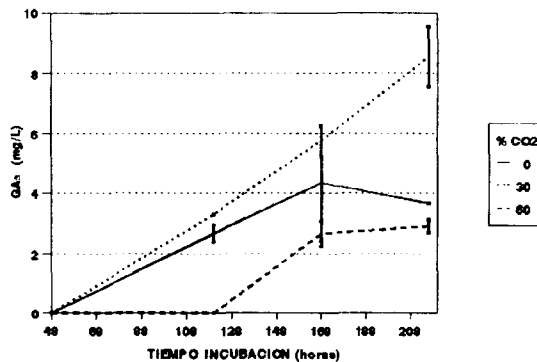


Figura 4.10. Efecto del tiempo de incubación y el contenido de CO₂ en la producción de ácido giberélico por *G. fujikuroi*. Se muestra en las abcisas el tiempo de incubación de *G. fujikuroi* en el medio de cultivo (en horas), y en las ordenadas la concentración de AG₃ (mg/L). Las líneas verticales muestran la desviación estándar.

Como se observa en la Figura 4.10, para 30 % inicial de CO₂ el aumento de la concentración de ácido giberélico es lineal en función al tiempo de incubación, y es en donde se presentan las concentraciones mas altas de este compuesto, alcanzando casi los 10 mg/L a las 216 horas. Para el caso de 0 y 60 % de CO₂, puede verse que a las 216 horas de incubación, la concentración de ácido giberélico permanece casi constante, alrededor de los 3 mg/L, y es significativamente menor que para 30 %, en este sentido podría pensarse en una inhibición por sustrato en la formación de AG₃ (cerca de las 168 horas), tal y como lo reportan Kumar y Lonsane (1987).

Con relación al contenido de AG₃ en los medios de cultivo en donde ha crecido *G. fujikuroi*, se han reportado concentraciones que van desde los 40-60 mg/L (en cultivo superficial, al inicio de la explotación industrial del hongo) hasta 2 g/L (con el uso de mutantes y aceite de girasol como única fuente de carbono), dependiendo de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y las condiciones de cultivo (Brückner y Blechschmidt, 1986).

Finalmente, aunque se detectaron bajas concentraciones de AG₃ en relación a los reportes citados, puede ser posible aumentar este rendimiento cambiando la fuente de carbono,

de nitrógeno o bien, las condiciones de cultivo. Sin embargo se ha observado que el contenido de cierto nivel de CO₂ en la atmósfera resulta positivo para la producción de este regulador.

CONCLUSIONES

Para las dos cepas reportadas como productoras de ácido indolacético (*P. tinctorius* y *S. granulatus*) no se detectó la presencia del compuesto con el uso de la técnica de HPLC. Este resultado no necesariamente indica que la molécula no se haya presente en el medio, sino que puede encontrarse en concentraciones tan pequeñas que no resultan detectables por HPLC, debido a esta razón es que resulta de gran importancia contar con una metodología de bioensayos, ya que por este método si es posible detectar concentraciones menores a 0.5 mg/L (por HPLC solo se detectan concentraciones mayores a esta).

Para la cepa de *G. fujikuroi* se encontraron cantidades de ácido giberélico que pudieron ser detectadas por medio del uso de HPLC. De acuerdo a los resultados obtenidos, puede decirse que un cierto porcentaje inicial de CO₂ en la atmósfera de crecimiento del hongo, afecta de manera positiva la producción de ácido giberélico por la cepa RE11 de *Gibberella fujikuroi*.

4.6. BIOENSAYOS

Los bioensayos son pruebas realizadas sobre organismos vivos con el fin de detectar la presencia de moléculas biológicamente activas que causan algún efecto sobre estos.

El objetivo principal de esta parte del trabajo fue el desarrollo de un método sencillo, rápido y sensible a pequeñas concentraciones de RCV con el uso de bioensayos, con el fin de detectar la presencia de moléculas biológicamente activas en un medio de cultivo dado sin tener la necesidad de purificar. Para esto, dos tipos de bioensayos fueron empleados: los bioensayos con semillas y los bioensayos con microorganismos. Los bioensayos tienen varias ventajas sobre los métodos de detección fisicoquímicos, entre las que destaca que con el uso de bioensayos es posible detectar concentraciones muy pequeñas (menores a 0.5 mg/L) de RCV, lo cual no puede hacerse por métodos cromatográficos.

Los bioensayos han jugado un papel esencial en el descubrimiento e identificación de los RCV, sin embargo no pueden usarse como un método infalible para el análisis de estas moléculas. La mayoría de los bioensayos tienen amplias curvas de respuesta, que generalmente cubren diferentes ordenes de magnitud, además de que la varianza asociada a este rango de respuestas es proporcional a la respuesta. Esto, aunado al hecho de que sus curvas de respuesta a concentraciones log-lineal, hace imposible determinar pequeñas diferencias en las cantidades de RCV entre muestras (Brenner, 1981).

Por otra parte, existe la ventaja de que los bioensayos tienen gran sensibilidad y especificidad en ciertas partes de una planta (o bien mutantes genéticos deficientes en ciertas hormonas) a los diferentes reguladores de crecimiento. Ayudan a establecer la presencia de una clase dada de RCV, pero no pueden ser usados para identificar un compuesto específico. (Brenner, 1981; Salisbury y Ross, 1992).

Existe una gran cantidad de ensayos para la detección de RCV (Audus, 1972), sin embargo la gran mayoría de estos requieren de un gran esfuerzo en la preparación de materiales, además de ser lentos y complicados, por esta razón surge entonces la necesidad de contar con un método que requiera de poco esfuerzo, que sea sensible y rápido.

4.6.1. Bioensayos con semillas de alfalfa (*Medicago sativa*)

4.6.1.1. Acido indolacético

Uno de los métodos de detección para las auxinas, es el uso del efecto de estas en la elongación de las raíces. Concentraciones de auxinas que estimulan el crecimiento de coleoptilos, inhiben el de las raíces, pero a muy pequeñas concentraciones (alrededor de 1 parte en 10^{11}) a veces se detecta una ligera estimulación. Ciertas especies de semilla pequeña (lino, lenteja, trigo, etc.) son material adecuado para este bioensayo. Con el crecimiento de semillas seleccionadas, por cortos periodos de tiempo en un rango de concentraciones de AIA, puede construirse una curva para de esta manera relacionar el crecimiento a la concentración de la hormona. Esta curva puede cubrir un amplio rango de concentraciones desde el crecimiento óptimo con 1 parte en 10^{11} hasta la completa inhibición con 1 parte en 10^6 . La ventaja de esta

prueba sobre otras, es que el estímulo en el crecimiento puede obtenerse a concentraciones tan pequeñas como una parte en 10^{11} o 10^{12} , además de que no es necesario tener un control estricto sobre la intensidad de luz (Audus, 1972).

A. Curvas estándar para la detección de AIA

De acuerdo con lo citado anteriormente, para llevar a cabo este tipo de bioensayo se utilizaron semillas de alfalfa debido a que cumplen con la característica mencionada, además de tener un tiempo corto de germinación, y un crecimiento más rápido que otras especies de semilla pequeña.

La razón de realizar curvas estándar con concentraciones conocidas de RCV es que esto posteriormente hace posible interpolar en la curva de respuesta obtenida, datos observados en semillas crecidas en un medio dado para así evaluar la presencia de un RCV.

De esta manera, se realizó una cinética para determinar a que tiempo existía una mayor respuesta en la longitud de raíz por efecto de la concentración del ácido indolacético en esta especie. El método mostró una mayor sensibilidad a los 13 días de incubación a temperatura ambiente. En la Tabla 4.12 se presenta la comparación de medias de los tratamientos en relación a la concentración de AIA con el uso de una prueba de Tukey, puede observarse que si existe una diferencia significativa en la longitud de raíz.

Tabla 4.12. Comparación de medias de la variable longitud de raíz en función a la concentración de ácido indolacético.

| CONCENTRACION DE AIA (mg/L) | LONGITUD DE RAIZ (mm) | * |
|-----------------------------|-----------------------|-----|
| 0 | 65.000 | A |
| 0.1 | 45.667 | B |
| 0.5 | 27.330 | C |
| 1 | 26.000 | C D |
| 5 | 14.000 | D |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha=0.05$

En la Figura 4.11 se observa que el ácido indolacético inhibe significativamente el crecimiento de la raíz en la alfalfa, de esta manera al aumentar la concentración del RCV, se percibe una disminución en dicha variable, de lo cual puede decirse tal como lo reporta Audus (1972) para otras especies de semillas pequeñas, en esta especie también se percibe una inhibición en la longitud de raíz como efecto del AIA. Es importante destacar que a concentraciones menores a 0.5 mg/L se observa un efecto muy marcado del AIA en la elongación de raíces.

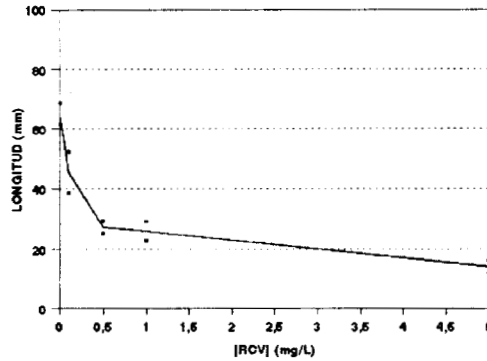


Figura 4.11. Efecto del ácido indolacético sobre el crecimiento de las raíces a los trece días de incubación. Se grafica en las abscisas la concentración del AIA: 0, 0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L, y en las ordenadas la longitud de la raíz. Los símbolos arriba y abajo de la línea muestran la desviación estándar.

Otras variables que también presentaron diferencias significativas por efecto de la concentración de AIA fueron el porcentaje de germinación y el número de raíces secundarias, observándose en ambos casos que a medida que la concentración de AIA aumenta, ambas variables se ven inhibidas significativamente (Tablas 4.15 y 4.16).

Tabla 4.13. Efecto de la concentración de AIA en el porcentaje de germinación de semillas de alfalfa a los cinco días de incubación

| CONCENTRACION DE AIA (mg/L) | % DE GERMINACION | * |
|-----------------------------|------------------|---|
| 0 | 88.80 | A |
| 0.1 | 82.80 | B |
| 0.5 | 75.00 | C |
| 1 | 77.50 | C |
| 5 | 62.80 | D |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha = 0.05$

Como puede observarse en la Figura 4.12 el ácido indolacético provoca un efecto inhibitorio en el porcentaje de germinación de las semillas de alfalfa, disminuyendo hasta un 25 % el porcentaje de germinación observado a los 5 mg/L de AIA con respecto al testigo que no contiene dicho compuesto.

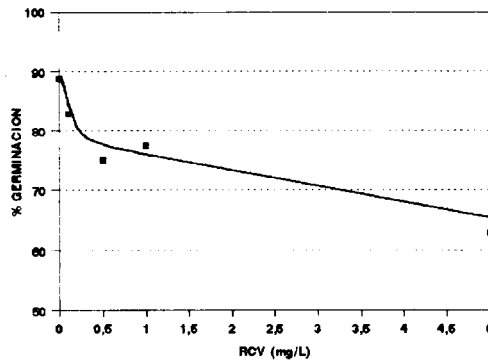


Figura 4.12. Efecto de la concentración de ácido indolacético en el porcentaje de germinación de semillas de alfalfa a los 5 días de incubación. El porcentaje fue tomado de un total de 40 semillas por cada tratamiento.

La medición de este tipo de variable resulta importante, ya que es posible obtener una respuesta a la concentración de AIA a los cinco días de incubación, lo que significa una prueba relativamente rápida (en comparación con la mayoría de los bioensayos) para la detección de esta molécula. En la Figura 4.12 puede observarse que en el control, el porcentaje de germinación alcanza casi hasta un 90 % de germinación, valor que va disminuyendo conforme la concentración de AIA aumenta, hasta llegar a un porcentaje de poco más del 60 % a una concentración de 5 mg/L de AIA.

En el número de raíces secundarias también se observó una disminución significativa a medida que la concentración de AIA fue aumentada, en este caso se detectó una mayor respuesta a la presencia de este regulador a los 18 días de incubación (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Efecto de la concentración del AIA en el número de raíces secundarias a los 20 días de incubación.

| CONCENTRACION DE AIA (mg/L) | No. PROMEDIO DE RAICES SECUNDARIAS | * |
|-----------------------------|------------------------------------|-------|
| 0 | 7.333 | A |
| 0.1 | 5.667 | A B |
| 0.5 | 5.333 | C A B |
| 1 | 3.667 | C B |
| 5 | 3.333 | C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha= 0.05$

En la Figura 4.13 se muestra el efecto que provoca la concentración de AIA sobre la formación de raíces secundarias en la alfalfa.

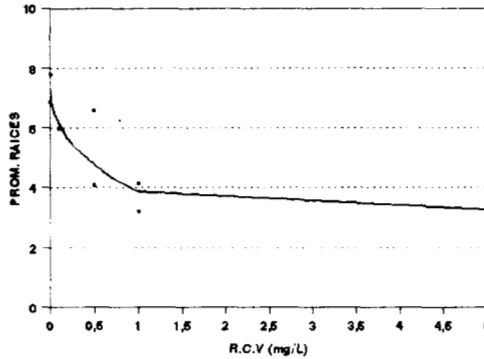


Figura 4.13. Efecto de la concentración de ácido indolacético en la formación de raíces secundarias en alfalfa. En la gráfica se muestra la tendencia de los datos.

Para este último caso, a pesar de que existe una respuesta significativa por efecto de la concentración de AIA, el tiempo de respuesta resulta ser muy largo comparado con las dos variables anteriores. También cabe destacar que el efecto más marcado del AIA sobre esta variable se observa a concentraciones menores a 1 mg/L.

Con respecto al resto de las variables estudiadas (número de hojas y peso de la planta), no se observaron diferencias significativas con respecto a los diferentes tratamientos, además de ser variables de respuesta que requieren de mayor tiempo para la obtención de resultados. Cabe mencionar que los resultados presentados fueron en los que se observó una mayor sensibilidad al ácido indolacético.

B. Respuesta en las semillas de alfalfa crecidas en el medio de *P. tinctorius*

Se realizaron regresiones estadísticas de las curvas correspondientes a la longitud de raíz, porcentaje de germinación y número de raíces secundarias, para de esta manera interpolar en estas los datos obtenidos en las semillas de alfalfa que se desarrollaron en los medios en donde creció *P. tinctorius* con diferentes atmósferas iniciales de CO_2 y a diferentes tiempos de incubación. Para cada caso se interpolaron los datos de crecimiento al tiempo en que la curva estándar mostró la mayor diferencia entre tratamientos.

De esta manera, se obtuvieron tres ecuaciones que describen el efecto del AG_3 sobre cada variable a un tiempo dado, en la Tabla 4.15 se muestra la ecuación obtenida para cada variable.

Tabla 4.15. Ecuaciones obtenidas para las 3 variables evaluadas sobre las semillas de alfalfa. Se muestran también los tiempos de respuesta para cada caso.

| VARIABLE | TIEMPO DE RESPUESTA (días) | MODELO DE REGRESION | R ² |
|---------------------------|----------------------------|--|----------------|
| Longitud de raíz | 13 | LR = 65.143 + 6.723 C - 48.169 C ^{0.35} | 0.9419 |
| % de germinación | 5 | % G = 88.612 - 13.991 C ^{0.37} | 0.9568 |
| No. de raíces secundarias | 18 | NRS = 7.362 - 2.953 C ^{0.22} | 0.7463 |

LR = longitud de raíz; % G = % de germinación; NRS = número de raíces secundarias; C = concentración.

Este método permitió evaluar la concentración de AIA presente en los extractos obtenidos de los medios de cultivo en donde creció *P. tinctorius* con el uso de tres variables diferentes en el desarrollo de la alfalfa (la metodología seguida se describe en el capítulo de materiales y métodos): 1) en lo que se refiere a la variable longitud de raíz se detectaron concentraciones no mayores a 0.8 mg/L, observándose la mayor concentración a las 264 horas de incubación del medio con 0 % de CO₂ inicial. 2) Con respecto al porcentaje de germinación, no se detectó la presencia de la molécula en ninguno de los medios a excepción del que se incubó durante 406 horas con un 30 % de CO₂ inicial, la concentración estimada fue de cerca de 0.1 mg/L 3) Finalmente al evaluar la concentración de AIA por su efecto en la formación de raíces secundarias se observaron concentraciones de cerca de 6 mg/L de AIA para los medios incubados por 264 y 406 horas con un 30 % de CO₂ inicial (5.9 mg/L de AIA) y para el medio incubado por 264 horas con 0 % de CO₂.

Aunque resulta complicado interpretar este tipo de resultados, existe una respuesta que resulta consistente: con el uso de cada uno de los modelos de regresión (de las tres variables) se logró detectar la presencia del AIA en el medio incubado por 406 horas con 30 % de CO₂. Otro de los medios en los que se detectó la presencia de AIA por este método (para el número de raíces secundarias y para la longitud de raíz) fue el medio con 0 % de CO₂ inicial incubado durante 264 horas.

4.6.1.2. Acido giberélico

Las giberelinas bajo ciertas condiciones, provocan una pequeña influencia sobre la elongación de secciones de coleoptilos, y esto hace un bioensayo relativamente específico hacia dicho compuesto (Salisbury y Ross, 1991).

Las semillas en buen estado son mucho más sensibles a la aplicación de giberelinas comparado con el efecto en órganos aislados (las giberelinas inducen la germinación de semillas (Davies, 1987)), de esta manera han servido como material apropiado para bioensayos. Semillas de diferentes especies (maíz, chícharo, entre otras) han sido utilizadas para llevar a cabo este tipo de bioensayos, en las cuales se han observado respuestas en la elongación de epicotilos (lechuga) e hipocotilos (chícharo), además del efecto en la germinación (Audus, 1972).

A. Curvas estándar para la detección de AG₃

Al igual que para el caso de ácido indolacético, se corrió una cinética con semillas de alfalfa para determinar a que tiempo se observa un mayor efecto de las diferentes concentraciones de ácido giberélico sobre la longitud de raíz. En este caso el mayor efecto en la longitud de la raíz se presentó a los 7 días de incubación, en la Tabla 4.16 se muestra la comparación de medias de la longitud de raíz en función a la concentración de ácido giberélico.

Tabla 4.16. Comparación de medias de la longitud de raíz en función a la concentración de ácido giberélico

| CONCENTRACION DE AG ₃ (mg/L) | LONGITUD DE RAIZ (mm) | * |
|--|--------------------------|-----|
| 0 | 33.333 | C |
| 0.1 | 56.333 | B |
| 0.5 | 50.667 | B C |
| 1 | 81.667 | A |
| 5 | 49.333 | B C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha = 0.05$

En la Tabla 4.16 puede observarse que existe una diferencia significativa en las medias de la longitud de la raíz a los diferentes niveles de concentración de ácido giberélico, la concentración que provoca una mayor elongación en la raíz es 1 mg/L, no existe una diferencia significativa en la longitud de raíz entre 0.1, 0.5 y 5 mg/L, sin embargo si existen diferencias al comparar los diferentes tratamientos con un testigo sin ácido giberélico (la longitud en el testigo resulta menor). En la Figura 4.14 se observa el efecto de la concentración de ácido giberélico sobre la elongación de la raíz en la alfalfa.

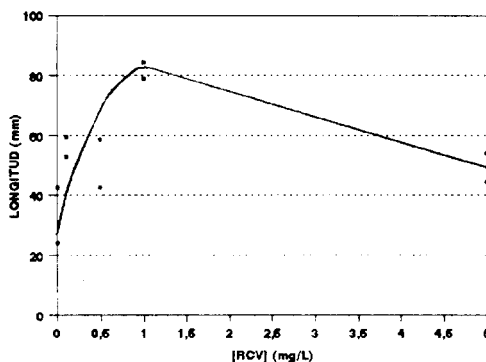


Figura 4.14 Efecto de la concentración de ácido giberélico sobre el crecimiento de la raíz de alfalfa a los 6 días de incubación. Se grafica en las abscisas la concentración de AG₃: 0, 0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L, y en las ordenadas la longitud de raíz en mm.

De acuerdo con la Figura 4.14 puede decirse que el ácido giberélico en concentraciones menores a 1 mg/L estimula significativamente la elongación de las raíces en la planta de alfalfa.

Además del efecto en la longitud de la raíz, fueron probadas otras variables de respuesta como son: % de germinación, longitud de tallo, número de raíces secundarias y número de hojas, de las cuales la única que resultó tener una respuesta con diferencias significativas al efecto del ácido giberélico fue el número de raíces secundarias. En la Tabla 4.17 se comparan las medias de esta variable.

Tabla 4.17. Comparación de medias del número de raíces secundarias en función a la concentración de ácido giberélico a los trece días.

| CONCENTRACION DE AG ₃ (mg/L) | NUMERO DE RAICES SECUNDARIAS | * |
|--|---------------------------------|-----|
| 0 | 3.667 | B |
| 0.1 | 8.000 | A |
| 0.5 | 4.667 | B |
| 1 | 2.333 | B C |
| 5 | 0.667 | C |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha=0.05$

Como puede observarse en la Tabla 4.17 el ácido giberélico tiene un efecto significativo en la formación de raíces secundarias en las semillas de alfalfa, observándose el mayor número de raíces a una concentración de 0.1 mg/L de AG₃, valor que presenta diferencias significativas en comparación con el resto de concentraciones ensayadas. En la Figura 4.15 se presenta el efecto que provoca este regulador en la formación de raíces secundarias.

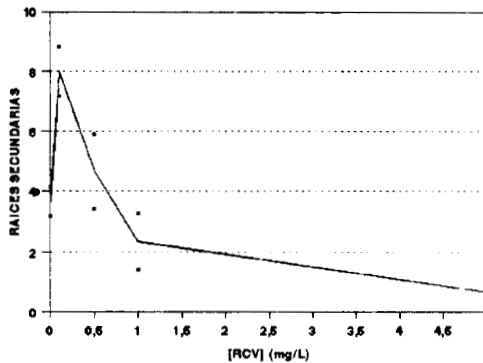


Figura 4.15. Efecto de la concentración de ácido giberélico sobre la formación de raíces secundarias en alfalfa a los 13 días de incubación. Se grafica en las abscisas la concentración de AG₃, y en las ordenadas el número de raíces secundarias.

Como puede apreciarse en la Figura 4.15 a pequeñas concentraciones de ácido giberélico existe un estímulo en la formación de raíces secundarias, pero al aumentar la concentración de este, el número de raíces secundarias disminuye en comparación con el testigo sin AG₃, lo cual coincide con lo que se ha reportado acerca de la inhibición de la organogénesis por la aplicación exógena de este regulador (Villalobos, 1991).

B. Respuesta en las semillas de alfalfa crecidas en el medio de *G. fujikuroi*

Para este caso se obtuvieron dos ecuaciones que describen el efecto de la concentración del ácido giberélico sobre la longitud de raíces y la formación de raíces secundarias. En la Tabla 4.18 se observan dichas ecuaciones y el tiempo de respuesta para cada caso. En todos los casos se tomaron las ecuaciones con las que se obtuvieron los coeficientes de correlación mas altos.

Tabla 4.18. Ecuaciones obtenidas para la longitud de raíz y número de raíces secundarias sobre las semillas de alfalfa.

| VARIABLE | TIEMPO DE RESPUESTA (días) | MODELO DE REGRESION | R ² |
|---------------------------|----------------------------|---|----------------|
| Longitud de raíz | 6 | LR = 33.522 + 81.668 C ^{0.5} - 33.366 C | 0.9025 |
| No. de raíces secundarias | 13 | NRS = 3.66 - 70.98 C + 5.718 C ^{0.001} + 63.88 C ^{1.05} | 0.8948 |

LR = longitud de raíz; NRS = número de raíces secundarias; C = concentración de AG₃.

Con respecto a la longitud de raíces, a los 6 días de incubación, la longitud de raíz de las semillas en todos los medios probados estuvo muy por debajo de los que se presentaron en la curva estándar, de manera que no fue posible interpolarlos en la curva obtenida por regresión. Por otra parte, en todos los medios en donde creció *G. fujikuroi* y después se colocaron las semillas de alfalfa, no se observó formación de raíces secundarias.

Esta respuesta puede deberse a que *G. fujikuroi* es un hongo que produce una serie de metabolitos, además del ácido giberélico, que pueden intervenir de diferentes maneras en el crecimiento vegetal. Por ejemplo, Miersch y col. (1993) reportan la producción de ácido jasmónico por *G. fujikuroi*, el cual provoca respuestas tales como inhibición de la germinación y otras respuestas propias del ácido abscísico. Otros metabolitos producidos por este hongo son la bikaverina y otras gibberelinas menos potentes que el AG₃ (AG₄ principalmente) (Brückner y Blechschmidt, 1986; Jones y Pharis, 1987).

4.6.2. Bioensayos con microorganismos

La mayoría de métodos de bioensayos para fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal se basan en la medición de respuestas en el crecimiento de plantas superiores, sin embargo en dicha técnica existen grandes variaciones en los resultados obtenidos (Barea, 1974). Por esta razón se intentó montar una técnica para la detección de RCV con el uso de microorganismos, ya que debido a la homogeneidad en las poblaciones microbianas y a su rápido crecimiento puede obtenerse una variación menor en los resultados y una respuesta en 24 horas.

Varios autores han obtenido diversas respuestas en el crecimiento de algunos microorganismos por el efecto del ácido indolacético, ácido giberélico y cinetina. Miller (1963), reporta que la cinetina estimula el crecimiento de *E. coli* así como de algunas levaduras. Por su parte, Kennell (1960) también reporta efectos de la cinetina y ácido indolacético en el crecimiento de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Barea (1973), estudió el efecto de los tres reguladores de crecimiento vegetal sobre varias cepas de *S. cerevisiae*, encontrando también efectos en el crecimiento de algunas de estas. Sin embargo también se ha reportado que diferentes cepas de una misma especie no necesariamente responden de la misma manera a los RCV.

En el presente trabajo se estudió el efecto del ácido indolacético y el ácido giberélico sobre el crecimiento de dos cepas de levaduras: *S. castellii* y *S. cerevisiae*, y de dos bacterias: *E. coli* y *B. subtilis*.

4.6.2.1. Bioensayos con levaduras

De las dos levaduras estudiadas, solamente *S. castellii* mostró una respuesta en su crecimiento (cuantificado en unidades de absorbancia) por efecto de la concentración del ácido indolacético, con el ácido giberélico no se perciben diferencias significativas en el crecimiento de este microorganismo. Para el caso de la cepa de *S. cerevisiae* no hubo diferencias significativas en el crecimiento por efecto de la concentración de ninguno de los RCV probados. En la Tabla 4.19 se muestra la comparación de medias de la absorbancia (crecimiento) en función a la concentración del ácido indolacético, para la cepa de *S. castellii*.

Tabla 4.19. Comparación de medias del crecimiento de *S. castellii* (expresado en unidades de absorbancia) por efecto de la concentración del AIA y AG₃

| CONCENTRACION DE AIA (mg/L) | CRECIMIENTO (Absorbancia) | * | CONCENTRACION DE AG ₃ (mg/L) | CRECIMIENTO (Absorbancia) | * |
|-----------------------------|---------------------------|-----|---|---------------------------|---|
| 0 | 0.5550 | A B | 0 | 0.5550 | A |
| 0.2 | 0.6435 | A | 0.2 | 0.5405 | A |
| 0.6 | 0.4700 | B | 0.6 | 0.5680 | A |
| 1 | 0.4615 | B | 1 | 0.5230 | A |
| 3 | 0.4795 | B | 3 | 0.5380 | A |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha = 0.05$

Puede observarse que existe un estímulo en el crecimiento de *S. castellii* a bajas concentraciones (menores de 0.2 mg/L) de ácido indolacético, sin embargo, al aumentar la concentración ya no se detecta ninguna diferencia significativa en dicha variable. En la Figura 4.16 puede observarse la curva que representa esta respuesta.

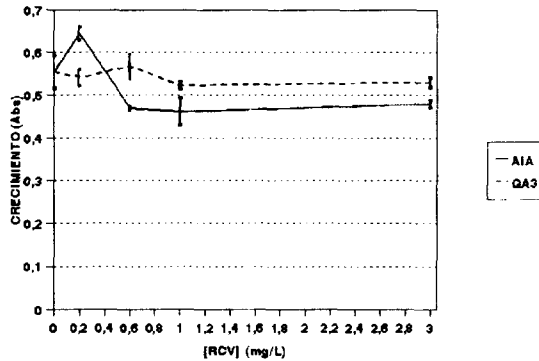


Figura 4.16. Efecto del ácido indolacético (—) y ácido giberélico (---) sobre el crecimiento de *S. castellii*. En las abscisas se gráfica la concentración del RCV y en las ordenadas el crecimiento en unidades de absorbancia. Se indican las desviaciones estándar con una línea vertical.

4.6.2.2. Bioensayos con bacterias

De las dos bacterias estudiadas solamente *B. subtilis* mostró una diferencia significativa en el crecimiento como efecto de las diferentes concentraciones de ácido giberélico. Para la cepa de *E. coli* no se detectó ninguna diferencia significativa en el crecimiento como respuesta a los RCV.

En la Tabla 4.20 se muestra la comparación de medias de los tratamientos en relación a la variable absorbancia (crecimiento) para *B. subtilis*.

Tabla 4.20. Comparación de medias del crecimiento de *B. subtilis* (expresado en unidades de absorbancia) por efecto de la concentración del AIA y AG₃.

| CONCENTRACION DE AIA (mg/L) | CRECIMIENTO (Absorbancia) | * | CONCENTRACION DE AG ₃ (mg/L) | CRECIMIENTO (Absorbancia) | * |
|-----------------------------|---------------------------|---|---|---------------------------|---|
| 0 | 0.2200 | A | 0 | 0.2200 | B |
| 0.6 | 0.3770 | A | 0.6 | 0.3920 | A |
| 1 | 0.3815 | A | 1 | 0.4260 | A |
| 3 | 0.3025 | A | 3 | 0.2415 | B |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, a un $\alpha = 0.05$

De acuerdo con la Tabla 4.20 se observa que el crecimiento de *B. subtilis* es estimulado marcadamente a concentraciones menores a 1 mg/L de ácido giberélico, y que existen diferencias significativas en las absorbancias observadas a 0.6 y 1 mg/L de AG₃ en comparación con las absorbancias a 0 y 3 mg/L (Figura 4.17).

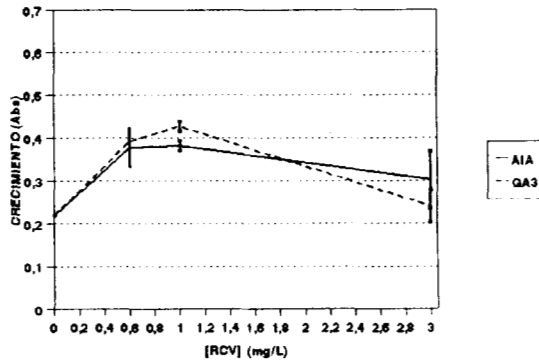


Figura 4.17. Efecto de la concentración de los ácidos indolacético (—) y giberélico (---) sobre el crecimiento de *B. subtilis*. Se grafica la concentración del RCV en las abscisas contra el crecimiento (absorbancia) en las ordenadas. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

En la Figura 4.17 puede observarse que existe un efecto de la concentración del AIA sobre el crecimiento de *B. subtilis*, sin embargo de acuerdo con el análisis estadístico esta diferencia no es significativa (a un nivel de significancia de 0.05). Para el ácido giberélico se observa que con pequeñas concentraciones (0.6 y 1 mg/l) existe un estímulo en el crecimiento del microorganismo.

CONCLUSIONES

Con respecto a los dos tipos de bioensayos evaluados es posible decir que pequeñas concentraciones (para la mayoría menores a 1 mg/L) de AIA y de AG₃, provocan una respuesta significativa tanto en las plantas de alfalfa como en las cepas usadas de *S. castellii* y *B. subtilis*. En ambos casos se observan diferencias marcadas entre las concentraciones menores a 1 mg/L probadas. Estas respuestas son de gran importancia debido a que por métodos fisicoquímicos no se detectan concentraciones menores a 0.5 mg/L.

Con respecto a los bioensayos con semillas de alfalfa, se detectó una respuesta inhibitoria significativa sobre la elongación de la raíz, el porcentaje de germinación y en la formación de raíces secundarias por efecto del ácido indolacético. Esta respuesta en el porcentaje de germinación resulta de interés debido a que por su corto tiempo de respuesta, esta prueba puede ser usada como un bioensayo relativamente rápido (aunque no específico para el AIA). El aumento de la concentración de AG₃ en el medio provocó un estímulo en la elongación de la raíz de alfalfa. También se observó un estímulo en la formación de raíces secundarias a concentraciones menores a 0.1 mg/L, pero al aumentar la concentración se detectó una disminución de estas con respecto al testigo. En general, se observan respuestas muy marcadas en las variables de respuesta por el efecto de concentraciones menores a 1 mg/L de AIA o de AG₃.

Fue posible analizar los medios de cultivo en donde creció *P. tinctorius* a diferentes concentraciones de CO₂ con el uso de los bioensayos, sin embargo no se obtuvieron resultados consistentes en relación a las diferentes variables evaluadas. Para el caso de los bioensayos para los medios de *G. fujikuroi* no se obtuvieron respuestas, debido muy probablemente a la presencia de otro tipo de metabolitos producidos por dicho hongo (tales como bikaverina o ácido jasmónico).

Para la serie de bioensayos realizados con microorganismos solamente se detectó un efecto del ácido giberélico sobre el crecimiento de *B. subtilis* y *S. castellii*. El ácido indolacético a bajas concentraciones (hasta 0.2 mg/L) provocó un estímulo en el crecimiento de la cepa de *S. castellii*, sin embargo al aumentar la concentración (a 0.6 mg/L) este RCV provocó una inhibición en el crecimiento con respecto al control. El resto de cepas ensayadas no mostraron ninguna respuesta a la presencia del ácido indolacético y ácido giberélico.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- ◆ La actividad de agua (A_w) es una variable que afecta tanto la velocidad de crecimiento radial (VCR) así como la densidad de crecimiento (ρ_x) en las cuatro cepas estudiadas. En general se observó que, al disminuir el nivel de A_w disminuye la VCR y aumenta la densidad de crecimiento.
- ◆ La cepa de *G. fujikuroi* presentó crecimiento hasta un nivel de A_w de 0.943, lo cual resulta importante como un criterio de selección y de decisión de condiciones de operación para una fermentación sólida, debido a que a este nivel de A_w ya no crecen bacterias ni levaduras, que son organismos de rápido crecimiento y compiten por el sustrato con el microorganismo de interés.
- ◆ En tres de las cepas, *S. granulatus*, *A. rubescens* y *G. fujikuroi*, el uso de la glucosa como única fuente de carbono en el medio de cultivo provoca una marcada disminución en la velocidad de crecimiento radial, lo que indica que existe una represión catabólica por efecto de este azúcar. A diferencia de las cepas mencionadas, *P. tinctorius* no presenta represión catabólica por efecto de la glucosa.
- ◆ El porcentaje de CO_2 en la atmósfera de crecimiento de tres de las cepas: *S. granulatus*, *P. tinctorius* y *G. fujikuroi*, afecta la velocidad de crecimiento radial y la densidad de crecimiento. Se observa una tendencia general: a medida que la concentración de CO_2 aumenta, la VCR disminuye y la densidad de crecimiento aumenta.
- ◆ Un 30 % de CO_2 inicial en la atmósfera de crecimiento de la cepa RE11 de *G. fujikuroi* favorece la producción de ácido giberélico. Aun con un cierto porcentaje de CO_2 inicial, la producción de AG_3 empieza al rededor de las 120 horas, es decir la concentración inicial de CO_2 no afecta el tiempo de arranque de la producción de este compuesto (reportado por varios autores cerca de las 120 horas).
- ◆ En general, se ha observado que el aumento de un factor de estrés en el medio ambiente de crecimiento de todas las cepas estudiadas provoca una disminución en la velocidad de crecimiento radial y un aumento en la densidad de crecimiento.
- ◆ En base a los estudios realizados, es posible determinar condiciones de operación para la producción de RCV por fermentación en sustrato sólido con el uso de las cepas estudiadas.
- ◆ Se montaron metodologías para la detección de ácido giberélico y de ácido indolacético con el uso de bioensayos. Pudo observarse, en general, que concentraciones menores a 1 mg/L provocan un efecto muy marcado en la variable de respuesta medida, en todos los casos (tanto en microorganismos como en semillas de alfalfa).
- ◆ Es posible utilizar bioensayos con semillas de alfalfa para evaluar la presencia de concentraciones menores a 0.5 mg/L de un RCV (las cuales no se detectan por HPLC), en medios de cultivo sólidos en donde hayan crecido hongos reportados como productores de RCV, sin necesidad de purificar dicho medio.

- ◆ La longitud de raíz, la formación de raíces secundarias y el porcentaje de germinación en alfalfa, son variables que se muestran afectadas como respuesta a la concentración de ácido indolacético. Existe una inhibición en las tres variables mencionadas al aumentar la concentración de este regulador en el medio.
- ◆ Tanto el ácido giberélico como el ácido indolacético estimulan el crecimiento de *B. subtilis* cuando son empleados en concentraciones menores a 1 mg/L. De esta manera existe la posibilidad de emplear esta metodología para la detección de concentraciones menores a 1 mg/L, sin tener la necesidad de emplear métodos de purificación previos.
- ◆ Concentraciones menores a 0.2 mg/L de ácido indolacético provocan un estímulo en el crecimiento de *S. castelii*.
- ◆ Es posible correlacionar el efecto que provoca el AG₃ en el crecimiento de las raíces de alfalfa con el crecimiento de *B. subtilis*. En ambos casos, concentraciones menores a 1 mg/L estimulan el crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Akiyoshi, D.; Regier, D.A. y Gordon, M.P.** 1987. Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. *Journal of Bacteriology*, 169 (9): 4242-4248.
2. **Aquihuatl, M.A. y Rodríguez, W.** 1994. Efecto de la actividad de agua sobre el crecimiento radial y morfología de hongos ectomicorrícicos. *5to. Congreso Nacional de Micología*. Memorias.
3. **Atzorn, R.; Crozier, A.; Wheeler, C.T. y Sandberg, G.** 1988. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175: 532-538.
4. **Audus, L.J.** 1972. Plant Growth Substances. Volume 1: Chemistry and Physiology. *Leonard Hill, Great Britain*.
5. **Austin, G.T.** 1988. Manual de procesos químicos en la industria. Tomo II. Quinta edición. Primera edición en español. *McGraw-Hill*. México.
6. **Bajracharya, R. y Mudgett, R.E.** 1980. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 2219-2235.
7. **Barea, J.M.; Navarro, E.; Palomares, A. y Montoya, E.** 1974. A rapid microbiological assay method for auxins, gibberellic acid and kinetin using yeast. *Journal of Applied Bacteriology*, 37: 171-174.
8. **Barendse, G.W.M.** 1987. High performance liquid chromatography of gibberellins, in: Linskens, H.F. and Jackson, J.F. High Performance liquid Chromatography in plant sciences. Volume 5. *Springer-Verlag*, Germany.
9. **Barrios, J.** 1994. Entrevista personal.
10. **Bidwell, R.G.S.** 1990. Fisiología Vegetal. *AGT Editor*. Primera edición en español, México.
11. **Bottini, R.; Fulchieri, M.; Pearce, D. y Pharis, R.** 1989. Identification of gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, 90: 45-47.
12. **Brenner, M.L.** 1981. Modern methods for plant growth substance analysis. *Annual Review of Plant Physiology*, 32: 511-538.
13. **Brock, T.; Smith, D.; Madigan, M.** 1984. Microbiología. *Prentice-Hall*. Cuarta edición.
14. **Brückner, B. y Blechschmidt, D.** 1986. Die mikrobiologische synthese von gibberellinen. *Journal of Basic Microbiology*, 26 (8): 483-497.

15. Crozier, A.; Loferski, K.; Zaerr, J.B. y Morris, R.O. 1980. Analysis of picogram quantities of indole-3-acetic acid by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence procedures. *Planta*, 150: 366-370.
16. Dathe, W. 1992. Effects of jasmonic acid and ethephon tillering to maturity in *Spring barley*. *Annals of Botany*, 69: 237-241.
17. Davies, P.J. 1987. The Plant Hormones: Their nature, Occurrence and Functions, en: Plant Hormones and their role, in: Plant Growth and Development. *Martinus Nijhoff Publishers*.
18. Demain, A.L. y Solomon N.A. (editors). 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. *American Society for Microbiology*. Washington. 66-84.
19. du Preez, J.C.; Quian, X. y Kilian, S.G. 1993. Stability and bioactivity of gibberellic acid in different solvents. *Biotechnology Techniques*, 7 (5): 391-396.
20. Ek, M.; Ljungquist, P.O. y Stenström E. 1983. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. *The New Phytologist*, 401-407.
21. Ernstsén, A.; Sandberg, G. y Crozier, A. 1986. Effects off sodium diethylthiocarbamate. solvent, temperature and plant extracts on stability of indoles. *Physiologia Plantarum*, 68: 519-522.
22. Gay, G. y Debaud, J.C. 1987. Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 26: 141-146.
23. Gervais, P. y Christophe, B. 1986. Development of a solid-substrate fermentor allowing the control of the substrate water activity. *Biotechnology Letters*, 8 (3): 191-196.
24. Gervais, P. 1989. New sensor allowing continuous water activity measurement of submerged or solid-substrate fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 266-271.
25. Grajek, W. y Gervais, P. 1987. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology*, 9: 658-662.
26. Greene. E. M. 1980. Cytokinin production by microorganisms. *The Botanical Review*, 46: 25-74.
27. Guzmán, G. 1979. Identificación de los hongos. Ed. LIMUSA, México.
28. Harley, J.L. y Smith, S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. *Academic Press Inc*. London.
29. Helwig, J.T. y Council, K.A. (editors). 1979. The SAS users guide. SAS Institute Inc. U.S.A.

30. **Hemberg, T. y Tillberg, E.** 1980. The influence of the extraction procedure on yield of indole-3-acetic acid in plant extracts. *Physiologia Plantarum*, 50: 176-182.
31. **Horgan, R.** 1987. Hormone analysis: instrumental methods of plant hormone analysis, in: Davies, P.J. (editor). Plant hormones and their role in plant growth development. *Martinus Nijhoff Publishers*, Boston.
32. **Hung, L. y Trappe, J.M.** 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia*, 75 (2): 234-241.
33. **Husain, A.; Ahmad, A. y Agrawal, P.K.** 1993. (-) jasmonic acid substance a phytotoxic substance from *Botryodiplodia theobromae*: characterization by NMR spectroscopic methods. *Journal of Natural Products*. 56 (11): 2008-2011.
34. **Jones, A. y Pharis, R.P.** 1987. Production of gibberellins and bikaverin by cells of *Gibberella fujikuroi* immobilized in carrageenan. *Journal of Fermentation Technology*, 65 (6): 717-722.
35. **Kampert, M. y Strzelczyk, E.** 1989. Effect of aminoacids on cytokinin-like substances production by mycorrhizal fungi of pine (*Pinus silvestris* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 28: 219-228.
36. **Kennell, D.** 1960. The effects of indoleacetic acid and kinetin on the growth of some microorganisms. *Experimental Cell Research*, 21: 19-33.
37. **Kumar P.K.R. y Lonsane B.K.** 1987. Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnology Letters*, 9 (3): 179-182.
38. **Kumar P.K.R. y Lonsane B.K.** 1988. Batch and fed-batch solid state fermentations: kinetics of cell growth, hydrolytic enzymes production and gibberellic acid production. *Process Biochemistry*.
39. **Kumar P.K.R. y Lonsane B.K.** 1990. Solid state fermentation: physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 145-148.
40. **Kuroguchi, S.; Murofushi, N.; Ota, Y. y Takahashi, N.** 1979. Identification of gibberellins in the rice plant and quantitative changes of gibberellin A₁₉ throughout its life cycle. *Planta*, 146: 185-191.
41. **Larqué-Saavedra, A. y Reyes, R.** 1988. El uso de las hormonas vegetales en la agricultura mexicana. *Ciencia y Desarrollo*, Vol. XIV, 82: 49-63.
42. **Linskens, H.F. y Jackson, J.F.** (editors) 1987. High Performance Liquid Chromatography in plant sciences. Volume 5. *Springer-Verlag*, Germany.

43. **López, R.; Date, W.; Mersch, O. y Sembdner, G.** 1984. Detección del ácido jasmónico en semillas inmaduras de soya, *Glycine max*. *Comunicaciones breves*. 123-126.
44. **Lynch, J.M.** 1972. Identification of substrates and isolation of microorganisms responsible for ethylene production in the soil. *Nature*, 240: 45-46.
45. **Lynch, J.M. y Harper, S.** 1974. Formation of ethylene by a soil fungus. *Journal of General Microbiology*, 8: 187-195.
46. **Marks, G.C. y Kozlowski, T.T.** (editors). 1973. Ectomycorrhizae. *Academic Press Inc.* U.S.A.
47. **Maruzzella, J.C. y Garner, J.G.** 1963. Effect of kinetin on bacteria. *Nature*, 200: 4904
48. **Marx, D.H. y Krupa, S.V.** 1978. Ectomycorrhizae, in: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants (Dommergues, Y.R. y Krupa, S.V. editors). *Elsevier Scientific Publishing Company*, The Netherlands.
49. **Miersch, O.; Günther, T.; Fritsche, W. y Sendberg, G.** 1993. Jasmonates from different fungal species. *Natural Products Letters*. 2 (4): 293-299.
50. **Miller, C.O.** 1967. Zeatin and Zeatin Riboside from a Mycorrhizal Fungus. *Science*, 157: 1055-1056.
51. **Molin, P.; Gervais, P.; Lemièrre, J.P. y Davet, T.** 1992. Direction of hyphal growth: a relevant parameter in the development of filamentous fungi. *Research in Microbiology*, 143: 777-784.
52. **Morgan, P.** 1980. Synthetic growth regulators: potential for development. *Botanical Gazette*, 14: 337-346.
53. **Ng, P.P.; Cole, A.L.; Jameson, P.E. y Mcwha, J.A.** 1982. Cytokinin production by ectomycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, 91: 57-63.
54. **Pérez Moreno, J.** 1992. Aspectos ecológicos: aislamiento de cepas, síntesis de micorriza y pruebas *in vitro* contra patógenos de diversos hongos ectomicorrízicos del parque nacional de Zoquiapan, Edo. de México. *Tesis de maestría*. Colegio de Postgraduados.
55. **Phillips, D.A. y Torrey, J.G.** 1970. Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Physiologia Plantarum*, 23: 1057-1063.
56. **Quinn, L.Y.; Oates, R.P. y Beers, T.S.** 1963. Support of cellulose digestion by *Clostridium thermocellum* in a kinetin-supplemented basal medium. *Journal of Bacteriology*, 86: 1359.

57. **Reeve, D.R. y Crozier, A.** 1980. Quantitative analysis of plant hormones, in: MacMillan, J. (editor). Hormonal regulation of development I. Molecular aspects of plant hormones. Springer, Berlin Heidelberg New York.
58. **Rouillon, R.; Gay, G.; Bernillon, J.; Fabre, J. y Bruchet, G.** 1986. Analysis by HPLC-mass spectrometry of the indole compounds released by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* in pure culture. *Canadian Journal Botany*, 64: 1893-1897.
59. **Rudawska, M. y Gay, G.** 1989. IAA- synthesizing activity of different ectomycorrhizal fungi in relation to nitrogen nutrition. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 28: 425-430.
60. **Salisbury y Ross.** 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, Fourth Edition. California.
61. **Salmeron, V.; Martínez-Toledo, M.V. y González-López, J.** 1990. Nitrogen fixation and production of auxins, gibberellins and cytokinins by an *Azotobacter chroococcum* strain isolated from the root *Zea mays* in the presence of insoluble phosphate. *Chemosphere*, 20: 417-422.
62. **Sandhya, X. y Karanth, N.G.** 1992. A convenient method to measure water activity in solid state fermentation systems. *Letters in Applied Microbiology*, 15: 53-55.
63. **Slankis, V.** 1974. Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Annual Review of Phytopatology*, 12: 437-457.
64. **Steel, R.G.D. y Torrie, J.H.** 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill. U.S.A.
65. **Steele, G.C. y Trinci, A.P.J.** 1975. Morphology and growth kinetics of hyphae of differentiated and undifferentiated mycelia of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 91: 362-368.
66. **Strzelczyk, P. y Pokojaska, A.** 1984. Production of auxins and gibberellin-like substances by micorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris L.*). *Plant and Soil*, 81: 185-194.
67. **Strzelczyk, P. y Pokojaska, A.** 1989. Effect of B-group vitamins on auxin-like substances production by ectomycorrhizal fungi of pine (*Pinus silvestris L.*). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 28: 483-491.
68. **Sturtevant, B. y Taller, B.J.** 1989. Cytokinin production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*, 89: 1247-1252.
69. **Sweetser, P.B. y Swartzfager, D.G.** 1978. Indole-3-acetic acid levels of plant tissue as determined by a new High Performance Liquid Chromatographic method. *Plant Physiology*, 61: 254-258.

70. **Thimann, K.V. y Sachs, T.** 1966. The role of cytokinins in the "fasciation" disease caused by *Corynebacterium fascians*. *American Journal Botany*, 53: 731-739.
71. **Tiberth.** 1994. Entrevista personal
72. **Troller, J.A.** 1980. Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technology*, 76-82.
73. **Ueda, J.; Miyamoto, K.; Aoki, M.; Hirata, T.; Sato, T. y Momotani, Y.** 1991. Identification of jasmonic acid in *Chlorella* and *Spirulina*. *Bulletin of the University of Osaka Prefecture*, Series B. Vol. 43.
74. **Ulrich, J.M.** 1960. Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 13: 429-443.
75. **Vass, R.C. y Jefferys, E.G.** 1979. Gibberellic acid, in: Secondary products of metabolism, Rose A.H. (editor). Volume 3. *Academic Press*, London.
76. **Villalobos,** 1992.
77. **Visárová, G.** 1975. Contribution to the study of cytokinin production by phytopathogenic fungi. *Biologia Plantarum*, 17: 380-382.
78. **Vogt, K.A.; Publicover, D.A. y Vogt, D.J.** 1991. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 35: 171-190.
79. **Volke, V.** 1994. Entrevista personal.
80. **Weaver, R.** 1972. Plant growth substances in agriculture. *W.H. Freeman and Company*. U.S.A.
81. **Weiler, E.W.** 1982. Plant hormone immunoassay. *Physiologia Plantarum*, 54: 230-234.
82. **Yamaguchi, Y; Yokota, T.; Yoshida, S. y Takahashi, N.** 1979. High pressure liquid chromatography of conjugated gibberellins. *Phytochemistry*, 18: 1699-1702.

GLOSARIO

7. GLOSARIO

- ◆ **Cambium:** Capa de células capaces de dividirse que separan al xilema y al floema.
- ◆ **Citoquinésis:** División del protoplasto después de la mitosis.
- ◆ **Coleoptilo:** Estructura existente en el embrión de las gramíneas, es la vaina que rodea la plúmula y que es atravesada por esta al producirse la germinación.
- ◆ **Conidio:** Espora asexual compuesta por una o muchas células de diversos tamaños y formas.
- ◆ **Conidióforo:** Rama del micelio que sostiene conidios.
- ◆ **Epicotilo:** Internodo situado inmediatamente por encima de los cotiledones.
- ◆ **Floema:** Tejido de transporte compuesto generalmente de células vivas anucleadas y de diámetro grande. Esta estructura se encuentra localizada hacia afuera del haz vascular.
- ◆ **Hipocotilo:** Tejido de reserva que se encuentra en algunas especies. Es la parte de iniciación del tallo localizada debajo de los cotiledones.
- ◆ **Meristemo:** Región embrionaria (en división constante) de células que permiten el crecimiento de las plantas durante toda su vida.
- ◆ **Micorriza:** Asociación simbiótica de un hongo con las raíces de una planta superior.
- ◆ **Nucleósido:** Grupo de ribosa unido al átomo de nitrógeno en posición 9 (en la base estructural de las citocininas). Cada citocinina puede existir en forma de base libre o bien como un nucleósido.
- ◆ **Parénquima:** Tejido vegetal compuesto por células de pared delgada generalmente isodiamétricas, que se encuentran formando parte del cortex, mesófilo y otros tejidos de la planta.
- ◆ **Red de Hartig:** Sistema intracelular complejo en donde las hifas de un hongo (micorrízico) penetran hacia adentro entre las células de la raíz de un árbol.
- ◆ **Rizósfera:** Región del suelo expuesta a la influencia de las raíces y caracterizada por tener una zona de intensa actividad microbiológica.
- ◆ **Tejido vascular:** Sistema de vasos que sirven para conducir savia o agua en las plantas.
- ◆ **Xilema:** Estructura de transporte (de agua y solutos diluidos) que contiene cuatro tipos de célula: traqueidas, elementos de conductos, fibras y de xilema de parénquima. En el xilema, esta compuesto principalmente de células conductoras muertas (solo las células de parénquima están vivas). Esta estructura se encuentra hacia el centro de un haz vascular.

ANEXOS

8. ANEXOS

A continuación se muestran los datos y coeficientes de correlación obtenidos en los análisis de varianza realizados para los diferentes tratamientos aplicados a las cuatro cepas productoras de RCV, así como para los bioensayos con plantas y microorganismos.

Se indica con un asterisco (*) la significancia a un nivel de probabilidad de 0.05, y con dos asteriscos (**) la significancia a un nivel de probabilidad de 0.01. Si no se muestran asteriscos en la columna de la probabilidad de F, indica que la fuente de variación no es significativa.

1. VARIABLE: TEMPERATURA

1.1. Crecimiento radial promedio

Tabla 1. Comparación de medias del crecimiento radial de las cepas productoras de RCV en función de la temperatura de incubación

| CEPA | TEMPERATURA (° C) | CR PROMEDIO (mm) | ♣ |
|----------------------|----------------------|---------------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | 25 | 14.667 | A |
| | 30 | 14.137 | A |
| <i>A. rubescens</i> | 25 | 28.847 | A |
| | 30 | 18.500 | B |
| <i>P. tinctorius</i> | 25 | 8.074 | B |
| | 30 | 18.255 | A |
| <i>G. fujikuroi</i> | 25 | 29.278 | A |
| | 30 | 23.318 | B |

♣ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$))

Tabla 2. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la temperatura de incubación para la cepa *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 12 | 2312.728 | 192.727 | 143.39 | 0.0001** |
| Temperatura (T) | 1 | 3.360 | 3.360 | 2.50 | 0.1243 |
| t * T | 6 | 62.925 | 10.487 | 7.8 | 0.0001** |
| Error | 30 | 40.323 | 1.344 | | |
| Total | 49 | 2419.336 | | | |

G.L = Grados de Libertad

$$R^2 = 0.9833$$

Tabla 3. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la temperatura de incubación para la cepa *A. rubescens*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 11 | 2845.598 | 258.691 | 6.35 | 0.0002** |
| Temperatura (T) | 1 | 1014.300 | 1041.300 | 24.89 | 0.0001** |

Tabla 3. (cont.) Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la temperatura de incubación para la cepa *A. rubescens*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| t * T | 6 | 0.000 | 0.000 | 0.00 | 1.0000 |
| Error | 19 | 774.281 | 40.752 | | |
| Total | 37 | 4134.192 | | | |

$$R^2 = 0.8127$$

Tabla 4. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la temperatura de incubación para la cepa *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 12 | 3458.084 | 288.174 | 233.88 | 0.0001** |
| Temperatura (T) | 1 | 1183.878 | 1183.878 | 960.83 | 0.0001** |
| t * T | 5 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.0000 |
| Error | 28 | 34.500 | 1.232 | | |
| Total | 46 | 3862.343 | | | |

$$R^2 = 0.9911$$

Tabla 5. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la temperatura de incubación para la cepa *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 12 | 5413.769 | 451.147 | 31.80 | 0.0001** |
| Temperatura (T) | 1 | 413.666 | 413.666 | 29.16 | 0.0001** |
| t * T | 6 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.0000 |
| Error | 31 | 439.750 | 14.185 | | |
| Total | 50 | 6098.686 | | | |

$$R^2 = 0.9279$$

2. VARIABLE: ACTIVIDAD DE AGUA (A_w)

2.1. Crecimiento radial promedio

Tabla 6. Comparación de medias de la variable crecimiento radial en función a A_w .

| CEPA | A_w | CR PROMEDIO (mm) | ♣ |
|----------------------|-------|------------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | 0.998 | 15.775 | A |
| | 0.980 | 10.858 | B |
| | 0.960 | 3.166 | C |
| | 0.943 | 0 | D |
| <i>A. rubescens</i> | 0.998 | 28.387 | A |
| | 0.980 | 14.916 | B |
| | 0.960 | 2.065 | C |
| | 0.943 | 0 | D |

Tabla 6. (cont.) Comparación de medias de la variable crecimiento radial en función a A_w

| CEPA | A_w | CR PROMEDIO (mm) | * |
|----------------------|-------|---------------------|---|
| <i>P. tinctorius</i> | 0.998 | 18.200 | A |
| | 0.980 | 6.483 | B |
| | 0.960 | 0 | C |
| | 0.943 | 0 | C |
| <i>G. fujikuroi</i> | 0.998 | 28.600 | A |
| | 0.980 | 17.383 | B |
| | 0.960 | 6.308 | C |
| | 0.943 | 2.325 | D |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Tabla 7. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la A_w para la cepa de *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 9 | 1447.066 | 160.785 | 1286.28 | 0.0001** |
| A_w | 2 | 2039.147 | 1019.573 | 8156.59 | 0.0001** |
| t * A_w | 18 | 693.673 | 38.537 | 308.30 | 0.0001** |
| Error | 50 | 6.250 | 0.125 | | |
| Total | 79 | 4186.137 | | | |

$$R^2 = 0.9985$$

Tabla 8. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la A_w para la cepa de *A. rubescens*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 9 | 1949.895 | 216.655 | 185.08 | 0.0001** |
| A_w | 2 | 8415.640 | 4207.820 | 3594.51 | 0.0001** |
| t * A_w | 18 | 1274.335 | 70.796 | 60.48 | 0.0001** |
| Error | 50 | 58.531 | 1.171 | | |
| Total | 79 | 11698.402 | | | |

$$R^2 = 0.9949$$

Tabla 9. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la A_w para la cepa de *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 9 | 1749.405 | 194.378 | 208.57 | 0.0001** |
| A_w | 1 | 1647.363 | 1647.363 | 1767.66 | 0.0001** |
| t * A_w | 9 | 537.453 | 59.717 | 64.08 | 0.0001** |
| Error | 30 | 27.958 | 0.9319 | | |
| Total | 49 | 3962.180 | | | |

$$R^2 = 0.9929$$

Tabla 10. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la A_w para la cepa de *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 9 | 3134.023 | 348.225 | 737.73 | 0.0001** |
| A_w | 3 | 10151.027 | 3383.675 | 7168.44 | 0.0001** |
| $t * A_w$ | 27 | 1799.056 | 66.632 | 141.16 | 0.0001** |
| Error | 70 | 33.042 | 0.472 | | |
| Total | 109 | 15117.147 | | | |

$$R^2 = 0.9978$$

2.2. Densidad de crecimiento promedio (ρ_x)

Tabla 11. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a A_w para la cepa de *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| A_w | 2 | 6021.845 | 3010.922 | 161.88 | 0.0001** |
| Error | 6 | 111.597 | 18.599 | | |
| Total | 8 | 6133.442 | | | |

$$R^2 = 0.9818$$

Tabla 12. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a A_w para la cepa de *A. rubescens*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| A_w | 2 | 754.573 | 377.268 | 572.83 | 0.0001** |
| Error | 6 | 3.952 | 0.658 | | |
| Total | 8 | 758.489 | | | |

$$R^2 = 0.9948$$

Tabla 13. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a A_w para la cepa de *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| A_w | 1 | 33.986 | 33.986 | 70.57 | 0.0011** |
| Error | 4 | 1.926 | 0.482 | | |
| Total | 5 | 35.913 | | | |

$$R^2 = 0.9464$$

Tabla 14. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a A_w para la cepa de *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| A_w | 3 | 25.478 | 8.493 | 25.15 | 0.0002** |
| Error | 8 | 2.701 | 0.337 | | |
| Total | 11 | 28.178 | | | |

$$R^2 = 0.9042$$

3. VARIABLE: FUENTE DE CARBONO

3.1. Crecimiento radial promedio

Tabla 15. Comparación de medias del crecimiento radial de las cepas productoras de RCV en función a la fuente de carbono.

| CEPA | FUENTE DE CARBONO | CR PROMEDIO (mm) | ♣ |
|----------------------|-------------------|------------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | PDA | 14.472 | A |
| | Almidón | 13.844 | A |
| | Sacarosa | 12.625 | B |
| | Glucosa | 7.792 | C |
| <i>A. rubescens</i> | Almidón | 28.125 | A |
| | PDA | 27.042 | B |
| | Sacarosa | 22.228 | C |
| | Glucosa | 20.916 | D |
| <i>P. tinctorius</i> | PDA | 16.528 | A |
| | Glucosa | 10.010 | B |
| | Sacarosa | 7.833 | C |
| | Almidón | 3.312 | D |
| <i>G. fujikuroi</i> | PDA | 26.528 | A |
| | Almidón | 20.562 | B |
| | Sacarosa | 19.249 | B |
| | Glucosa | 17.958 | C |

♣ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

Tabla 16. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la fuente de carbono (FC) para la cepa de *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 10 | 1544.055 | 154.405 | 87.18 | 0.0001** |
| FC | 3 | 625.932 | 208.644 | 117.80 | 0.0001** |
| t * FC | 19 | 411.407 | 21.653 | 12.23 | 0.0001** |
| Error | 57 | 100.958 | 1.772 | | |
| Total | 89 | 2682.354 | | | |

$$R^2 = 0.9624$$

Tabla 17. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la fuente de carbono (FC) para la cepa de *A. rubescens*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 10 | 2594.901 | 259.490 | 136.37 | 0.0001** |
| FC | 3 | 741.988 | 247.329 | 129.98 | 0.0001** |
| t * FC | 19 | 822.213 | 43.274 | 22.74 | 0.0001** |
| Error | 49 | 93.239 | 1.903 | | |
| Total | 81 | 425.342 | | | |

$$R^2 = 0.9781$$

Tabla 18. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la fuente de carbono (FC) para la cepa de *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 10 | 1046.806 | 104.680 | 31.05 | 0.0001** |
| FC | 2 | 434.457 | 217.228 | 64.42 | 0.0001** |
| t * FC | 11 | 114.149 | 10.377 | 3.08 | 0.0045** |
| Error | 40 | 134.875 | 3.372 | | |
| Total | 63 | 1730.288 | | | |

$$R^2 = 0.9220$$

Tabla 19. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la fuente de carbono (FC) para la cepa de *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 10 | 1597.271 | 159.727 | 48.19 | 0.0001** |
| FC | 2 | 66.042 | 33.021 | 9.96 | 0.0003** |
| t * FC | 11 | 11.542 | 1.049 | 0.32 | 0.9778 |
| Error | 40 | 132.583 | 3.315 | | |
| Total | 63 | 1807.437 | | | |

$$R^2 = 0.9266$$

3.2. Densidad de crecimiento promedio (ρ_x)

Tabla 20. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a la fuente de carbono para la cepa de *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| FC | 2 | 45.125 | 22.563 | 84.48 | 0.0023** |
| Error | 3 | 0.802 | 0.267 | | |
| Total | 5 | 45.926 | | | |

$$R^2 = 0.9825$$

Tabla 21. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a la fuente de carbono para la cepa de *A. rubescens*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| FC | 2 | 5.024 | 2.512 | 3.22 | 0.1123 |
| Error | 6 | 4.682 | 0.781 | | |
| Total | 8 | 9.706 | | | |

$$R^2 = 0.5177$$

Tabla 22. Análisis de varianza para ρ_x en función a la fuente de carbono para *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| FC | 2 | 12.529 | 6.265 | 26.65 | 0.0123* |
| Error | 3 | 0.705 | 0.235 | | |
| Total | 5 | 13.235 | | | |

$$R^2 = 0.9467$$

Tabla 23. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a la fuente de carbono para la cepa de *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| FC | 2 | 2.305 | 1.153 | 0.97 | 0.4308 |
| Error | 6 | 7.115 | 1.186 | | |
| Total | 8 | 9.421 | | | |

$$R^2 = 0.2448$$

4. VARIABLE: PRESION PARCIAL DE CO₂ (p(CO₂))

4.1. Crecimiento radial promedio

Tabla 24. Comparación de medias del crecimiento radial en función al porcentaje inicial de CO₂.

| CEPA | % DE CO ₂ INICIAL | CR PROMEDIO (mm) | ♣ |
|----------------------|------------------------------|------------------|---|
| <i>S. granulatus</i> | control | 19.833 | A |
| | 0 | 13.333 | B |
| | 30 | 6.889 | C |
| | 60 | 2.986 | D |
| <i>P. tinctorius</i> | control | 16.696 | A |
| | 0 | 12.156 | B |
| | 30 | 4.427 | C |
| | 60 | 2.000 | D |
| <i>G. fujikuroi</i> | control | 23.917 | A |
| | 0 | 16.810 | B |
| | 30 | 15.452 | C |
| | 60 | 12.071 | D |

♣ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey

Tabla 25. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la presión parcial de CO₂ (CO₂) para la cepa de *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 7 | 1264.358 | 180.623 | 270.23 | 0.0001** |
| CO ₂ | 3 | 2958.593 | 986.197 | 1475.45 | 0.0001** |
| t * CO ₂ | 13 | 672.895 | 51.761 | 77.44 | 0.0001** |
| Error | 48 | 32.083 | 0.668 | | |
| Total | 71 | 4927.929 | | | |

$$R^2 = 0.9935$$

Tabla 26. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la presión parcial de CO₂ (CO₂) para la cepa de *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 7 | 990.995 | 141.571 | 263.83 | 0.0001** |
| CO ₂ | 2 | 1482.527 | 741.263 | 1381.43 | 0.0001** |
| t * CO ₂ | 13 | 419.137 | 32.241 | 60.09 | 0.0001** |
| Error | 39 | 20.927 | 0.536 | | |
| Total | 61 | 2913.585 | | | |

$$R^2 = 0.9928$$

Tabla 27. Análisis de varianza para la variable crecimiento radial en función a la presión parcial de CO₂ (CO₂) para la cepa de *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Tiempo (t) | 8 | 3445.643 | 431.955 | 737.57 | 0.0001** |
| CO ₂ | 13 | 1419.325 | 473.108 | 807.84 | 0.0001** |
| t * CO ₂ | 15 | 0.000 | 0.000 | 0.00 | 1.0000 |
| Error | 54 | 31.625 | 0.586 | | |
| Total | 80 | 4482.159 | | | |

$$R^2 = 0.9929$$

4.2. Densidad de crecimiento promedio (ρ_x)

Tabla 28. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a la presión parcial de CO₂ (CO₂) para la cepa de *S. granulatus*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| CO ₂ | 2 | 116.139 | 58.069 | 30.74 | 0.0007** |
| Error | 6 | 11.333 | 1.889 | | |
| Total | 8 | 127.473 | | | |

$$R^2 = 0.9111$$

Tabla 29. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a la presión parcial de CO₂ (CO₂) para la cepa de *P. tinctorius*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| CO ₂ | 2 | 9.719 | 4.859 | 181.95 | 0.0007** |
| Error | 3 | 0.081 | 0.027 | | |
| Total | 5 | 9.799 | | | |

$$R^2 = 0.9918$$

Tabla 30. Análisis de varianza para la variable ρ_x en función a $p(\text{CO}_2)$ para *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| CO ₂ | 2 | 2.247 | 1.124 | 240.27 | 0.0001** |
| Error | 6 | 0.028 | 0.005 | | |
| Total | 8 | 2.275 | | | |

$$R^2 = 0.9877$$

5. VARIABLE: CONCENTRACION DE AG₃

El análisis que se presenta a continuación corresponde a las Tablas 4.11 y 4.12 del texto (en la sección 4.5 del capítulo de resultados).

Tabla 31. Análisis de varianza para la variable concentración de ácido giberélico en función del tiempo de incubación (t_i) y % de CO₂ inicial (CO₂) para la cepa *G. fujikuroi*.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| CO ₂ | 2 | 35.051 | 17.525 | 82.78 | 0.0001** |
| t_i | 3 | 90.291 | 30.097 | 142.16 | 0.0001** |
| $t_i * \text{CO}_2$ | 6 | 21.790 | 3.632 | 17.15 | 0.0001** |
| Error | 12 | 2.541 | 0.212 | | |
| Total | 23 | 149.671 | | | |

$$R^2 = 0.9830$$

6. VARIABLE: CRECIMIENTO EN SEMILLAS DE ALFALFA

6.1. Acido indolacético

6.1.1. Longitud de raíz (LR)

Tabla 32. Análisis de varianza para la variable LR en función a la concentración de AIA.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Conc. | 4 | 4778.267 | 1194.567 | 50.76 | 0.0001** |
| Error | 10 | 235.333 | 23.533 | | |
| Total | 14 | 5013.600 | | | |

$$R^2 = 0.9531$$

6.1.2. Número de raíces secundarias (NRS)

Tabla 33. Análisis de varianza para la variable NRS en función a la concentración de AIA.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Conc. | 4 | 31.600 | 7.900 | 10.77 | 0.0021** |
| Error | 10 | 7.333 | 0.733 | | |
| Total | 14 | 38.933 | | | |

$$R^2 = 0.8116$$

6.2. Acido giberélico

6.2.1. Longitud de raíz (LR)

Tabla 34. Análisis de varianza para la variable LR en función a la concentración de AG₃.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Conc. | 3 | 3643.000 | 1214.333 | 24.74 | 0.0002** |
| Error | 8 | 392.667 | 49.083 | | |
| Total | 11 | 4035.667 | | | |

$$R^2 = 0.9027$$

6.2.2. Número de raíces secundarias (NRS)

Tabla 35. Análisis de varianza para la variable NRS en función a la concentración de AG₃.

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| Conc. | 4 | 91.067 | 22.766 | 21.34 | 0.0001** |
| Error | 10 | 10.667 | 1.066 | | |
| Total | 14 | 101.733 | | | |

$$R^2 = 0.8952$$

7. VARIABLE: CRECIMIENTO

El crecimiento microbiano en los microorganismos usados para realizar los bioensayos fue estimado como la absorbancia, medida a una densidad optica de 650 nm.

Tabla 36. Análisis de varianza para la variable crecimiento en función de la concentración (C) del regulador de crecimiento vegetal (RCV) para *S. castellii*

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| RCV | 2 | 0.043 | 0.022 | 19.73 | 0.0002** |
| C | 3 | 0.104 | 0.034 | 31.64 | 0.0001** |
| RCV * C | 6 | 0.024 | 0.004 | 3.67 | 0.0263* |
| Error | 12 | 0.013 | 0.001 | | |
| Total | 23 | 0.184 | | | |

$$R^2 = 0.9288$$

Tabla 37. Análisis de varianza para la variable crecimiento en función de la concentración (C) de AIA para *B. subtilis*

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| C | 3 | 0.035 | 0.012 | 3.61 | 0.1234 |
| Error | 4 | 0.013 | 0.003 | | |
| Total | 7 | 0.048 | | | |

$$R^2 = 0.7303$$

Tabla 38. Análisis de varianza para la variable crecimiento en función de la concentración (C) de AG₃ para *B. subtilis*

| Fuente de variación | G. L. | Suma de cuadrados | Cuadrado medio | Valor de F | Prob. de F |
|---------------------|-------|-------------------|----------------|------------|------------|
| C | 3 | 0.065 | 0.022 | 28.43 | 0.0037** |
| Error | 4 | 0.003 | 0.001 | | |
| Total | 7 | 0.068 | | | |

$$R^2 = 0.9552$$