



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00004

ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN UNA COMPOSTA.

En México, D.F., se presentaron a las 16:30 horas del día 14 del mes de diciembre del año 2004 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ALFONSO LARQUE SAAVEDRA
- DRA. MARIA DEL ROSARIO GARCIA MATEOS
- DR. MARCOS SOTO HERNANDEZ
- DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, a la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: IGNACIO GARCIA MARTINEZ



IGNACIO GARCIA MARTINEZ
FIRMA DEL ALUMNO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. OSCAR ARMANDO MONROY
HERMOCILLO

PRESIDENTE

DR. ALFONSO LARQUE SAAVEDRA

VOCAL

DRA. MARIA DEL ROSARIO GARCIA
MATEOS

VOCAL

DR. MARCOS SOTO HERNANDEZ

SECRETARIO

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA
ESPINOSA



Universidad Autónoma Metropolitana

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Análisis e identificación de reguladores del crecimiento
vegetal en una composta**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

Sustenta

M. en B. Ignacio García Martínez

Director de Tesis

Dr. Francisco Cruz Sosa

Diciembre 14, 2014

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93

INDICE

JUSTIFICACION	1
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	7
COMPOSTA.....	7
TIPOS DE COMPOSTA	9
USOS DE LA COMPOSTA	10
Control de enfermedades en los cultivos	11
APLICACIONES INNOVADORAS DE LA COMPOSTA.....	17
“BIOESTIMULANTES” como aditivos del suelo	17
REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	24
Ácido abscísico (ABA).....	27
Auxinas (AIA)	29
Citocininas (CIT)	31
Giberelinas (GAs).....	32
Etileno	34
NUEVOS RCV	35
Oligosacaridos	35
Un Segundo Mensajero: Iones de Calcio.....	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS	38

PRIMERA PARTE

PRIMERA PARTE	39
ESTABLECIMIENTO DE LAS TECNICAS	39
CARACTERIZACION DEL MATERIAL	39
EXTRACCIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	40
EXTRACCION.....	40
PURIFICACION E IDENTIFICACION	41
Primera purificación	41
Partición	42
Segunda purificación.....	43
Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	43
TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE RCV	43
Abscisinas y Auxinas	44
Citocininas.....	48
Giberelinas	51
IDENTIFICACION DE RCV (TLC).....	54
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA (BIOENSAYOS)	54
ABSCISINAS.....	56
Inhibición de la elongación del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	56
Inhibición de la germinación de <i>Lepidium sativum</i> L.....	58
Inhibición de la elongación de la raíz de <i>Lepidium sativum</i> L. y <i>Triticum</i> <i>aestivum</i> L.....	58

AUXINAS	59
Prueba del cilindro del coleóptilo de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	61
Elongación de la raíz de <i>Triticum aestivum</i> L. y <i>Lepidium sativum</i> L.	62
CITOCININAS	62
Acumulación de betacianinas en <i>Amaranthus hybridus</i> L.	63
Germinación de <i>Lepidium sativum</i> L. y <i>Amaranthus hybridus</i>	64
GIBERELINAS	65
Prueba de crecimiento del tallo del chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	65
RESULTADOS y DISCUSIONES	66
ANÁLISIS DE LA COMPOSTA	66
EXTRACCIÓN DE RCV	68
IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE RCV (TLC)	71
BIOENSAYOS.....	75
TLC-BIOENSAYO	78
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RCV	79
Análisis cuantitativo de ABA.....	80
Análisis cuantitativo de AIA	84

SEGUNDA PARTE

SEGUNDA PARTE	93
EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS	93
PRÓLOGO	93
EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE RCV	94

AUXINAS	94
CITOCININAS	97
GIBERELINAS	99
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	102
CONCLUSIÓN.....	105

TERCERA PARTE

TERCERA PARTE.....	106
EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RCV.....	106
PRÓLOGO.....	106
INTRODUCCIÓN	107
METODOLOGÍA.....	109
CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL	109
EXTRACCIÓN DE AUXINAS	111
EXTRACCIÓN DE GIBERELINAS.....	114
PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	116
IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC)	117
TLC / HPTLC.....	118
IDENTIFICACIÓN DE AUXINAS Y GIBERELINAS	121
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA (BIOENSAYOS)	122
AUXINAS	123
Bioensayo del coleoptilo de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	124

Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíz de <i>Lepidium sativum</i> L. y <i>Triticum aestivum</i> L	126
GIBERELINAS	127
Bioensayo de la prueba del crecimiento del tallo de chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	128
RESULTADOS y DISCUSIÓN	130
CONCLUSIÓN	130
BIBLIOGRAFÍA	130

Análisis e Identificación de Reguladores del Crecimiento Vegetal en una composta

JUSTIFICACION

La influencia del hombre sobre el equilibrio ecológico data de su aparición sobre la Tierra y ha supuesto una regresión de los sistemas naturales, en relación con el estado que se podría suponer más probable si la especie humana no hubiera existido o no hubiera estado presente en la biosfera terrestre.

R_F

Durante miles de años el hombre sólo ejerció una reducida influencia sobre el medio ambiente. Al igual que los demás animales, el hombre actuaba como depredador o competidor en las comunidades naturales de las que formaba parte, y se veía sometido a las consecuencias derivadas de los cambios ambientales y ecológicos que le obligaban a adaptarse o buscar en otro lugar los elementos fundamentales para su sobrevivencia.

Actualmente la sociedad genera miles y miles de toneladas de desperdicios. La basura ensucia todo cuanto encuentra a su paso y sin embargo, estamos acostumbrados a producirla, más aún en una sociedad donde la industria, en general, tiene productos residuales que contaminan y destruyen el ambiente por su contenido o envolturas de difícil biodegradación (Crawford, 1983; Chongrak, 1989, Romani, 1991; y Dean, 1993).

Así, en los últimos años se han acentuado considerablemente los problemas ecológicos, rompiéndose con el equilibrio sociedad-naturaleza como una consecuencia de la falta de voluntad colectiva para preservar el medio ambiente (SEDUE/INE, 1991-1992 y Trejo, 1994). Durante la década pasada, los habitantes de la Ciudad de México desecharon sólo en el ámbito domiciliario más de siete mil toneladas diarias de basura, es decir, 824 g/día/habitante; en su mayor parte, desechos orgánicos tanto de cocina como de jardín, papel y en menor medida, plástico y vidrio (Mass y García-Oliva, 1990; Romani, 1991; y SEDUE/INE, 1991-1992).

Por otra parte, pocos aspectos del medio rural reflejan en forma tan nítida las influencias de los factores físicos en su formación e incesante transformación, como parte superficial donde crecen las plantas, denominada suelo. Este como cualquier otro medio no estático sino que está en constante cambio, producto de la acción de los fenómenos naturales y de la intervención del hombre con sus actividades agrícolas, ganaderas y forestales, que contribuyen a la conservación o destrucción de los suelos, por tal motivo al considerar estas actividades entra en juego factores de diversa índole (Romo de Vivar, 1985; Romani, 1991; Rodríguez, 1994; y Trejo, 1994).

En un país predominantemente agrícola como el nuestro, no se puede dudar de la importancia de los suelos, sin embargo el uso excesivo e indiscriminado de fertilizantes químicos, acarrea una serie de inconvenientes, los cuales tienen un impacto a corto y mediano plazo (Romani, 1991; y Rodríguez, 1994).

Una herramienta auxiliar en el tratamiento de los residuos sólidos tanto municipales como agrícolas son los procesos de composteo, obteniéndose de estos un producto estable, con una gran carga orgánica y microbiana. La aplicación de compostas para el mejoramiento de cultivos y sus demostradas ventajas en cuanto a sus características estructurales de suelos mejorados y su incrementada disponibilidad de nutrientes, en este rol, promoviendo un mejor acondicionamiento y nutrientes al suelo. Por tal motivo su uso surge como una alternativa viable, pero existen fenómenos que hasta el momento no tienen explicación alguna a su aplicación, como son la disminución en el tiempo de floración, fructificación, etc., el aumento en el tamaño de talla y frutos, su actividad como bioinsecticida, entre otros (Weaver, 1972; Smith, 1989; 1992; Levi-Minzi et al., 1990; Iglesias-Jiménez y Alvarez, 1993; Hue et al., 1994; Giusquiani et al., 1995; EPA (1997) y Santamaría-Romero *et al.* 2001), lo cual permite suponer la presencia de sustancias probables reguladores del crecimiento vegetal en dicho material, ya que estos han sido empleados en la agricultura produciendo una amplia gama de respuestas fisiológicas similares a las obtenidas a la aplicación de compostas (Larqué y Reyes, 1988). La meta final en todo proyecto de aplicación de compostas, es devolver al sitio a su condición de suelo agrícola, lo cual incluye, a menudo, reforestación o revegetación, para estabilizar el suelo tratado, además de aumentar los niveles de materia orgánica, la composta facilita el crecimiento de las plantas.

Finalmente, el medio ambiente ha sido uno de los principales aspectos para la negociación de los Acuerdos Paralelos del Tratado de Libre Comercio y su

concretización y vigilancia asegurarán un impacto positivo en la materia. Algunos de los beneficios de los acuerdos paralelos pudieran ser significativos en materia ambiental. Sin embargo, también emanan obligaciones tales como: "Las naciones están obligadas a reportar la situación de su medio ambiente, a promover la educación e investigación científica y tecnológica en materia ambiental" (Dean, 1993).

INTRODUCCION

En los últimos años, se han acentuado considerablemente los problemas ecológicos. En la actualidad, la necesidad de mejorar el medio ambiente ha promovido diversos procesos que permitan el reaprovechamiento integral de los residuos sólidos, de los cuales se pueden obtener productos o materias primas de importancia para la industria. La basura generada en las comunidades está compuesta por diversos materiales, los cuales varían según el clima, el grado de urbanización y el estrato socioeconómico. La materia orgánica biodegradable (aproximadamente 38% del total de la basura generada), no cuenta con un mercado, presentándose como un problema que afecta al medio; pudiéndose destinar a la producción de composta que tiene un valor agregado (SEDUE/INE, 1991-1992; y Trejo, 1994).

El composteo es una oxidación biológica exotérmica de la materia orgánica, llevada a cabo por una sucesión dinámica y rápida de poblaciones microbianas aerobias. La materia orgánica heterogénea inicial, es transformada, después de un período

de composteo conveniente, el cual incluye fases biooxidativas y de maduración, en un producto final estabilizado a través de su mineralización y humidificación (Crawford, 1983; y Bidlestone y Gray, 1991).

Así, una respuesta al manejo y disposición de los residuos sólidos biodegradables, es el establecimiento de técnicas para la elaboración de compostas, debido a la alternativa que ofrecen como forma de manejo de los residuos sólidos biodegradables y a las conocidas ventajas reportadas en cuanto a su uso agrícola. La producción de compostas tiene que estar sujeta a ciertas condiciones, quizá por la diversidad de procesos que implica o por lo no pocos factores que la influyen, es una actividad que demanda de manera importante la estandarización de la calidad del producto obtenido, como única garantía ante la posible ocurrencia de fenómenos que la convertirían en un problema superior en magnitud a la que con su implementación pretende resolver (Melino et al., 1982; Kuhlman, 1990; Smith, 1992; Tchbanoglous et al., 1993; Iglesias-Jiménez y Alvarez, 1993; y Rodríguez, 1994).

Las características físicas, químicas, fisicoquímicas y microbiológicas de las compostas y su efecto en el sistema suelo-planta, son aspectos en que ha de basarse su empleo agrícola y constituyen de momento, una información no disponible. La evaluación de las compostas en cuanto a su grado de maduración, el proceso por el cual se obtuvieron y su aplicación como biofertilizantes son factores importantes para incrementar el interés en el uso de éstas como alternativa de los fertilizantes químicos y el *peat moss*, para el mejoramiento de suelos empobrecidos y cultivos (Crawford, 1983; Alvarez et al., 1995; y Giusquiani et al., 1995).

Sin embargo, todas las respuestas que puedan encontrarse al incorporar nutrientes al suelo, repercuten directamente en la planta, sin embargo, gran parte del desarrollo de las plantas está mediado por estímulos generados en el interior de sus órganos o como resultado de la organización que han alcanzado. Por ejemplo, una célula aislada de un órgano vegetal en desarrollo y cultivada *in vitro*, generalmente se divide y crece como lo haría *in vivo*. Pero en cultivo generalmente se tiene un crecimiento tumoral que da una masa informe de células en tanto que en el tejido intacto se tendría la producción de una hoja, raíz o tallo según lo dicte la posición de la célula en el organismo. Así, esta clase de control es un resultado, a la vez que una causa, del crecimiento organizado. La proximidad de células o grupos de células tejidos u órganos- permite la transferencia de metabolitos y otros compuestos, de modo que las reacciones metabólicas pueden estar influenciadas por los gradientes de los metabolitos que gobiernan el metabolismo celular según su posición en el organismo.

Además, el desarrollo puede ser afectado o controlado por hormonas, compuestos que se sintetizan en un lugar del organismo y se transportan a otro, donde actúan regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo de modos específicos y a muy bajas concentraciones. Generalmente el efecto de las hormonas es indirecto y son activas en pequeñísimas cantidades; por lo tanto, el efecto de los metabolitos, nutrientes y compuestos análogos, ya sea directamente sobre el metabolismo o indirectamente como inductores o co-represores, no constituye una acción hormonal. En realidad es muy difícil definir el término hormona vegetal con

precisión. Muchas sustancias de tipo hormonal pueden actuar en su lugar de síntesis, actuar al parecer de modo no específico o actuar (como lo hacen algunos metabolitos) a nivel genético, como inductores o represores. A menudo se prefiere el término fitoregulator refiriéndose a compuestos naturales o sintéticos que inducen respuestas en el crecimiento, el desarrollo o el metabolismo. En general estas sustancias no son metabolitos en el sentido de que no son intermediarios ni productos en las vías de transformación que controlan, y son activas a muy bajas concentraciones. Aunado a esto el empleo de hormonas vegetales en la agricultura ha estado ligado a algunas respuestas fisiológicas por parte de los cultivos como enraizamiento, floración, maduración del fruto, abscisión, inhibición de brotes, supresión del crecimiento y defoliación (Bidwell, 1979 y Larqué y Reyes, 1988).

ANTECEDENTES

COMPOSTA

Como una alternativa para remediar el gran perjuicio que representa la contaminación por desechos sólidos, se han realizado investigaciones para transformar la materia orgánica en productos de utilidad para la agricultura; Es de esta manera que se industrializan los procesos de composteo, los cuales al llevarse a cabo en forma científica adecuada, pueden contribuir a la solución de importantes problemas que aquejan a las sociedades modernas.

La utilización de los procesos de fermentación en medio sólido han servido para aprovechar diferentes residuos de origen agrícola, agroindustrial y municipal. Se han estudiado residuos como son: pajas, rastrojos, bagazos y pulpas, así como

también la fracción biodegradable de los residuos sólidos urbanos (basura); para la producción de antibióticos, enzimas, alimento destoxificado para ganado, biofertilizantes y sustrato para el cultivo de hongos comestibles. En todos los casos empleando las técnicas de fermentación sólida como una alternativa tecnológica eficiente (Melino *et al.*, 1982; Kuhlman, 1990; Staff of Biocycle, 1991; Iglesias-Jiménez y Pérez-García, 1992; y Tchbanoglous *et al.*, 1993).

El composteo es un proceso de fermentación aerobia en fase sólida en el que se aprovecha el fenómeno de "autocalentamiento" de las diferentes poblaciones microbianas nativas, que se suceden para la biodegradación total o parcial de la materia orgánica, bajo condiciones controladas, con el objetivo de obtener un producto estable denominado composta.

La composta es un producto negro, homogéneo y por regla general, de forma granulada, sin restos gruesos. Al mismo tiempo es un producto húmico y cálcico, obtenido de la fermentación sólida de los residuos orgánicos (composteo) (Crawford, 1983; Chongrak, 1989; Kuhlman, 1990, 1992; y Giusquiani *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista ecológico, es bien conocido por todos los agricultores que con buenos contenidos de materia orgánica, se eliminan o reducen problemas de erosión eólica o hídrica. En resumen, la adición de composta a los suelos favorece las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, haciendo crecer a las plantas más vigorosas y con mayor resistencia para algunas plagas y enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus (Gray *et al.*, 1973; Smith, 1992; y Flanagan

et al., 1993; y Sawhney y Shukla, 1994).

A pesar de la gran respuesta a la aplicación de compostas para el aumento en la producción de cultivos, y su demostración a través de sus características estructurales de suelos mejorados y disponibilidad de nutrientes incrementada, aún hay fenómenos para los que no se encuentra alguna explicación a su presencia, así pues hay una disminución en el tiempo de floración, fructificación, un aumento en el tamaño de los frutos y otros aspectos más (Weaver, 1972; Giusquiani *et al.*, 1989; Levi-Minzi *et al.*, 1990; Smith, 1992; Iglesias-Jiménez y Alvarez, 1993; Hue *et al.*, 1994; y López-Sánchez, 1996).

TIPOS DE COMPOSTA

Muchos residuos orgánicos considerados como basura se utilizan para obtener productos con valor agregado, mediante el composteo. Éste como se menciona es un proceso bio-oxidativo de transformaciones microbianas en condiciones controladas. Cuando en el proceso, participan lombrices se le llama vermicomposteo. En ambos casos se desarrollan eventos físicos, químicos y biológicos que provocan cambios en el material orgánico en cierto periodo de tiempo.

El composteo permite obtener abono orgánico para los cultivos. Diversos investigadores han analizado el contenido nutrimental y microbiológico de materiales que han sido sometidos al proceso de composteo o vermicomposteo con el fin de evaluar su calidad. En la calidad final de la composta intervienen

factores como tipo de sustrato (residuos orgánicos) y los que manipula el hombre (aireación, humedad, pH, temperatura y la especie de lombriz en el vermicomposteo). Por lo tanto, para conocer lo que ocurre durante el composteo y evaluar la calidad del producto obtenido.

Las características químicas y microbiológicas de las compostas y vermicompostas son muy semejantes. Sin embargo, la respuesta de los cultivos a la aplicación de vermicomposta suele ser en ocasiones superior a la de la composta convencional, con el fin de evaluar la calidad y las diferencias de esos dos tipos de composta se analizan los contenidos de carbono orgánico y nitrógeno total entre otros (Santamaría *et al.*, 2001 y Corday *et al.*, 1999). No es nuestro objetivo el decir cual es mejor sino simplemente se estableció un análisis comparativo de la presencia de reguladores del crecimiento vegetal en muestras de composta y vermicomposta.

USOS DE LA COMPOSTA

Como se ha mencionado el empleo de la composta es diverso y recientemente se han encontrado nuevas aplicaciones que van desde fertilizantes orgánicos, mejoradores del suelo y para tratar enfermedades y plagas que ataca los cultivos.

El uso de composta en la agricultura es una herramienta valiosa, ya que su empleo promueve un mayor rendimiento en los cultivos, además de impulsar la agricultura sustentable. Los agricultores están descubriendo que el suelo enriquecido con composta puede también ayudar a prevenir enfermedades y proteger de parásitos a los cultivos. Estas y otras aplicaciones se ven reflejadas al disminuir los costos de

producción, reducir el uso de pesticidas y así conservar los recursos naturales.

Control de enfermedades en los cultivos

Cada año, más del 10% de los cultivos se pierde por diversas enfermedades. Muchas de estas enfermedades son causadas por microorganismos patógenos (por ejemplo *Pythium spp*) que atacan los cultivos desde diversos puntos, raíz, hojas, tallos etc.; siendo en su gran mayoría aislados del suelo, en donde encuentra un nicho adecuado para poder reproducirse y propagarse. El empleo de compostas para mejorar suelos agrícolas, también posee la característica de ayudar al control y prevención de las enfermedades de las plantas y así poder reducir pérdidas en la cosecha. Pero este control de plagas y enfermedades se ha atribuido a cuatro mecanismos posibles, derivados del empleo de la composta:

- 1) Competencia por los nutrientes entre microorganismos no patógenos (composta) y patógenos (nativos del suelo).
- 2) Producción de metabolitos (hormonas vegetales, antibióticos, etc.) por microorganismos no patógenos nativos de la composta.
- 3) Depredación contra patógeno por los microorganismos nativos de la composta.
- 4) Activación de genes promotores de la resistencia a enfermedades en plantas (antibióticos, hormonas, etc.).

El uso de compostas ha promovido el estudio de su capacidad natural para prevenir, suprimir o curar enfermedades, dada la incorporación de microorganismos, metabolitos específicos o precursores de estos contra las enfermedades. La

existencia de esta especificidad, puede promover su aplicación a cosechas infectadas, con buenos resultados. Investigaciones recientes han mostrado que el empleo de composta redujo o substituyó perceptiblemente la aplicación de los pesticidas, fungicidas y nematocidas, sin afectar los recursos naturales como fuentes de agua, proporciona seguridad de la cosecha y del trabajador.

Su uso puede también ser más rentable que los tratamientos químicos del suelo, tales como bromuro metílico. El suelo tratado con composta conserva el agua de la irrigación mejor, bajando los costos en el uso de agua. Los productos químicos también se deben aplicar más a menudo que la composta. Además, algunos productos químicos tienen requisitos sobre su uso como por ejemplo: al ser aplicados al campo prohíben su acceso inmediato posterior a su aplicación en un lapso de tiempo, reduciendo así la productividad del trabajador (EPA, 1997a, b, c, d; EPA, 1998).

Hoitink y Fahy (1986), estudiaron los efectos del uso de compostas sobre las plantas infectadas con *Pythium spp.* el cual ataca la raíz produciendo la putrefacción de esta. Observó que el uso de composta tenía un efecto positivo en el crecimiento vegetal, ya que impidió la extensión de la enfermedad. También observó que al abonar el suelo de un ingenio azucarero, reporto un aumento del 15 % en la producción, este aumento se debió al parecer a la supresión de enfermedades en los cultivos.

Marvil *et al.* (1997) emplearon composta elaborada a partir de los residuos sólidos

municipales, la cual se aplicó a las cosechas de chile, en un campo que se sabía estaba contaminado con *Phytophthora*, utilizaron cuatro tratamientos: 10, 20, 30, y 50 toneladas de composta por acre. Otra sección del campo, donde no se aplicó composta, fue utilizada como control. Se determinaron los efectos de la enfermedad posterior a la aplicación, altura de una planta, características del fruto, y rendimiento por acre.

El estudio mostró que el contenido de “nutrientes y sales” que proporciona la composta desempeña un papel integral en la eliminación de enfermedades y el aumento de la producción. Los tratamientos de 10 y 20 toneladas por acre proporcionaron cultivos sanos y una mayor producción. El tratamiento de 50 toneladas dio lugar a producciones bajas. El control y el tratamiento de 30 toneladas produjeron producciones similares. Las pérdidas en el tratamiento de 30 y 50 toneladas fueron atribuidas a las altas concentraciones de nutrientes (sales principalmente) presentes en la composta, este efecto debilitó los cultivos haciéndolos más susceptibles a plagas y enfermedades. Los mejores resultados se debieron a la mezcla óptima composta-suelo, por lo cual es necesario determinar los parámetros mínimos y máximos de composta a incorporar, pues cada caso es específico. Esto debido a la sensibilidad de los cultivos a los componentes de la composta.

En cuanto a compostas comerciales la EPA (1998) ha probado el efecto de Agrisoil (composta hecha a partir de los residuos sólidos municipales) y Daorganite (una mezcla de biosólidos provenientes de una planta de tratamiento de aguas

residuales, los cuales fueron tratados térmicamente), ambas muestras se aplicaron en un campo experimental de una granja en la Florida. La composta de Agrisoil fue aplicada de acuerdo a los siguientes tratamientos: 36 toneladas por acre y 72 toneladas por acre, mientras que Daorganite fue aplicado en los índices de 0.67 toneladas por acre y de 1.33 toneladas por acre. Una sección del campo fue dejada sin aplicación para que sirviera como control. Seis semanas después de que los materiales fueron incorporados al suelo, se sembraron habas (bus beans). Posterior a la cosecha de haba, una segunda cosecha de frijoles (black-eyed peas) fue sembrada, aplicándose el mismo tratamiento de fertilización de compostas previamente establecido. El campo control fue fertilizado según las prácticas agrícolas locales validadas y usadas habitualmente.

La calidad de los cultivos y los rendimientos de las cosechas de haba fueron mejoradas perceptiblemente por la composta. Las habas crecidas en la composta de Agrisoil eran más grandes y más sanas. La producción en ambos tratamientos, 36 y 72 toneladas por acre de aplicación eran 25 por ciento más altas en ambos casos que la producción del área de control. Las habas crecidas en la mezcla de Daorganite mostraron una producción relativamente más baja que el control. Además, los cultivos crecidos en el control y en el tratamiento con Daorganite presentaron infección en la raíz con *Rhizoctonia*, pero no los cultivos tratados con Agrisoil.

Los cultivos y cosechas de frijol obtenidas con la fertilización con composta también fueron mejorados perceptiblemente. Estas cosechas tenían follaje más verde y eran

más grandes que las crecidas en el control o con los tratamientos de Daorganite. La producción obtenida a partir de la aplicación de composta, aumento a más del doble en ambos tratamientos (72 y 36 tonelada por acre) en comparación con el control. Por otra parte las producciones en las áreas tratadas con Daorganite fueron ligeramente más altas o casi similares al control. La putrefacción de la raíz por *Rhizoctonia* afectó seriamente los cultivos en las áreas tratadas con Daorganite y el control, pero en el área fertilizada con composta, la plaga era considerablemente menos frecuente o casi nula que en las otras áreas.

Finalmente llegaron a la conclusión de que la composta de Agrisoil era más eficaz en la supresión de la enfermedad que la mezcla de biosólidos sometidos a un tratamiento térmico de Daorganite. Además que las producciones eran más altas en las áreas tratadas con Agrisoil que en las áreas tratadas con Daorganite y el control.

El mercado de la composta de alta calidad incluye jardineros, floricultores profesionales e invernaderos, propietarios de jardines, cultivadores de césped, y a granjeros o agricultores. Los invernaderos compran aproximadamente 250 millones de dólares por año en productos de composta en USA.

Otro aspecto del empleo de la composta como fertilizante, es que puede suprimir algunos tipos de parásitos, tales como infecciones parasitarias por nematodos (gusanos y/o lombrices), además de su uso en el control de plagas y enfermedades. La composta debidamente caracterizada y formulada puede incluir productos químicos que eliminen a nematodos o evitan su reproducción, cortando su ciclo de

vida. La mayoría de las compostas ayudan a controlar parásitos proporcionando los nutrientes suficientes al suelo, que promueve el crecimiento de hongos y otros organismos que, alternadamente, compiten con estos parásitos. La composta también contribuye a la salud de los cultivos y plantas, haciéndolas menos susceptibles a los parásitos y por consecuencia mas resistentes a las plagas.

Estudios recientes han encontrado la capacidad de la composta como bioinsecticida, pues el uso de esta promueve una reducción significativa en la concentración de nematodos "rootknot". Marvil *et al.* (1997) corroboraron esta capacidad al realizar un experimento, el cual consistió en cosechar tomates en una parcela, dividiendo a esta en cuadrantes, cada cuadrante representaba un tratamiento; se empleo dos tipos de composta como único fertilizante, comparándolos con suelos fertilizados como habitualmente se hacia, empleando fertilizantes y fumigaciones químicas y, comparando los cultivos. No se encontró ningún problema de plaga o enfermedad en alguna de las fracciones de la parcela excepto uno. Este tenía una pequeña invasión de nematodos "rootknot" en una esquina del campo. La infección era evidente en los cultivos hasta la línea divisoria entre los tratamientos con composta y los que se utilizo otro tipo de fertilización, de tal forma que el resultado era similar entre los tratamientos, solo que la diferencia se reflejaba en los costos, pues resultaba mucho mas barato el emplear compostas que la fertilización tradicional.

Una nueva alternativa que aún se encuentra en fase experimental es el empleo de composta "mejorada", esta se emplea como bioinsecticida, este tipo de composta

es convertida en bioinsecticida cuando durante su elaboración en la última fase se agregan cantidades controladas de microorganismos capaces de producir bioinsecticidas naturales, obteniéndose así una composta enriquecida y con una capacidad pesticida específica, aun tiene que pasar algún tiempo para poder establecer este proceso y producto comercialmente, además de experimentar al mismo nivel que los pesticidas químicos para determinar su eficacia y su seguridad para la salud y el ambiente. Aun hace falta que este tipo de composta “mejorada”, sea colocada ya como un biopesticida por las agencias gubernamentales (EPA, SEMARNAP), mientras tanto se continuará con las investigaciones.

APLICACIONES INNOVADORAS DE LA COMPOSTA

“BIOESTIMULANTES” como aditivos del suelo

Las sustancias que, en cantidades pequeñas, promueven el crecimiento vegetal son denominados bioestimulantes. Muchos de estos bioestimulantes se pueden encontrar de manera comercial. Con un uso apropiado, algunos pueden promover la resistencia a enfermedades y plagas, y mejorar la calidad de los cultivos.

Varios bioestimulantes comerciales para plantas existen en el mercado, pero generalmente estas son capaces de producir los que necesitan. En muchos casos, sin embargo, se ha demostrado que sus adiciones externas por aspersión foliar o a las raíces han proporcionado ventajas a las plantas, al hacerlas más vigorosas y resistentes a enfermedades. Los inhibidores del crecimiento son tan importantes como los estimuladores del crecimiento. Algunos residuos de planta como: algas

marinas y yuca son fuentes de algunos bioestimulantes, la composta posee también esta característica. La composta representa la más grande fuente de estos bioestimulantes, pues dentro del proceso de composteo intervienen algunos consorcios microbianos, que pueden ser productores de estos o de algún precursor.

Diversos tipos de productos se incluyen en la lista de mejoradores de las plantas o fertilizantes orgánicos. Solamente los que consideraremos en este momento serán los bioestimulante, será una introducción solamente a un amplio campo del estudio que ha dado lugar a nuevas investigaciones en este campo. Una revisión más extensa en el futuro cercano se espera especialmente puesto que una de las metas de la Biotecnología es producir bioestimulantes para repuntar la producción agrícola.

Se ha encontrado que las compostas pueden contener bioestimulantes, debido a los resultados obtenidos al aplicarla a los cultivos, obteniendo una mayor producción y cultivos más vigorosos, este es el resultado de algún compuesto específico generalmente no identificado. Generalmente las plantas sintetizan sus "phytohormonas" o reguladores del crecimiento vegetal necesarios. Algunos reguladores del crecimiento vegetal son: giberelinas, citocininas y auxinas. (Schmidt 1990).

Chen et al., 1994: estudio las características de las sustancias húmicas que se originaban del composteo. Una fracción de componentes de bajo peso molecular de

la composta son absorbidos por las plantas. Estos componentes aumentan la permeabilidad de la membrana celular y tenían actividad de regulador del crecimiento vegetal. La adición de composta al suelo estimula el crecimiento más allá de los efectos proporcionados por los nutrientes minerales. Además de un aumento significativo de la producción que fue atribuido a las sustancias húmicas de esta. Aisló algunos extractos obtenidos de las compostas y observó que presentaban actividad biológica de auxina.

Las presentaciones comerciales de bioestimulantes presentan poca o nada de información científica. Evidentemente, el pensamiento es que si contiene una diversidad de materiales en la mezcla, alguno realizará la función para lo cual se vende, sin embargo existen productos que no causan beneficio alguno a los cultivos. La pregunta que se presenta es, ¿por qué unos estimulan y otros no? La respuesta no es tan simple, pues algunas de estas formulaciones complejas, contienen algunos materiales relativamente simples, quienes son los causantes de estimular el crecimiento vegetal.

Abundan las anécdotas populares sobre las ventajas de algunos bioestimulantes naturales. Una mujer de la isla del Sur de Nueva Zelanda dice que su jardín crece más vigorosamente porque abono el suelo con las hojas de té usadas. Así como esta existen una gran variedad de anécdotas sin fundamento científico alguno. Las experiencias personales no deben ser descartadas totalmente, pero la investigación

científica es más comprensiva y confiable. Así, la mejor manera de evaluar a los bioestimulantes es con investigación.

Antes de entender las ventajas de los bioestimulantes, debemos comprender el papel de las hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal (RCV), pues muchas de las ventajas que proveen los bioestimulantes se arraigan en su capacidad de influenciar actividad hormonal de las plantas.

Los reguladores del crecimiento vegetal son mensajeros químicos que regulan el desarrollo normal de la planta así como respuestas al ambiente. Regulan el crecimiento y la diferenciación del tejido, dictando cuando las plantas crecen y maduran. Además, las plantas pueden detectar ambientes desfavorables a través de varios RCV. Algunas de las categorías principales de los RCV son:

Citocininas. Estas hormonas son responsables de la formación de raíces y de brotes y promueven la división celular, las citocininas tienden a evitar los efectos del envejecimiento en las plantas.

Auxinas. Las hormonas en este grupo producen varios efectos del crecimiento en las plantas, especialmente la elongación celular (puesta en contraste con el crecimiento citocinina-inducido, que resulta de la división de la célula). La ampliación

de la célula causa el alargamiento de la raíz y el aumento de la talla y permite que produzcan respuestas tales como que los tallos se doblan hacia una fuente de luz (fototropismo) y las raíces que crecen hacia abajo (geotropismo). El ácido-3-indol acetico (AIA) es quizás la auxina más conocida.

El ácido giberélico (GA_3) es otro promotor del crecimiento empleado para producir el alargamiento en plantas, también desempeña un papel crítico en promover la germinación.

El ácido abscísico (ABA) induce o prolonga senescencia en plantas y también acelera la abscisión, el ABA se considera generalmente como un inhibidor del crecimiento, más que promotor. El ABA también está implicado en la regulación del agua dentro de las plantas. Los niveles del ABA se levantan en plantas bajo estrés de sequía, encontrado en las hojas, donde el ABA promueve el cierre de los estomas. El equilibrio de las hormonas dentro de una planta es una interacción compleja que controla su crecimiento y desarrollo total. Así, los materiales que alteran el estatus hormonal de una planta pueden ejercer enormemente sobre su crecimiento y salud. Los radicales libres y los antioxidantes son otro grupo de productos químicos importantes para la planta. Al parecer, algunos bioestimulantes promueven la producción de antioxidantes.

Schmidt y Zhang (1999) encontraron que los aumentos de la actividad antioxidante (tal como vitamina E, vitamina C y betacaroteno) se ve favorecida cuando el césped ha sido abonado con composta. La aplicación de los bioestimulantes promueve la actividad antioxidante de las plantas. Además, las plantas con los altos niveles de antioxidantes promueven mejores plantas en cuanto a talla y raíz, evitan la deshidratación y disminuyen la incidencia a enfermedades en ambientes normales e inhóspitos.

¿Pero que sustancias son bioestimulantes? Un bioestimulante es definido por sus efectos (por lo que hace) que por lo que es, puesto que la categoría incluye una diversidad de sustancias. Mientras que el nombre sugiere, estimulación del crecimiento, estos hacen mucho más. La tolerancia al estrés, la sequía y la resistencia a las enfermedades son quizás las ventajas más importantes que los bioestimulantes proporcionan, también estimulan el crecimiento de la raíz y promueven la actividad antioxidante. Sin embargo, todavía existen muchos aspectos a estudiar sobre la actividad de los bioestimulantes y su caracterización.

Durante los últimos 10 años se han estudiado y evaluado diversas fuentes de bioestimulantes, dentro de los principales materiales estudiados, los que mejores resultados han proporcionado son: el extracto de algas marinas, el ácido húmico (compostas), los aminoácidos, el benzyladenine, trinexapac-ethy, propiconazole, ácido salicílico y los silicatos. Todos estos productos ejercieron influencias positivas con efectos hormonales o elevando los niveles de antioxidantes.

Aunque los bioestimulantes pueden ser productos químicos sintetizados, los materiales orgánicos son fuentes excelentes de bioestimulantes. Por ejemplo, la composta (ácido húmico) y el extracto de algas marinas son dos bioestimulantes mas comúnmente usados y con los mejores resultados obtenidos.

Las algas marinas contienen varias hormonas, vitaminas, aminoácidos y otros componentes. De tal forma que pueden tener efectos diversos en las plantas. El principal efecto se ve reflejado en cultivos que crecen en ambientes de alto estrés, creciendo normal y vigorosamente, este crecimiento se ha atribuido a su potencial actividad hormonal, especialmente la de citocininas y auxinas.

La composta ha recibido una mayor atención en los años recientes. Las compostas contiene sustancias húmicas, pues son materiales orgánicos que se obtienen a partir de fuentes biológicas (es decir materia orgánica descompuesta). Son típicamente mezclas de varios tipos de compuestos, incluyendo los ácidos húmicos y fúlvicos. Se han encontrado que las compostas poseen actividad similar al de algunos reguladores del crecimiento vegetal.

A pesar de conocer los efectos que puede provocar al empleo de las compostas como bioestimulantes, aún no se sabe a ciencia cierta que o quienes son las sustancias responsables, dejando abierta la posibilidad de la presencia de

reguladores del crecimiento vegetal, siendo este el objetivo principal de nuestro trabajo.

Estos y otros empleos de la composta, así como sus efectos que aún no están bien establecidos, la escasa información al respecto que está disponible para evaluar la compatibilidad de las compostas como acondicionadores del suelo y fuente de nutrientes para usarse en la agricultura, deja abierta la pregunta acerca de la presencia de algún metabolito (Reguladores del Crecimiento Vegetal), compuesto análogo de éste o precursor.

REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

El concepto de hormona según la definición para los animales no se puede transferir fácilmente a las plantas. Por una parte ninguna planta posee un sistema tan eficiente de transporte de nutrientes como el torrente sanguíneo, por otra parte las plantas no tienen algún equivalente al sistema nervioso central de los animales para la integración y la coordinación de todas las actividades fisiológicas.

No obstante, las plantas regulan su crecimiento, programan su diferenciación, diversas rutas metabólicas en células, y - por lo menos parcialmente - la comunicación entre las células también. El intercambio celular de material es asegurado por las perforaciones de la pared celular en los intervalos regulares.

En la actualidad son generalmente reconocidos seis grupos de moléculas de reguladores del crecimiento vegetal, aunque es casi seguro que se descubrirán más

(Bidwel, 1979; Hubick y Reid, 1984; y Salisbury y Ross, 1992): Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Ácido Abscísico, Jasmonatos y Etileno.

Incluso ciertas definiciones clásicas no se aplican con la definición de hormona vegetal o phytohormona. También se puede hablar de reguladores de crecimiento vegetal. En cualquier caso no existiría una regulación del crecimiento vegetal sin ellas. De tal forma que 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 (Weaver, 1972; y Salisbury y Ross, 1992). Durante la pasada década, los métodos fisicoquímicos de análisis reportan una nueva nomenclatura, denominando ahora a tales compuestos como sustancias del crecimiento vegetal (Trewavas, 1979; y Brenner, 1981). Sin embargo esta nomenclatura no interferirá en los objetivos del presente trabajo siendo no tomada como un criterio de clasificación

Los RCV son moléculas pequeñas, se distribuyen de célula a célula por medio de los tejidos de la planta, como en el caso de las auxinas y citocininas o el espacio intercelular (etileno). Los RCV entran a la célula y regulan los procesos intracelulares, aunque apenas se está estudiando cual es su distribución en la célula o cual es método de transporte y algunos otros aspectos que aun se encuentran en de estudio.

Los RCV poseen un espectro amplio y complejo de acción en las plantas. En algunos ensayos se observan efectos inmediatos después de aplicar algún RCV,

mientras que otros efectos toman más tiempo. La razón de esta respuesta inmediata y otros efectos se está estudiando, sin embargo se ha establecido como causante a la actividad ciertas enzimas o lugares estratégicos de la célula, la cual envía la señal para una reacción inmediata.

El número de hormonas vegetales es pequeño, en comparación con las hormonas animales. Muchas hormonas animales, especialmente las macromoleculares tienen un espectro muy limitado de acción, la razón de este efecto se debe a la selectividad y la especificidad hacia una célula o tejido o del receptor respectivo (Trewavas, J.A. 1982,1983)

Las concentraciones de RCV como tales, no podían ser suficientes garantizar el desarrollo de una planta. La velocidad a la cual se transportan dentro del sistema vascular es dependiente en la transpiración que es así mismo dependiente del abastecimiento de agua, de la temperatura, entre otras. Es un proceso unidireccional similar al del torrente sanguíneo que ocurre en animales, un control en feedback es necesario, las concentraciones de RCV dentro del sistema vascular depende de la presencia de diversos factores, ya que sus valores no se pueden mantener constantes.

A pesar de las limitaciones en cuanto al conocimiento sobre los RCV, se siguen buscando las posibles respuestas a su regulación y así poder entender el desarrollo de las plantas. Desde un punto de vista químico los RCV pertenecen a las “sustancias secundarias de la planta”. Al lado de los RCV completamente

funcionales existen los intermedios de estos, aunque al parecer son biológicamente inactivos, existe la posibilidad que puedan modular el grado de efecto en el desarrollo de las plantas.

Casi todos los estudios se han realizado en angiospermas, y aunque algunas hormonas se han aislado en plantas menos desarrolladas (musgo y algas) son muy pocos los conocimientos sobre los efectos de los RCV en especies más primitivas. Existe por consiguiente ningún conocimiento sobre la evolución del sistema de los RCV.

Numerosos productos sintéticos producen efectos como de regulador del crecimiento vegetal. Estos tienen una importancia económica enorme como herbicidas o estimuladores del crecimiento en agricultura y horticultura modernas.

Ácido abscísico (ABA)

La fisiología de la abscisión ha sido estudiada enormemente incorporando nuevos conocimientos de su ejecución y el aislamiento e identificación del ácido abscísico. Inicialmente los estudios arrojaron resultados que relacionan el papel de las auxinas en este proceso, siendo esta hipótesis refutada al encontrar indicios de ABA

El ABA es un sesquiterpenoide de 15 carbonos sintetizado una parte en los cloroplastos y otra en plásmidos 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 (de 40 carbonos) 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.

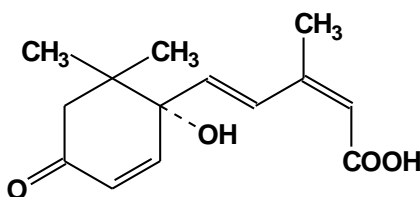


Figura 1. Ácido abscísico

El ABA es un regulador del crecimiento vegetal 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.

Este no es un promotor del crecimiento como las auxinas amén de poseer una estructura similar a estas. Sin embargo en combinación con otros reguladores tiene un efecto positivo en el crecimiento como sucede al incorporar ABA con giberelinas o con auxinas, en los medios provocando un efecto positivo.

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 a de las giberelinas (Milborrow, 1989; Weaver, 1972; Bonner y Varner, 1976; y Salisbury y Ross, 1992).

Auxinas (AIA)

Las auxinas fueron las primeras hormonas del crecimiento vegetal que se descubrieron. Sin embargo, el conocimiento de las auxinas es parcial, y las aplicaciones prácticas de las mismas continúan siendo una cuestión totalmente empírica. En la agricultura, el uso de compuestos análogos a las auxinas constituye una práctica muy rentable. Se ha calculado que el ahorro económico que se obtiene, en un año y en un país, mediante el uso de herbicidas selectivos, sobrepasa con mucho toda la inversión que se ha realizado en la investigación sobre hormonas vegetales en todo el mundo desde la antigüedad (Bandurski *et al.*, 1993).

Este 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. Las antiauxinas son compuestos que inhiben la acción de las auxinas, generalmente porque compiten con éstas por los mismos puntos de acción sobre una sustancia o sustancias receptoras.

La actividad de las auxinas se definió utilizando sistemas biológicos para ensayar efectos como el crecimiento y la curvatura del tallo. Estos bioensayos condujeron a la determinación de la estructura química del ácido-3-indol acético (AIA), siendo este el representante de este grupo, así dentro de las auxinas el ácido-3-indol acético (AIA) ha sido identificado como un constituyente endógeno de un gran número de

plantas superiores, 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 (IBA)) que provocan algunos efectos similares a éste. (Salisbury y Ross, 1992; y Bandurski *et al.*, 1993). La estructura del AIA es la siguiente:

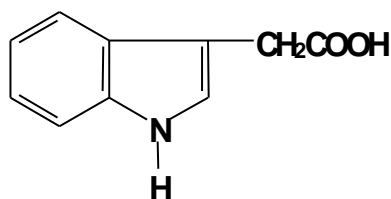


Figura 2. Ácido indolacético

El AIA es químicamente similar al aminoácido triptófano y probablemente es sintetizado a partir de éste. Se conocen dos mecanismos para la síntesis del AIA, ambos involucran la remoción del grupo aminoácido y del grupo carboxilo terminal de la molécula de triptófano. Las enzimas necesarias para la conversión del triptófano al AIA se encuentran más activas en los tejidos jóvenes, principalmente en primordios de hojas y hojas jóvenes, y en semillas desarrolladas.

Los múltiples efectos fisiológicos del AIA plantean un verdadero rompecabezas. El AIA interviene en la dominancia apical, en la promoción de la biosíntesis del etileno, en el enraizamiento de esquejes, en la extensión y elongación de las plántulas, en la promoción del crecimiento del cambium y en muchos otros procesos (Bidwel, 1979; Bandurski y Nonhebel, 1989; Salisbury y Ross, 1992; y Bandurski *et al.*, 1993).

Citocininas (CIT)

Los descubrimientos sobre un compuesto desconocido presente en los tejidos vasculares de diversas plantas que estimula la división celular, que causa la formación del cambium del corcho y la cicatrización de las heridas en tubérculos cortados de papa. Este descubrimiento fue la primer demostración de que las plantas contienen sustancias, en la actualidad conocidas como citocininas, que estimulan la citocinesis.

La aplicación de citocininas produce una gran diversidad de respuestas en las plantas, entre las que cabe destacar la inducción de la división celular. El primer “activador” de la división celular (citocinina) que se logró caracterizar fue la kinetina (quinetina o cinetina) 6-furfurilamino purina.

Las citocininas son compuestos sustituidos de adenina (con un anillo de purina) que promueven la división celular (citocinesis) en tejidos vasculares. Las citocininas se encuentran también como constituyentes de ciertas moléculas de RNA, en muchos tipos de organismos. La estructura básica de las citocininas puede ser ácida o bien alcalina. 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.

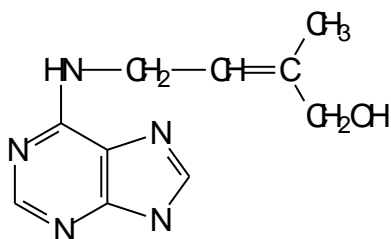


Figura 3. Kinetina (6-benzil furfurilaminopurina)

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 forma el isopentenil AMP a partir del AMP, de esta manera el isopentenil AMP es convertido a isopentenil adenosina por hidrólisis del grupo fosfato y ésta es convertida a isopentenil adenina por la hidrólisis del grupo ribósido, finalmente este compuesto puede ser oxidado a zeatina por la sustitución de un hidrógeno por un grupo -OH. Esto ocurre en las puntas de las raíces y semillas desarrolladas, se ha detectado también que existen altos niveles de citocininas en órganos jóvenes. Los niveles celulares de citocininas, son afectados por su degradación y su conversión a derivados inactivos diferentes a los nucleósidos y nucleótidos. Esta degradación ocurre, en gran parte, por la acción de la enzima citocinin oxidasa (Bidwel, 1979; Horgan, 1989; Salisbury y Ross, 1992; y Burch y McGaw, 1993).

Giberelinas (GAs)

Las giberelinas (GAs) actúan como reguladores del crecimiento y desarrollo en los vegetales superiores. La funcional hormonal que se otorga a las GAs se apoya en dos premisas básicas: Son compuestos orgánicos naturales de las plantas. Y su aplicación exógena produce una amplia variedad de respuestas del desarrollo. La inducción del crecimiento del tallo es, probablemente, el efecto fisiológico más

espectacular de las GAs.

Las giberelinas son compuestos isoprenoides, que tienen un esqueleto de giberelano y que estimulan la división o la elongación celular, o ambas. 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, pero con un diferente subíndice para distinguirlas entre ellas. El GA₃, la primer giberelina descubierta, la más activa y desde hace mucho tiempo disponible comercialmente, históricamente se conoce como ácido giberélico. 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.

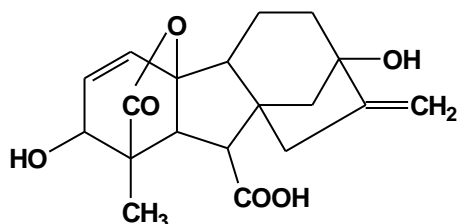


Figura 4. Ácido Giberélico (GA₃)

Su síntesis se ha demostrado principalmente en frutos y semillas en desarrollo, y en menor medida en las regiones apicales de los brotes en crecimiento. También existen indicaciones de que las GAs pueden sintetizarse en las raíces, aunque las evidencias en este caso son menores. También las semillas inmaduras de muchos vegetales contienen niveles relativamente elevados de GAs.

La aplicación exógena de GAs produce una amplia variedad de respuestas en los vegetales. La mayoría de estos estudios se han realizado con GA₃, que es un compuesto disponible comercialmente. Las GAs son moléculas extremadamente activas, y en general, unos pocos µg o incluso nanogramos (ng) son suficientes para inducir distintos efectos fisiológicos. Las GAs inducen elongación del tallo y floración en variedades genéticamente enanas y en plantas de día largo. En general su aplicación inhibe la floración en las angiospermas leñosas y en los frutales. También se observa una tendencia a producir flores masculinas en aquellas plantas que poseen flores con sexos separados. Las GAs también sustituyen los requerimientos de luz o frío que precisan muchas semillas para germinar (Bidwel, 1979; Russell y MacMillan, 1989; Salisbury y Ross, 1992; y Talón, 1993).

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. En particular, éste es sintetizado en tejidos sometidos a senescencia o maduración. Esencialmente todas las partes de las semillas producen este gas.

El etileno es producido por plantas superiores y aún en cantidades pequeñas interactúa con otras hormonas del crecimiento especialmente con las auxinas con las que coordina y regula el crecimiento y desarrollo de varios procesos. Su mayor síntesis es realizada en los tejidos meristemáticos y en las regiones nodales.

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), éste puede ser transportado y puede ser el responsable de que el etileno cause efectos a cierta distancia del estímulo causal (Bidwel, 1979; Beyer *et al.*, 1989; y Salisbury y Ross, 1992). La fórmula estructural del etileno es:

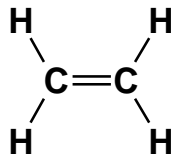


Figura 5. Etileno

NUEVOS RCV

Oligosacaridos

Los oligosacáridos son hidrocarburos naturales con efectos de regulación. P. Albersheim (1985) estudió durante los últimos años los efectos que provocan estos compuestos en las plantas, encontrando que cada vez son más las funciones en el desarrollo y crecimiento que se les pueden atribuir. Los oligosacáridos tienen influencia en el crecimiento y diferenciación celular, además de participar en la defensa contra hongos y bacterias. Son generalmente moléculas pequeñas,

producto de la ruptura de la pared celular. Los oligosacáridos son estructuralmente diversos. Se estima que aproximadamente más de 100 enzimas son requeridas para su producción. Junto con los azúcares comunes se encuentra la fracción de hemicelulosa como galactosa, ramosa, xylosa y arabinosa se encuentran también numerosos nuevos azúcares con siete u ocho átomos de carbono y algunas substituciones parcialmente inusuales (algunos grupos COOH).

Un total de 65 diversos monosacáridos interconectados por más de 20 diversos tipos de enlaces se han identificado hasta ahora. Un espectro tan extenso de compuestos hasta este momento solo era conocido para las proteínas y los ácidos nucleicos.

El desbloqueo de los oligosacáridos se puede estimular por presencia de auxinas, aunque las infecciones por hongos o los daños en las células de la planta tienen el mismo efecto. Se ha observado la relación de los oligosacáridos después de una infección por hongos, pues estos promovieron la síntesis de un antibiótico que protege así a la planta. Los Oligosacáridos pueden, también eliminar a las células cercanas, de tal forma que destruyen las condiciones previas a que los hongos, virus o algún otro microorganismo los invadan o contaminen. Oligosacáridos aislado de células de maple tienen un efecto en células de maíz, y viceversa. La adición de oligosacáridos al medio de cultivo para el cultivo de tejidos vegetales induce o promueve una morfogénesis (en raíz y meristemas apicales). Un monosacárido inhibe la elongación inducida por las auxinas. Se cree que la función de los oligosacáridos es la de regular la actividad de las auxinas, es decir ser un modulador

del feedback.

Un Segundo Mensajero: Iones de Calcio

Son pocos los iones que son necesarios para la regulación de los procesos celulares como el desarrollo de la polaridad, la secreción, el crecimiento, la división y la expresión genética como el calcio. Su presencia es de tal importancia que se compara a la de algunos organelos como la mitocondria, vacuolas o el retículo endoplasmático. El “uptake” de calcio es estimulado por diversos factores por ejemplo: auxinas, citocininas, giberelinas, phytochromo o gravedad. Todas estas observaciones señalan una segunda función del mensajero. A consecuencia de un aumento en el “uptake” del calcio, la célula puede iniciar una variedad de diversos procesos, Los procesos del crecimiento y desarrollo de brotes, por ejemplo, se correlacionan con una elevación de la concentración intracelular de calcio. El desarrollo de brotes no ocurre cuando se inhibe el uptake de calcio. Una carencia de citocininas o auxinas tiene el mismo efecto. Se ha mostrado que el ácido abscísico actúa como antagonista de la segunda actividad del mensajero del calcio, cerrando el canal del calcio en el exterior de la membrana, inhibiendo así el transporte del calcio (Owen, J.M. 1988).

OBJETIVO GENERAL

Identificar sustancias reguladores del crecimiento vegetal en una composta.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Caracterizar el material (compostas) a analizar.
- II. Establecer las técnicas analíticas para la extracción y purificación de reguladores del crecimiento vegetal.
- III. Establecer las técnicas para analizar la actividad biológica de los reguladores del crecimiento vegetal, mediante ensayos *in vitro* (bioensayos)
- IV. Extraer y purificar los reguladores del crecimiento vegetal presentes en la composta.
- V. Identificar los reguladores del crecimiento vegetal aislados de la composta.

- VI. Determinar la actividad biológica de los reguladores del crecimiento vegetal aislados de la composta.

PRIMERA PARTE

ESTABLECIMIENTO DE LAS TECNICAS

CARACTERIZACION DEL MATERIAL

En esta primera etapa se trabajó con muestras de composta, la cual fue elaborada en la Planta Piloto de Composteo de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Su composición inicial estaba formada por basura institucional (residuos de la cafetería y pasto residual), empleándose estiércol de vaca como inóculo.

El proceso utilizado fue composteo por pila, de acuerdo a la metodología establecida por Carmona *et al.* (1993) y García-Martínez *et al.* (1994). La composta obtenida bajo este proceso se pasteurizó en una autoclave manteniéndola a 80°C durante una hora, posteriormente las muestras de composta se secaron a temperatura ambiente y se analizó el contenido de nutrientes presentes (Arozarena *et al.*, 1995; García-Martínez, 1997).

EXTRACCIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

El análisis de Reguladores del Crecimiento Vegetal (RCV) es a menudo realizado a partir de tejidos vegetales, los RCV son extraídos mediante solventes orgánicos apropiados. Estos solventes orgánicos extraen los RCV de las muestras analizadas y, muy a menudo, el metanol es el solvente de preferencia. Otros solventes y mezclas orgánico-acuosas también son empleados.

En general la muestra es usualmente homogeneizada con el solvente seleccionado a una temperatura de entre 2 y 4°C, por un lapso de tiempo de aproximadamente 24 horas. Posteriormente se mezcla y se procede de acuerdo a la técnica seleccionada, sin embargo al llevar a acabo esta metodología, hay que tomar en cuenta que al extraer los RCV, estos no sufran algún cambio en su estructura química. Posteriormente el extracto obtenido se homogeniza y filtra, ocasionalmente se centrifuga (Brenner, 1981; Hubick y Reid, 1984; Hedden, 1993; y Larqué y Rodríguez, 1993). A continuación se describen las técnicas empleadas para la extracción, purificación identificación y determinación de la actividad biológica de los extractos obtenidos a partir de la composta.

EXTRACCION

La selección del solvente(s) apropiado(s) para la extracción de RCV es uno de los aspectos más importantes en el análisis de estos. A pesar de que el metanol al 80% es el más empleado, existe un gran número de reportes que muestran el uso de una serie de sistemas de solventes, con los cuales se obtiene una respuesta similar en

todos los casos. Sin embargo para poder determinar el solvente apropiado se recomienda el uso de estándares o blancos, es decir realizar la metodología de extracción empleando de estándares de los RCV a analizar y observar si su uso no altera o modifica su estructura o actividad biológica y, sobre todo que si cumpla con el objetivo de extraer los RCV a analizar (Brenner, 1981; García-Martínez, 1998).

Se estableció la utilización de diferentes solventes y/o mezcla de solventes para la extracción de cada grupo de RCV, metanol al 80% para auxinas y abscisinas, ácido clorhídrico metanólico para citocininas y acetona al 80% para giberelinas (Weaver, 1972; Russell, 1977; Brenney, 1981; Chapman y Pratt, 1981; Hubick y Reid, 1984; y Hedden, 1993).

Estas mezclas de disolventes se encuentran reportadas en la literatura como las de mayor uso para la extracción de Reguladores del Crecimiento Vegetal. Para el cumplimiento de este objetivo se emplearon disolventes JT Baker grado reactivo.

PURIFICACION E IDENTIFICACION

Primera purificación

Un gran número de procesos de análisis de RCV han incorporado de una u otra forma la convencional columna de cromatografía, cuyo objetivo principal es el eliminar los compuestos fenólicos y pigmentos. Dentro de los principales empaques empleados en las columnas se encuentran la Polyvinilpyrrolidona (PVP), Sephadex LH-20, Celulosa y Adsorbex RP-18. (Brenner, 1981; Durley *et al.*, 1989; Poling, 1991; Hedden, 1993; y Taylor *et al.*, 1994).

Para nuestro objetivo se emplearon columnas Adsorbex RP-18, columna de extracción para extracción en fase sólida, empacada con sílicageles sintéticos, la preparación de la columna para su uso se realiza haciendo 3 lavados de 15 mL cada con los siguientes solventes, en este orden: agua destilada, ether y metanol; una vez preparada la columna se pasa el extracto por la columna, de esta forma se elimina la fracción correspondiente a los pigmentos y se recupera un extracto exento de algunos compuestos que pudieran interferir en la purificación y posterior identificación. El lavado de la columna para su posterior uso se realiza mediante 5 lavados de 15 mL cada uno con cada uno de los siguientes solventes, en este orden: agua destilada, ether, metanol, ether y agua destilada, de esta forma la columna aun no saturada nuevamente se empleaba (Gutiérrez, 1996).

Partición

Posterior a la purificación preliminar, se realiza una serie de particiones, orgánico acuosas del extracto, empleando solventes inmiscibles. Estos solventes o sistema de solventes ven favorecida su acción y por ende su coeficiente de partición aumentado, mediante el establecimiento de condiciones que favorezcan tales aspectos como el pH, temperatura, etc. obteniéndose así la fracción de interés (orgánica o acuosa). Dentro del grupo de solventes de mayor empleo en la partición se encuentran el acetato de etilo, ether y fosfato de sodio. Posterior a la partición si el extracto no se continuará purificando se recomienda la adición de un buffer para estabilizar y conservar el extracto con los RCV, pero si se va a continuar con una nueva purificación el extracto queda intacto y solo se evapora el disolvente (Brenner,

1981; Hedden, 1993; y Korhammer y Heaslinger, 1994). En general esta técnica se basa en el uso de solventes orgánico-acuosos y en la separación mediante particiones polares de los extractos.

Segunda purificación

Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Recientemente algunos procesos para el análisis de RCV han incorporado nuevamente a la cromatografía en capa fina (TLC) como una herramienta para la purificación de los extractos obtenidos, su empleo se ha reestablecido, sin embargo la gran capacidad de resolución de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) jamás podrá ser reemplazada por la TLC a no ser por su contraste económico que representa su empleo en el análisis. Generalmente se emplean sílica-geles y celulosa para esta técnica.

Con el extracto libre de impurezas, se procede a una segunda purificación usando nuevamente columnas Adsorbex RP-18 y cromatografía de capa fina (cromatoplaqueta de aluminio, impregnada de sílica gel Merck 60F₂₅₄) (Tien *et al.*, 1979; Brenner, 1981; Horgan, 1987; Hernández-Miñana, 1991; y Cruz, 1996).

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE RCV

Se conocen varias clases de hormonas, algunas son sustancias promotoras del crecimiento y desarrollo, mientras que otras son inhibitorias. Se postula además la existencia de una gran variedad de hormonas, sobre la base de experimentos cuyos resultados no parecen poder interpretarse sin la implicación de estímulos aún no

conocidos (Bidwell, 1979). Sin embargo para los fines de esta primera etapa de nuestra investigación, sólo realizamos pruebas para la identificación de los siguientes grupos: ABSCISINAS, ácido abscísico (ABA), AUXINAS, ácido-3-indol acético (AIA), CITOCININAS (CIT) y GIBERELINAS (GAs). Las técnicas establecidas y empleadas se describen a continuación:

Abscisinas y Auxinas

Dada la naturaleza y similitud de estos dos reguladores de crecimiento vegetal, ya que poseen el mismo grupo funcional, se estableció una sola técnica para ambos (Zhang *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1994; Larqué, 1995; y Gutiérrez, 1996).

En general, la determinación de auxinas y abscisinas en tejidos vegetales, se realiza a partir de materiales que poseen una gran cantidad de pigmentos, por lo que los procedimientos recomendados son exhaustivos en cuanto al procedimiento de extracción y purificación, previo a su identificación. Las técnicas sugeridas para su extracción, las podemos dividir en las siguientes etapas: (McDougall y Hillman, 1978; Mousdale *et al.*, 1978; Saunders, 1978; Tien *et al.*, 1979; Larqué y Rodríguez, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; Taylor *et al.*, 1994; Larqué, 1995; y Gutiérrez, 1996), La figura 6 muestra el diagrama de flujo para la extracción de AIA y ABA.

A) EXTRACCION: Se realizó con metanol al 80%.

B) PURIFICACION PRELIMINAR: Se utilizó una columna Adsorbex RP-18

C) PURIFICACION: Referida a particiones con éter.

METODOLOGIA:

I MATERIAL. Se emplearon muestras de composta elaborada en la planta de tratamiento de residuos sólidos de la UAM-Iztapalapa

II PREPARACION DEL EXTRACTO METANOLICO. La muestra de composta se seco durante 24 horas a 60°C. Para preparar el extracto se pesaron 50 g de composta seca y se colocaron en un frasco ámbar y tapa de rosca, adicionando 500 ml de metanol al 80%, se pone en agitación durante 1 hora, se sella el frasco colocándolo en refrigeración (4°C) y oscuridad por 24 horas.

III FILTRACION. El extracto obtenido se filtra con papel Whatman, empleando una bomba de vacío.

IV PURIFICACION PRELIMINAR. El filtrado obtenido anteriormente se pasa por una columna Adsorbex RP-18 para eliminar los pigmentos.

V. EVAPORACION. El disolvente se evapora del extracto metanólico a presión reducida y 40°C de temperatura máxima, en un rotavapor, con lo que se obtiene un extracto acuoso.

VI PARTICION. Se ajusta el pH del extracto acuoso a 3.0 con ácido clorhídrico 6 M y enseguida se lava con 3 porciones (50 ml c/u) de éter, se conserva la fase orgánica y la fase acuosa se desecha.

VII EVAPORACION. La fase orgánica se concentra a presión reducida en el rotavapor con una temperatura del baño maría de 40°C. El residuo acuoso se transfiere a un tubo de ensayo, enjuagando el matraz en el cual se concentró el extracto 3 veces con buffer de fosfatos (1mM) pH=7, se combinan el residuo acuoso y el buffer de los enjuagues y se guarda en oscuridad y refrigeración

para su posterior identificación.

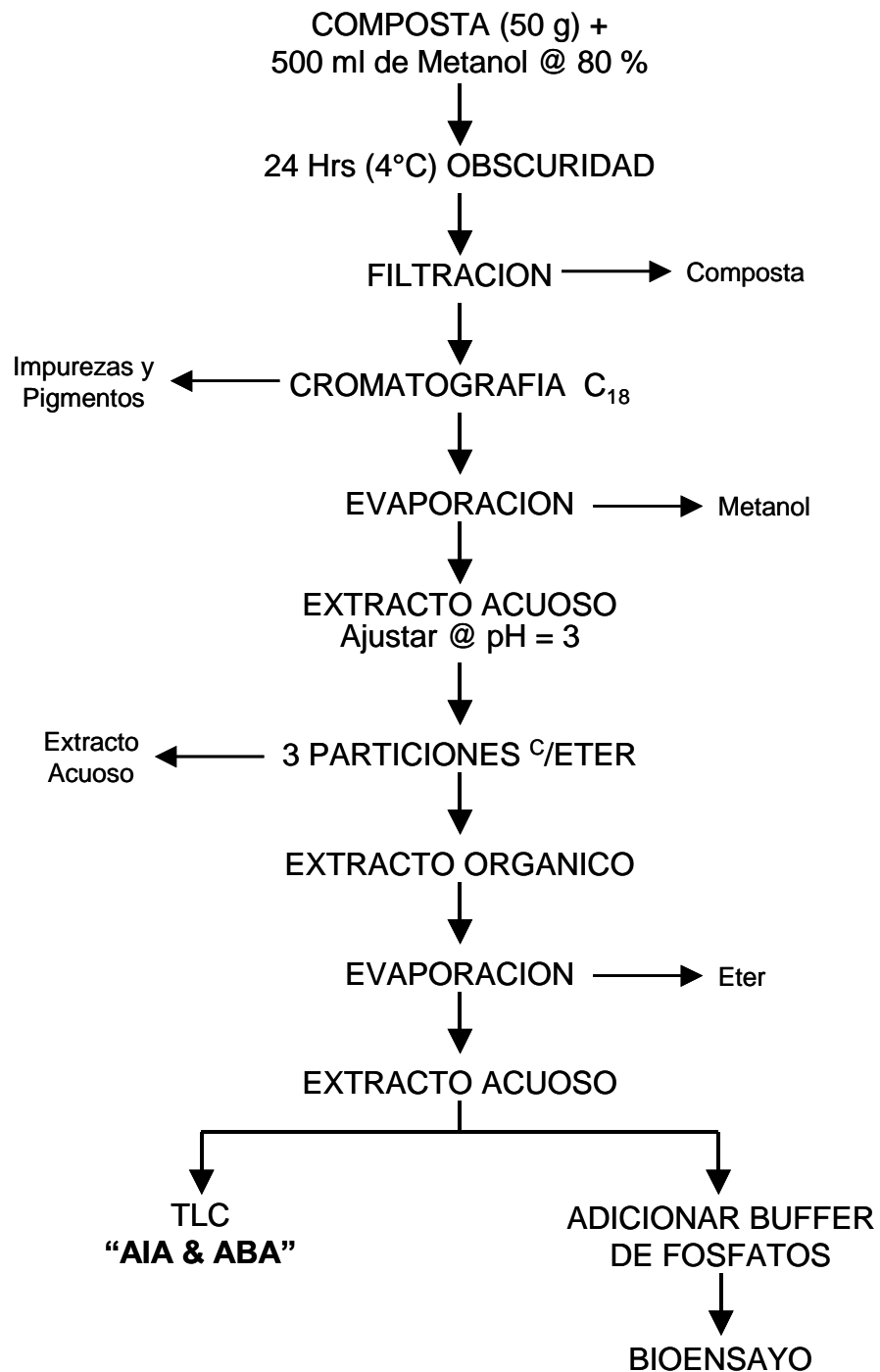


Figura 6. Metodología empleada para la extracción de ABA y AIA

Citocininas

Las investigaciones que condujeron al descubrimiento de las citocininas, así como a su posterior reconocimiento como hormonas vegetales, comenzaron en los laboratorios de Folke y Skoog de la Universidad de Wisconsin, Madison, en 1946 (Larqué y Rodríguez, 1993).

Las citocininas se han aislado, en angiospermas, a partir de ápices y nódulos de raíces, tubérculos, yemas, hojas y pétalos en expansión y senescencia, frutos en desarrollo y semillas en germinación, savia del xilema, exudados o callos, y otros tejidos.

Los disolventes más comúnmente utilizados en la extracción de las citocininas, a partir de tejidos vegetales, son disoluciones acuosas de metanol o etanol al 75%. Para su purificación, se han empleado particiones con disolventes y la cromatografía en sus diversas modalidades, en particular la de columna, muy empleada en las etapas iniciales de este proceso (Horgan, 1978; Tien *et al.*, 1979; Horgan, 1987; Hernández-Miñana, 1991; Boerjan *et al.*, 1992; Larqué y Rodríguez, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; Taylor *et al.*, 1994; y Gutiérrez, 1996). La metodología para extraer citocininas se describe a continuación; la figura 7 muestra el diagrama de flujo para la extracción de citocininas

A) EXTRACCION: Se empleo ácido clorhídrico metanólico a una concentración de 0.1 N., en una segunda fase de la extracción se utilizó metanol puro.

B) PURIFICACION: Mediante columnas Adsorbex RP-18, para la eliminación de

pigmentos principalmente.

METODOLOGIA

I MUESTRA. Se efectuó el análisis a partir de muestras de composta.

II EXTRACCION. Se toman 50 g de composta previamente secada, se agregan 500 ml de ácido clorhídrico 0.1N en metanol y se homogeneiza, posteriormente se filtra al vacío utilizando papel Whatman. Se descarta el filtrado y la muestra se homogeniza nuevamente con 250 ml de HCl 0.1N en metanol; se filtra de nuevo descartando el filtrado y se resuspende la muestra en 100 ml de metanol puro; Se homogeniza y se filtra nuevamente, pero ésta vez se guarda el filtrado. De esta forma, a la muestra de composta se le han extraído las citocininas que se encuentran ahora en dilución en el metanol.

III CROMATOGRAFIA EN COLUMNA (PURIFICACION). Se utiliza una columna Adsorbex RP-18. El extracto con las citocininas se coloca en un rotavapor para su concentración a presión reducida con una temperatura del baño maría de 40°C. Al extracto acuoso obtenido se estabiliza mediante la incorporación de buffer de fosfatos (1 mM) pH de 7, se envasa en frasco ambar y en refrigeración para su posterior uso.

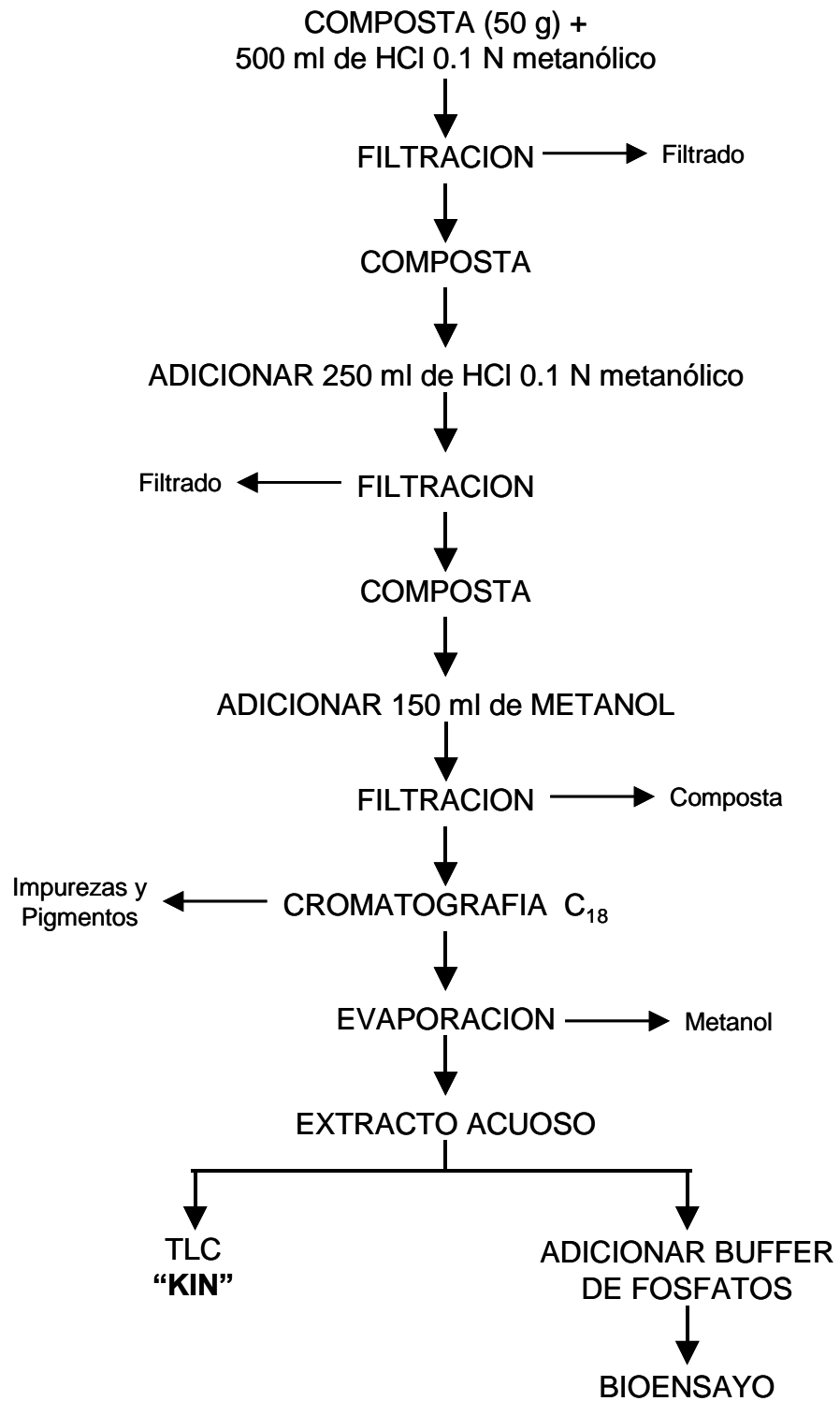


Figura 7. Metodología empleada para la extracción de CIT

Giberelinas

No obstante que se han aislado sustancias con actividad giberélica prácticamente de todos los vegetales, solamente se han obtenido giberelinas libres, químicamente caracterizadas, del hongo *Gibberella fujikuroi* y de plantas superiores. Asimismo, en estos organismos se ha detectado la presencia de giberelinas ligadas; comúnmente con glucósidos. Sin embargo, dado que estos compuestos son generalmente más polares, que las giberelinas libres, el método empleado para su extracción es diferente (Gaskin y MacMillan, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Hubick y Reid, 1984; Durley *et al.*, 1989; Bensen, 1990; Poling, 1991; Larqué y Rodríguez, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; Koshioka *et al.*, 1994; y Gutiérrez, 1996).

A continuación se describe la técnica utilizada para la obtención de giberelinas libres a partir de composta, la figura 8 muestra el diagrama de flujo para la extracción de giberelinas.

- A) EXTRACCION: El solvente empleado fue acetona al 80%.
- B) PURIFICACION PRELIMINAR: Referida al empleo de una gamma de sistemas de solventes y obtener un coeficiente de partición apropiado.
- C) PURIFICACION: Se emplearon columnas Adsorbex RP-18.

METODOLOGIA

I MATERIAL. Se utilizaron muestras de composta previamente secada.

II EXTRACCION. Se pesaron 50 g de composta y se adicionaron 500 ml de acetona al 80%, mezclando mediante agitación, la mezcla se conservó en un frasco ambar

con tapa de rosca por 24 horas a 4°C y bajo oscuridad. Posteriormente se filtró la muestra, desechando los sólidos; el filtrado se somete a evaporación a presión reducida (rotavapor) para la eliminación de acetona obteniéndose un extracto acuoso, al cual se le ajusta el pH a 2, mediante la adición de ácido fosfórico. A dicho extracto se le realizan 3 particiones con 50 ml de acetato de etilo cada una, de donde se elimina el extracto acuoso, guardando el extracto orgánico; con éste nuevo extracto se hace una partición con 25 ml de fosfato de sodio para la eliminación del extracto orgánico. Al extracto acuoso resultante, se le ajusta el pH a 3 nuevamente con ácido fosfórico, posteriormente se llevan acabo 5 particiones con 50 ml de acetato de etilo cada una para la eliminación posterior del extracto acuoso. El extracto orgánico obtenido se somete a una evaporación a presión reducida y una temperatura de 40°C, eliminándose de esta forma el acetato de etilo y obteniéndose un extracto acuoso.

III CROMATOGRAFIA EN COLUMNA. El extracto acuosos obtenido anteriormente se hace pasar por una columna Adsorbex RP-18, previamente preparada; el extracto obtenido se disuelve con buffer de fosfatos pH=7 y se conserva en refrigeración y oscuridad para su uso posterior.

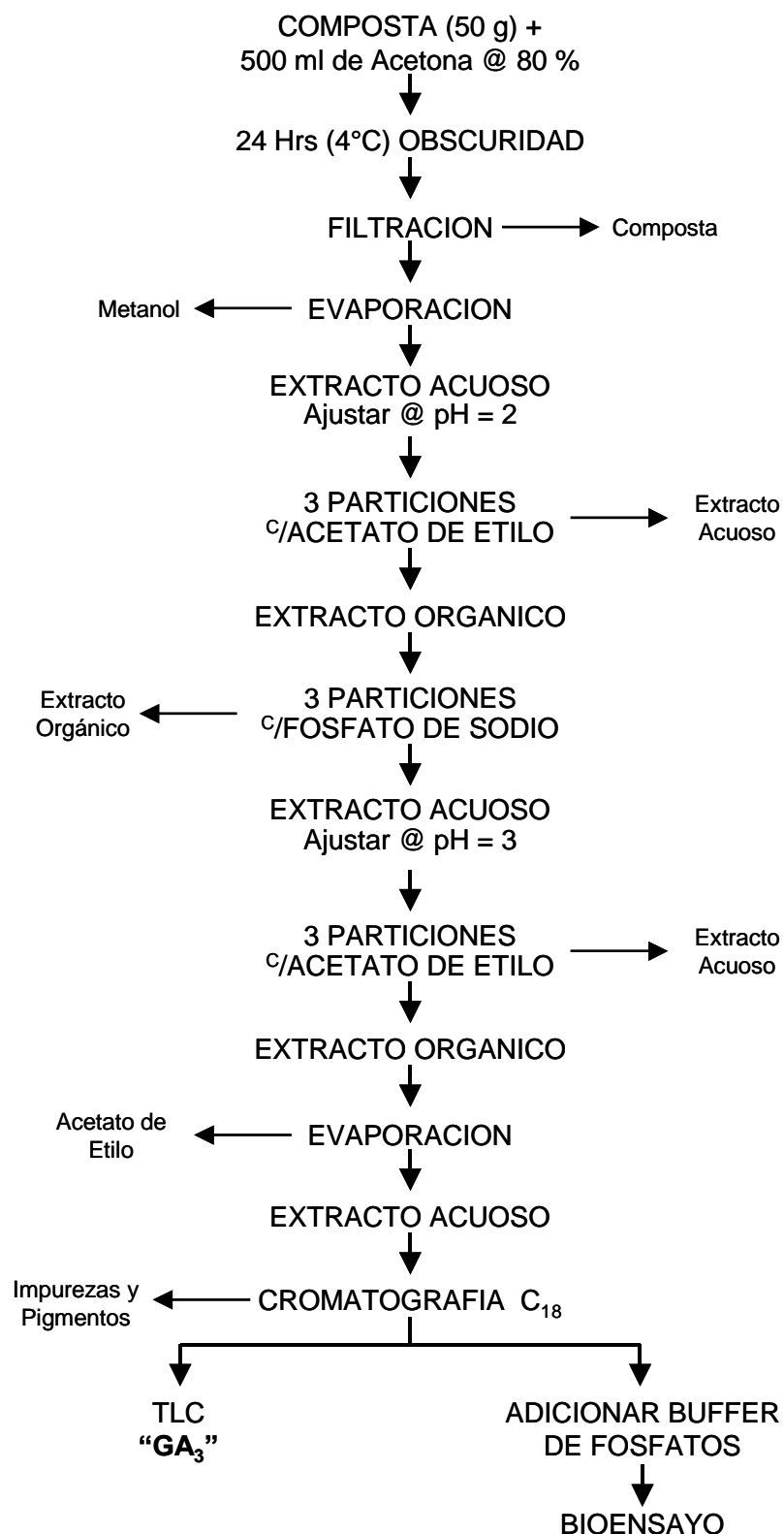


Figura 8. Metodología empleada para la extracción de GAs

IDENTIFICACION DE RCV (TLC)

Cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó una cromatoplaaca de aluminio impregnada de sílica gel Merck 60F₂₅₄. La muestra se aplica en forma de banda (de 10 a 15 cm de longitud dejando un margen de 2 cm en la parte que se elija como base de la placa) con una micropipeta en varios puntos de la placa; a la misma altura de la muestra, se coloca un patrón de una solución de 10⁻⁴ M del estándar, Ácido abscisico(ABA), Ácido-3-indol acético (AIA), Kinetina (CIT) o Ácido Giberélico (GA₃) según sea el caso. La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente con la fase móvil (eluyente) apropiada, es decir con aquella fase móvil que nos proporciona para las muestras a analizar un R_F de 0.5; el cromatograma obtenido se seca y se revela bajo luz ultravioleta (UV), ya identificadas las bandas se procede a un revelado final y permanente, aplicando este mediante un aspersor de aire y calentando brevemente la placa después de su aplicación hasta que se observe color (modificado de Larqué y Rodríguez, 1993).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA (BIOENSAYOS)

Los bioensayos han jugado un papel importante en el descubrimiento y posterior identificación de los RCV. Sin embargo existen dos limitantes para su empleo, estas son la selectividad y sensibilidad, por ello hay que tener en cuenta estos criterios al emplearlos para obtener resultados confiables y fehacientes en el análisis de RCV.

Como mencionamos precedentemente la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal se determina cualitativamente mediante las técnicas

anteriormente descritas, pero una herramienta auxiliar en su cuantificación es el empleo de los bioensayos, los cuales ayudan a dar una respuesta sobre su actividad biológica, aspecto de suma importancia si queremos corroborar que los compuesto aislados e identificados poseen también el efecto fisiológico en las plantas, en la tabla 1, se muestran los bioensayos empleados para la determinación de la actividad biológica del extracto obtenido a partir de la composta

Tabla 1. Bioensayos realizados para determinar la actividad biológica de los extractos obtenidos

ABA	AIA	CIT	GAs
Bioensayo de la inhibición de la elongación del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>)	Prueba del cilindro del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>)	Bioensayo de la acumulación de betacianinas en <i>Amaranthus Hybridus</i>	Bioensayo de la prueba del crecimiento del tallo del chícharo (<i>Pisum sativum</i>)
Bioensayo de la inhibición de la germinación de <i>Lepidium sativum L.</i>	Bioensayo de la elongación de raíz de <i>Lepidium sativum L.</i> y <i>Triticum aestivum L.</i>	Bioensayo de germinación de <i>Lepidium sativum L.</i> y <i>Amaranthus Hybridus</i>	
Bioensayo de la inhibición de la elongación de la raíz de trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>) y <i>Lepidium sativum L.</i>			

Estos bioensayos se desarrollan bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz, para obtener un resultado lo mas exacto posible y que no sea el resultado de factores ajenos a la actividad del extracto obtenido o los estándares; sin embargo, dada la naturaleza de los extractos obtenidos aún no se encuentra bien definida cual de las técnicas reportadas es la más eficiente ó se acerca más a nuestras necesidades, por tal motivo realizamos pruebas comparativas hasta obtener un bioensayo que cumpla con nuestros requerimientos (Weaver, 1972;

Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; y Bensen *et al.*, 1990). A continuación se describen los bioensayos realizados, para cada grupo de reguladores del crecimiento vegetal.

ABSCISINAS

Los inhibidores constituyen, entre los reguladores del crecimiento vegetal, un grupo conformado por compuestos con estructura química muy variada que, por tanto, provocan muy diversos efectos biológicos en las plantas.

El ácido abscísico, considerado dentro de este grupo ha mostrado ser un inhibidor de la germinación de semillas, la apertura de los estomas, la síntesis de α -amilasa, y en general, del crecimiento vegetal. Se ha descubierto también que es responsable de la abscisión de órganos y de provocar el letargo de las yemas. Todos estos efectos biológicos han servido de base para la aplicación de diversos bioensayos.

El tipo de bioensayo basado en la inhibición de coleóptilos de cereales es el más utilizado en investigaciones sobre reguladores del crecimiento vegetal. Se ha aplicado al estudio de auxinas y giberelinas, ya que estos compuestos estimulan la elongación de los coleóptilos; sin embargo, el coleóptilo es poco susceptible a sufrir efectos inhibitorios de un amplio número de compuestos con dicha actividad.

Inhibición de la elongación del coleóptilo del trigo (*Triticum aestivum* L.).

Se ponen a remojar 100 semillas de *Triticum aestivum* durante 6 horas en agua

destilada a una temperatura de 30°C. Después de este tiempo, se ponen a germinar en las charolas en las que previamente se ha colocado un soporte de papel filtro, humedecido con agua destilada. Se colocan aproximadamente 50 semillas por lote, todas con la misma orientación y con el embrión hacia arriba, sellando las charolas con plástico para evitar la pérdida de humedad. Las charolas preparadas y selladas se colocan en la cámara de crecimiento a 20°C. y total oscuridad. En el transcurso del experimento, estas deberán regarse con agua destilada cada 24 h. Cuando los coleóptilos alcancen una longitud de 2 cm (84 horas aproximadamente), se seleccionan las semillas que presenten un crecimiento uniforme del coleoptilo y se colocan en una caja de Petri con agua destilada. Enseguida, se cortan del ápice y la base con la cortadora de segmentos Wightman, cuidando que los coleóptilos tengan una longitud constante de 1 cm. Conforme se cortan, los coleóptilos se colocan nuevamente en una caja de Petri con agua destilada; se conservan así hasta que son transferidos a los tubos de ensayo; una vez que todos las semillas seleccionadas son cortados, se colocan en grupos de 10 coleóptilos en los tubos de ensayo con una de las soluciones a evaluar; a estos tubos previamente se les han depositado 3 ml de: una solución 10^{-4} Molar de ABA (estándar), 3 ml de agua destilada (testigo/blanco) o 3 ml del extracto de la composta a analizar (extracto). Una vez realizado lo anterior, se sellan los tubos con papel Parafilm y se ponen en el Klinostato (0.138 rpm) en oscuridad, a 20°C durante 24 horas.

Terminado este lapso de tiempo, se mide la inhibición en la elongación de los coleóptilos utilizando una regla graduada. Los resultados obtenidos se expresan como porcentajes relativos de elongación, es decir, referidos al testigo.

Inhibición de la germinación de *Lepidium sativum* L.

La germinación de las semillas depende de diversos factores externos e internos, entre los que podemos mencionarse, además de las condiciones ambientales, la presencia endógena o exógena de los Reguladores del Crecimiento Vegetal. Si bien el papel de estos RCV no está del todo claro, sobre todo en lo que se refiere al proceso de germinación, se conocen algunos efectos, como resultado de aplicaciones exógenas. El ácido abscísico, en su papel de inhibidor de la germinación está bien fundamentado experimentalmente, así como su interacción con otros reguladores, básicamente citocininas y giberelinas. Se seleccionaron semillas de *Lepidium sativum* por su rápida germinación, pues incluso en 18 h. se tienen resultados.

Se coloca un soporte de papel filtro Whatman No.1 a las cajas de Petri, posteriormente se colocan 5 mL de las soluciones a evaluar: agua destilada (testigo), el estándar (ácido abscísico 10^{-4} M) o el extracto de la composta, posteriormente se colocan 10 semillas de *Lepidium sativum* L. (previamente lavadas y desinfectadas) en cada caja de petri. Las cajas así preparadas se tapan y se incuban en la cámara de crecimiento a 25 °C y oscuridad. Las lecturas del porcentaje de germinación pueden realizarse después de un lapso de tiempo de entre 18 y 24 h. Después de haber establecido el experimento.

Inhibición de la elongación de la raíz de *Lepidium sativum* L. y *Triticum*

aestivum L.

Se lavan y desinfectan 100 semillas de *Lepidium sativum*, posteriormente se preparan tres cristalizadores en donde previamente se ha colocado un soporte de papel filtro Whatman No.1, se realizan tres tratamientos, uno 10 mL del extracto de la composta, 10 mL de agua destilada (testigo) y el tercer tratamiento con una solución de 10^{-4} M de ácido abscisico (estándar). Todos los tratamientos se cubren, esto ayudará a reducir la evaporación. Los cristalizadores con los tratamientos y las semillas se incuban en la cámara de ambiente controlada a 23°C, por el período que se requiera (aproximadamente 40 horas). Después de este tiempo, se determina la longitud de la radícula de las plántulas utilizando una escala milimétrica, y se calcula el promedio a partir de los valores obtenidos (Weaver, 1972; Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; Saunders, 1978; King, 1979; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982, Hubick y Reid, 1984; Bensen *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993; y Taylor *et al.*, 1994).

AUXINAS

Las investigaciones de Ralther (1894) Boysen-Jensen (1910), Paál (1919) Söding en 1923 y 1925, y Went (1928) como indican McDougall y Hillmann en 1978, nos

conducen a la teoría general ya aceptada de que el ácido-3-indol acético es una auxina producida en los ápices de las plantas, cuya función es como reguladora de la elongación celular en los vegetales. En general los bioensayos empleados en este trabajo, ilustran el efecto mencionado mediante la aplicación exógena de soluciones de auxina y extractos de composta a coleóptilos. En primer lugar, se flotan los segmentos de coleóptilo en las soluciones a evaluar (auxina y extracto de composta) y a continuación se determina el incremento total en la elongación celular (Larqué y Rodríguez, 1993).

Otros bioensayos para auxinas son los diseñados para medir la curvatura de segmentos de tallo o de coleóptilos, han resultado más delicados en su ejecución debido a la dificultad de encontrar sitios cuyas condiciones ambientales estén bien controladas, ya que si hay cambios los resultados pueden alterarse. Por esta razón se han desarrollado bioensayos más sencillos y menos susceptibles a los factores ambientales. Entre los más aplicados por los fisiólogos vegetales están aquellos que utilizan coleóptilos, segmentos de tallo o raíces como material vegetal de prueba. En ellos, no se miden las curvaturas resultantes de aplicaciones unilaterales, o de la inmersión en las auxinas, sino el incremento en la elongación resultante después de sumergir los cilindros de coleóptilo, segmentos de tallo o raíces en soluciones aireadas de las auxinas en estudio. Los estudios se preparan sumergiendo en agua los segmentos, para determinar la elongación ocurrida por efecto de las auxinas endógenas o el extracto obtenido.

Prueba del cilindro del coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Se remojan 200 semillas de trigo en agua destilada durante seis horas; enseguida, se ponen a germinar en charolas, en las que previamente se ha colocado un soporte de papel filtro humedecido con agua destilada. Se “siembran” aproximadamente 50 semillas por charola, todas con la misma orientación y con el embrión hacia arriba. Se dejan germinar en el cuarto oscuro dentro de una cámara con humedad constante, regando cada 24 horas con agua destilada. Una vez que los coleóptilos han alcanzado una longitud aproximadamente de dos cm (84 horas aproximadamente) se seleccionan las semillas mas uniformes en su desarrollo, a este lote de semillas se traspasa a una nueva charola en donde se remueve el resto de la semilla, utilizando las pinzas rectas; a continuación se colocan los cilindros en una caja de petri con agua destilada. Enseguida, se cortan por el ápice y la base con la cortadora de segmentos Wightman, y se dejan los coleóptilos a una longitud constante de 1 cm. Inmediatamente después de cortarse se colocan nuevamente en agua destilada. El siguiente paso es retirar la hoja primaria de cada segmento y se ensartan 2 segmentos por capilar, dejando que nuevamente floten en agua destilada hasta que son transferidos a cajas de petri en grupos de 10 capilares, las cajas de petri previamente se han colocado 5 mL de las soluciones a evaluar: extracto de la composta, estándar (10^{-4} M de AIA) ó agua destilada (testigo). Una vez colocados todos los capilares, las cajas se tapan y se colocan en el cuarto de incubación. Terminado el tiempo de tratamiento, aproximadamente 48 horas se mide la elongación de los coleóptilos de trigo.

Elongación de la raíz de *Triticum aestivum* L. y *Lepidium sativum* L.

Se lavan y desinfectan 200 semillas de trigo o *Lepidium*, posteriormente se sumergen en agua destilada por 6 horas; enseguida, se ponen a germinar en charolas, en las que previamente se ha colocado un soporte de papel filtro humedecido con agua destilada, todas con la misma orientación. Se dejan germinar en el cuarto oscuro dentro de una cámara con humedad constante, regando cada 12 horas con agua destilada. Una vez que las raíces han alcanzado una longitud de aproximadamente 0.5 cm se seleccionan las semillas que presente un crecimiento homogéneo, estas se transfieren en grupos de 20 semillas a nuevas charolas en donde previamente se ha colocado un soporte de papel filtro humedecido con las soluciones a evaluar: estándar (10^{-4} M de AIA), el extracto de la composta y agua destilada (testigo). La charolas se tapa con plástico para reducir la evaporación de las soluciones. Las charolas preparadas, se incuban en la cámara de ambiente controlado a 23.5 °C. Después se determina la longitud de la radícula de las plántulas utilizando una escala milimétrica, y se calcula el promedio a partir de los valores obtenidos (Weaver, 1972; Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; McDougall y Hillman, 1978; Mousdale *et al.*, 1978; Saunders, 1978; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982, Hubick y Reid, 1984; Bialek y Cohen, 1989; Bensen *et al.*, 1990; Tien *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; y Taylor *et al.*, 1994).

CITOCININAS

Se ha observado que las hojas de trigo después de ser desprendidas, retardan la

senescencia al ser tratadas con soluciones de citocininas. Está demostrado que las citocininas retrasan la pérdida de clorofila y prolongan la vida de las hojas. Por tal motivo a manera de bioensayo, este efecto se utiliza con el fin de probar la presencia de sustancias con actividad citocínica.

Acumulación de betacianinas en *Amaranthus hybridus L.*

En dos cristalizadores con agua destilada que contiene una base de algodón y una capa papel filtro se colocan aproximadamente 400 semillas de Amarantho, posteriormente los cristalizadores son sellados con plástico para evitar la evaporación de agua y por consecuencia la deshidratación de las semillas, una vez sellados los cristalizadores se colocan en el cuarto de incubación en oscuridad y a una temperatura de 25°C. Posteriormente en el cuarto oscuro bajo luz verde, se seleccionan las semillas que hayan germinado mas uniformemente y se tengan un tamaño aproximado de 1 cm de hipocotilo, a estas semilla seleccionadas se les corta la raíz dejando solo los cotiledones con un hipocotilo de aproximadamente 5 mm; a la par se preparan los tratamientos en cajas de Petri, en donde se han colocado un soporte de papel filtro y 5 ml de cada una de las soluciones a evaluar (extracto de composta, estándar y agua destilada), una vez preparados los tratamientos se agregan 20 cotiledones de amaranto germinado a los que se les ha dejado un segmento de 5 mm de hipocotilo, quedando estos en contacto con el papel filtro, previamente humedecido. Se tapan las cajas y se dejan incubar a 25°C durante 24 h en oscuridad. Posteriormente se transfieren los cotiledones a tubos de ensayo que contienen 4 ml de etanol al 10%, colocándolos en baño maría entre 50 y 60 °C durante 30 minutos, procurando agitarlos en el vortex cada 10 minutos. Se

observará que el etanol adquiere una coloración violeta y en este momento se determina la densidad óptica a 537-620 nm, poniendo como blanco el etanol al 10%.

Germinación de *Lepidium sativum* L. y *Amaranthus Hybridus*.

La germinación de las semillas depende de varios factores externos e internos, entre los que pueden mencionarse, además de las condiciones ambientales, la presencia endógena o exógena de los RCV. Si bien el papel de estos no es del todo claro, sobre todo en lo que se refiere al proceso de germinación, se conocen algunos efectos, como resultado de aplicaciones exógenas. Para las citocininas, su papel de promotor de la germinación está bien fundamentado experimentalmente, de tal forma que se empleó este bioensayo para evaluar la actividad citocínica de los extractos.

Se coloca un soporte de papel filtro Whatman No.1 en cajas de Petri, posteriormente se colocan las soluciones a evaluar: agua destilada, el estándar (10^{-4} M de Kinetina) o el extracto de composta a evaluar, posteriormente se lavan y desinfectan aproximadamente 50 semillas de *Lepidium* o *Amaranthus*, según sea el caso. En las cajas petri con los tratamientos se colocan 10 semillas en cada una de ellas y se tapan, se incuban en la cámara de crecimiento a 25 °C y oscuridad. Las lecturas de germinación, en porcentajes, pueden realizarse después de 18 a 24 h. de haber establecido el experimento (Weaver, 1972; Russell, 1977; Horgan, 1978; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; Bialek y Cohen, 1989; Bensen *et al.*, 1990; Hernández-Miñana, 1991; Boerjan *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; y Taylor *et al.*, 1994).

GIBERELINAS

Con respecto a las giberelinas, se ha implementado una amplia variedad de bioensayos, dado que se ha empleado prácticamente cualquier respuesta biológica a su aplicación exógena para detectarlas y cuantificarlas. Sin embargo, solo 3 tipos de bioensayo se han usado ampliamente por su facilidad de ejecución, exactitud, sensibilidad y especificidad. En ellos se utilizan básicamente hipocótilos, endospermos de cereales y plántulas de cultivares mutantes enanos. Los vegetales responden a la aplicación de giberelinas acusando prolongación en sus brotes.

Prueba de crecimiento del tallo del chícharo (*Pisum sativum* L.)

Se lavan y desinfectan 100 semillas de chícharo, posteriormente se sumergen en agua destilada por aproximadamente 6 u 8 horas, posteriormente se seleccionan solo las semillas que hayan embebido, estas semillas se siembran en macetas de plástico en donde previamente se ha colocado suelo fertilizado y regado a capacidad de campo, se siembran 5 semillas por maceta. Las macetas se mantienen en el invernadero regándolas cada vez que sea necesario. Hacia el décimo día cuando el cuarto entrenudo se alarga, las plantas están listas para el bioensayo. Se mide y registra la altura de cada planta, tomando la lectura desde el ras del suelo hasta el ápice del tallo. Se marcan las plantas o macetas para diferenciarlas, quedando divididas en tres tratamientos o lotes.

Los registros de las lecturas y la aplicación de los tratamientos se realiza cada 24 horas, los tratamientos se realizan de la siguiente manera: Macetas I, se asperja

con agua destilada que contiene Tween 20 (6 gotas por litro) como testigo. Macetas II, se asperjan con el estándar (solución $10^{-4}M$ de ácido giberélico) y macetas III, se asperjan con el extracto de composta. La aspersión de las soluciones se puede hacer sobre toda la planta, teniendo cuidado de no afectar los otros tratamientos, o en especial sobre el ápice, para esta opción se emplea una jeringa para que las soluciones a evaluar entren de manera directa a actuar con el ápice. Una semana después de aplicada la última aspersión, se determina la altura de cada planta y se determina el incremento medio en altura, realizando comparaciones de resultados (Durley *et al.*, 1989; Bensen, 1990; Poling, 1991; Larqué y Rodríguez, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; Koshioka *et al.*, 1994).

RESULTADOS y DISCUSIONES

ANÁLISIS DE LA COMPOSTA

Los resultados de la determinación de los contenidos totales y asimilables (hidrosolubles) de los elementos analizados en la muestra de composta empleada para el análisis de los RCV se presentan a continuación:

Tabla 2. Contenido asimilable y total en ppm de N, P, K y Ca.

ELEMENTO	Fracción asimilable	Fracción Total
Nitrógeno	285.35	
Fósforo	113.2	5656.5
Potasio	374.1	2369.8

Calcio	198.0	26610
--------	-------	-------

La variabilidad que presentan los resultados, es consecuencia de la heterogeneidad que caracteriza a las compostas como producto terminal; similares observaciones son reportadas por Gray *et al.* (1973). Se hace necesario precisar qué rango de valores es adecuado para un material cuya aplicación al suelo es del orden de las toneladas por hectárea (t/ha), de tal forma queda demostrada la conveniencia de caracterizar químicamente a la materia prima empleada en los procesos de composteo, como alternativa para precisar el impacto ambiental del uso agrícola de las compostas.

Por otra parte, al observar la tabla 2, el grado de disponibilidad nutrimental que caracteriza a la composta, llama la atención que esa magnitud es proporcionalmente muy inferior (solamente para potasio se alcanzan porcentajes superiores al 10%) al valor correspondiente de concentración total, aunque cabe señalar que hay coincidencias con lo reportado por Biddlestone y Gray (1991) y Kuhlman (1992). Este resultado, que también avala la elevada calidad nutricional de la composta procesada, justifica la interpretación de esa característica respecto al consumo vegetal inmediato y en cuanto al efecto adicional que significa el incremento en conjunto de nutrientes del suelo como resultado de los procesos de transformación y degradación que se ponen en marcha durante la interacción composta/suelo.

Tabla 3. Contenido de carbono total (ppm) y relación C/N

	C_{TOTAL}	C_{Total}/N_{Acuoso}
COMPOSTA	2744.1	9.70

Respecto al contenido de carbono y la relación carbono/nitrógeno, que es la información que aparece en la tabla 3, los valores altos de concentración de carbono corresponden a que la composta es de reciente elaboración; esa relación inversa que puede establecerse, entre contenido de carbono y tiempo de elaboración, demuestra que la composta no es un producto bioquímicamente estable y que su composición cambia ininterrumpidamente, (Trejo Vázquez, 1994). En cuanto a la relación carbono/nitrógeno, aunque la literatura reporta diferentes criterios para su estimación, basados fundamentalmente en la vía de análisis escogida, hay coincidencia en asociar el decrecimiento de su valor con el grado de descomposición o el completamiento del proceso de composteo (Melillo *et al.*, 1982; Finstein *et al.*, 1986; Giusguiani *et al.*, 1989 e Iglesias Jiménez y Pérez García, 1992). De modo general, se reconocen como aceptables valores inferiores a 20 y se plantea que los mismos se asocian a compostas de buena calidad; también hay la tendencia a establecer este indicador a partir de extractos acuosos de acuerdo a lo demostrado por Chanyasak y Kubota (1981) y a lo discutido por Levi-Minzi *et al.* (1990) y por Iglesias Jiménez y Pérez García (1992).

Después del análisis químico realizado a la composta que se elaboró en la UAM-Iztapalapa, no queda duda que era una composta que cubría las características mínimas recomendadas para ser un producto que se emplea como fertilizante.

EXTRACCIÓN DE RCV

A pesar de ser la composta una muestra anteriormente no analizada para la

extracción e identificación de RCV, así como ser la única fuente no convencional empleada para tal objetivo, existen pocos trabajos relacionados con este tema. Zhang *et al.* (1993) empleo fracciones de un grupo de algas, encontrando indicios de auxinas, citocininas y giberelinas. Abriendo así un nuevo camino en el análisis y extracción de RCV en una muestra no convencional.

De acuerdo con el análisis para la extracción de RCV realizado a la composta, se esperaba encontrar alguna(s) de las posibilidades que muestra la tabla 4 de acuerdo a lo reportado por García-Martínez (1997).

Tabla 4. Posibilidades de la presencia de RCV en la composta

	I	II	III	IV	V
Abscisinas	SI	NO	NO	NO	SI / NO
Auxinas	NO	SI	NO	NO	SI / NO
Citocininas	NO	NO	SI	NO	SI / NO
Giberelinas	NO	NO	NO	SI	SI / NO

Como muestra la tabla 4 la posibilidad V indica un efecto sinérgico que puede existir entre una mezcla de RCV (Zhang *et al.*, 1993 y Gutiérrez, 1996) o en definitiva la nula presencia de estos o al menos la existencia de dos. Las posibilidades restantes (I, II, III y IV) son puntuales marcando la presencia de solo algún RCV.

El análisis de los RCV es a menudo realizado para tejidos vegetales, los cuales son extraídos mediante el empleo de solventes apropiados. Estos solventes orgánicos extraen a los RCV de las muestras analizadas y, muy a menudo el metanol es el solvente de preferencia. Sin embargo otros solventes y mezclas orgánico-acuosas

también son empleados.

De acuerdo a la literatura consultada se probaron los solventes o mezclas de estos para la extracción de nuestros grupos de RCV (ABA & AIA, CIT y GAs). Sin embargo los solventes que cumplieron con el objetivo planteado fueron los mostrados en la tabla 5. Ya que estos promovían un rendimiento mayor de RCV durante la extracción, amén de no alterar la estructura de la molécula asilada, causa principal de resultados erróneos durante el análisis (Horgan, 1987).

Tabla 5. Solventes empleados para la extracción de RCV

SOLVENTE EMPLEADO	ABA	AIA	CIT	GAs
Metanol al 80%	⊗	⊗		
Acetona al 80%				⊗
Ácido clorhídrico metanólico 1N			⊗	

La muestra para el análisis se homogenizó con el solvente apropiado, posteriormente se envasó y guardó a una temperatura de 2-4°C por 24 horas. Exceptuando la muestra para el análisis de citocininas, la cual se empleo inmediatamente para su análisis. Las otras soluciones transcurrido el tiempo de reposo se procedió de acuerdo a la técnica empleada (ver figuras 6, 7 y 8) (Brenner, 1981; Hubick y Reid, 1984; Hedden, 1993; Larqué y Rodríguez, 1993; Korhammer, 1994; y Gutiérrez, 1996).

El empleo de columnas Adsorbex RP-18, empacada con sílicageles sintéticos, resulto de gran ayuda para la purificación, debido a la naturaleza tan heterogénea de la muestra (Arozarena *et al.*, 1995 y García-Martínez *et al.*, 1995) y la existencia

de una gran variedad de pigmentos vegetales, los cuales interferían en la técnica empleada, provocando en ocasiones la obturación de las columnas (Durley, 1989; Poling, 1991; Hedden, 1993; y Taylor *et al.*, 1994). Para evitar tales efectos se aumento la cantidad de solvente empleado (Gutiérrez, 1996), llegando a ocupar hasta 500 ml de solvente para una muestra de 50 gramos de composta. El volumen obtenido inicialmente, procedente de la extracción y posterior filtrado, es decir a partir de la primera etapa de la técnica, se comparó con el que se obtuvo al finalizar toda la técnica (denominado volumen del extracto), obteniéndose un rendimiento del 10% para ABA & AIA y GAs, mientras que para CIT fue de 40%.

IDENTIFICACIÓN PARCIAL DE RCV (TLC)

Una herramienta actualmente poco empleada en el análisis de los RCV es el uso de la cromatografía en capa fina (TLC), debido a ser una técnica con un bajo grado de resolución, que jamás se podrá igualar y comparar con el empleo de HPLC o técnicas combinadas como la Cromatografía de gases acoplada a Espectroscopía de masas (GC-MS), sin embargo dada la naturaleza de la muestra empleada (contiene una infinidad de compuestos no analizados de naturaleza contaminante), no consideramos conveniente el empleo de estas técnicas, debido a que se requeriría de intensa purificación que por el momento no es posible realizar, y si emplear la TLC debido a las características de su bajo costo y manejo rápido obteniendo así una herramienta útil para los fines perseguidos (Brenner, 1981).

Posterior a la extracción se procedió con la identificación, empleando cromatografía en capa fina (TLC). Se empleó una cromatoplaca de aluminio impregnada de sílica

gel. La muestra se aplica en forma de banda con un capilar en varios puntos de la placa a una distancia de 1 cm de la base de esta. La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente con la fase móvil (FM) apropiada. Sin embargo el empleo de la FM apropiada para cada grupo de RCV acusó un serio problema que resolver, por tanto se optó por la evaluación y posterior selección de siete FM reportadas como buenos eluyentes. En la tabla 6 se muestra la composición de cada una de las fases móviles evaluadas (Russell, 1977; McDougall y Hilman, 1978; Horgan, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Saunders, 1978; Tien *et al.*, 1979; y Hubick y Reid, 1984).

Para la evaluación de las FM se emplearon cromatoplasmas de aluminio impregnadas con sílica gel, en estas placas se aplicaron los estándares a una concentración de $10^{-4}M$, de tal forma que se realizaron tantas placas como FM a evaluar.

Tabla 6. Composición de la fase móvil evaluada para su uso en la TLC

FM	COMPOSICIÓN	IDENTIFICA
I	Cloroformo: Acetato de etilo: Ac. Fórmico (50:40:10).	AIA, ABA y GAs
II	n-Butanol: ácido acético: agua (12:3:5).	CIT
III	Isopropanol: amoniaco (80%): agua (8:1:1).	AIA
IV	Acetona: acetato de etilo (1:1).	CIT
V	Acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (90:30:6).	GAs
VI	Isopropanol: hidróxido de amonio: agua (10:4:6).	CIT
VII	Acetato de etilo	ABA

A pesar de poseer un alto grado de especificidad para los RCV a analizar, no todas

la FM resultaron con una calificación apropiada, pues el cromatograma obtenido se secó y se reveló bajo luz ultravioleta (UV), de esta forma se podía observar de manera rápida como se había desplazado la muestra por la placa. Para poder determinar cual FM era la indicada para cada grupo (a pesar de haber probado todas las FM para todos los grupos de RCV), se seleccionaron aquellas FM en donde se obtenía un R_F con un valor de 0.5 o lo más cercano a este, ya este valor es considerado como el ideal (Hernández-Miñana, 1991 y Cruz, 1996). Posterior a su evaluación se encontró que las fases móviles con los mejores valores de R_F son:

Cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico (50:40:10) para AIA & ABA.

Isopropanol: hidróxido de amonio: agua (10:4:6) para CIT y

Acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (90:30:6) para GAs.

Todas con un valor de R_F de 0.5 y un nivel de significancia de 0.001 (SAS, 1982).

Una vez encontrada la fase móvil apropiada para cada RCV, la TLC se desarrollo de la siguiente forma: El extracto obtenido se colocó en forma de puntos con un capilar a 1 centímetro de la base de la placa, a la misma altura del extracto, se colocó un estándar de una solución de 10^{-4} M del estándar a evaluar ABA, AIA, CIT o GAs según sea el caso. La TLC se desarrolla en la cámara de cromatografía a temperatura ambiente, una vez terminada la cromatografía la placa se seca aplicando un ligero calor con una parrilla de calentamiento, una vez secas las placas se procede a un primer revelado temporal, este se realiza en una cámara de oscuridad con una lámpara de luz ultravioleta, aquí se observan las bandas o manchas y se realiza una primera identificación. Posterior a esta identificación

preliminar de las bandas o manchas, se procede a un revelado final y permanente, aplicando mediante un aspersor de aire un revelador, una vez aplicado el revelador se espera a que se evapore el revelador y posteriormente se calienta brevemente la placa después del secado hasta que se empiece a observar color (modificado de Larqué y Rodríguez, 1993). El objetivo del revelado es que fuese marcadamente visible y permanente, para este revelado se empleo una solución de Sulfato cérico, hielo frapé y ácido sulfúrico. (Russell, 1977; Horgan, 1978; McDougall y Hilman, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Saunders, 1978; Tien *et al.*, 1979; Hubick y Reid, 1984 y Cruz, 1996).

Como se mencionó anteriormente se empleo un estándar como referencia de comparación para determinar si la banda o mancha del extracto evaluado correspondía a algún compuesto de peso molecular similar al estándar empleado.

Los resultados obtenidos de la cromatografía en capa fina se observan en la tabla siguiente

Tabla 7. R_F obtenidos para la identificación de los extractos obtenidos.

	ABSCISINAS	AUXINAS	CITOCININAS	GIBERELINAS
R _F 1 ⁽¹⁾	0.62	0.59	0.76	0.86
R _F 2 ⁽¹⁾	0.62	0.53	0.82	0.86
R _F 3 ⁽¹⁾	0.63	0.57	0.70	0.82
Estándar	0.62	0.59	0.41	0.49

⁽¹⁾ Medias de los R_F obtenidos, con desviación estándar de ± 0.002

La tabla 7 muestra las medias representativas de diez repeticiones, las cuales muestran que los extractos obtenidos a partir de una composta poseen un peso molecular similar al Ácido abscísico y Ácido-3-indol acético, mientras que para Citocininas y Giberelinas no existe evidencia significativa que muestre la presencia de compuestos, con peso molecular similar a estos RCV, ya que los R_F de los extractos nos indican una ausencia total al ser comparados con el estándar, sin embargo posteriormente a todas las muestras se les determinó su actividad biológica, para reafirmar los resultados de la identificación (Russell, 1977; Horgan, 1978; McDougall y Hilman, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Saunders, 1978; Tien *et al.*, 1979; King, 1979; Hubick y Reid, 1984; Horgan, 1987; Larqué y Rodríguez, 1993 y Gutiérrez, 1996).

BIOENSAYOS

Los bioensayos juegan un papel importante en la identificación de Reguladores del Crecimiento Vegetal, ya que sirven como una herramienta de identificación, pues con ellos se determina la actividad biológica del extracto a analizar; sin embargo dada la naturaleza de la muestra analizada se seleccionaron los bioensayos que proporcionarían una respuesta rápida y confiable, pues existen dos limitantes para el uso de los bioensayos, estas son la selectividad y sensibilidad, por ello hay que tener en cuenta estos criterios al seleccionar y emplear los bioensayos, para obtener resultados confiables y fehacientes en el análisis de RCV. En la tabla 8 se muestran los bioensayos que se realizaron, para determinar la actividad biológica de los extractos obtenidos, es decir aquellos que mostraban una buena sensibilidad y un resultado rápido (Larqué y Rodríguez 1993 y Gutiérrez, 1996).

Tabla 8. Bioensayos empleados para determinar la actividad biológica de los extractos obtenidos a partir de la composta.

ABA	AIA	CIT	GAs
Bioensayo de la inhibición de la elongación del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Prueba del cilindro del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Bioensayo de la acumulación de betacianinas en <i>Amaranthus Hybridus</i>	Bioensayo de la prueba del crecimiento del tallo del chícharo (<i>Pisum sativum</i>)
Bioensayo de la inhibición de la germinación de <i>Lepidium sativum</i> L.	Bioensayo de la elongación de raíz de <i>Lepidium sativum</i> L. y <i>Triticum aestivum</i> L.	Bioensayo de germinación de <i>Lepidium sativum</i> L. y <i>Amaranthus Hybridus</i>	
Bioensayo de la inhibición de la elongación de la raíz de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) y <i>Lepidium sativum</i> L.			

Estos bioensayos se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad, para obtener un resultado lo más exacto posible. La respuesta obtenida para esta parte del análisis es puntual, es decir no se cuantifica la concentración del RCV, sino que solo se compara con el estándar y se determina puntualmente si el extracto evaluado presenta actividad biológica similar al estándar o no. Así, los bioensayos arrojaron los siguientes resultados:

Existe evidencia de la presencia de compuestos con actividad biológica similar a los estándares de ABA, AIA y CIT, no siendo así para el extracto de GAs. Estos resultados nos muestran que solo el extracto obtenido para Giberelinas no tiene actividad biológica como tal, siendo que en los extractos restantes hubo evidencia de dicha actividad (Weaver, 1972; Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; Bensen *et al.*, 1990; Larqué y Rodríguez, 1993; y Gutiérrez, 1996). Para una mayor visualización de estos

resultados podemos observar la siguiente tabla.

Tabla 9. Resultados de los bioensayos empleados

RCV	ESTANDAR	EXTRACTO
ABSCISINAS	POSITIVO	POSITIVO
AUXINAS	POSITIVO	POSITIVO
CITOCININAS	POSITIVO	POSITIVO
GIBERELINAS	POSITIVO	NEGATIVO

Para el caso del ABA en los bioensayos observamos un efecto positivo, debido a que el efecto inhibitorio se determinó al realizar todas las pruebas, pues es considerado como el causante de la inhibición de la germinación de semillas, la apertura de los estomas y, en general del crecimiento vegetal. Para las auxinas, los bioensayos mostraron la presencia de este compuesto, debido a que en general es el causante de efectos tales como estimulación del crecimiento del tallo, de la división celular, inhibición del crecimiento radical, etc. Estos efectos se observaron durante la aplicación del extracto a los bioensayos, y al ser comparados con el estándar, dieron la pauta a decir que existe la posibilidad de la presencia de algún compuesto con actividad biológica de auxina.

Las citocininas también dieron positivo la prueba del bioensayo, es decir que el extracto analizado muestra evidencia para decir que existe posee algún compuesto con actividad biológica de citocinina. Cabe señalar que al igual que los resultados de los bioensayos sólo con un segundo análisis adicional y complementario podríamos definir si es válido o no nuestro argumento, pues es importante señalar que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más

complejos, ya que éstos están influenciados también por otros factores (no hormonales y nutricionales), tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, efectos físicos como luz, temperatura y aún por la calidad y tipo de la planta o tejido empleado (Hurtado y Merino, 1994).

Como mencionamos anteriormente existe la posibilidad de la presencia de compuestos similares a los RCV en la muestra analizada, sin embargo recordemos que tanto los bioensayos como la TLC son herramientas complementarias y para poder dar un argumento íntegro acerca de la presencia o ausencia, habría que comparar ambas técnicas (Brenner, 1981; Hubick y Reid, 1984; y Horgan, 1987)

TLC-BIOENSAYO

Para poder determinar si el extracto obtenido a partir de la composta contiene algún RCV se procedió a realizar una comparación entre las técnicas empleadas, como podemos ver en la tabla siguiente.

Tabla 10. Análisis comparativo de resultados entre TLC y bioensayos

ABSCISINAS		AUXINAS		CITOCININAS		GIBERELINAS	
BIOS	TLC	BIOS	TLC	BIOS	TLC	BIOS	TLC
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
PRESENCIA		PRESENCIA		AUSENCIA		AUSENCIA	

BIOS: Bioensayo; TLC: Cromatografía en capa fina

Para tener un criterio de clasificación y determinar si existe evidencia de la presencia de algún compuesto probable RCV se tomó como una prueba determinística que solo será positiva la evidencia si ambas pruebas resultan positivas, de lo contrario

se considerará sin suficiente evidencia o fundamento los resultados del análisis para dar el falló positivo a la prueba (Azaola, 1997).

Así pues de acuerdo a la tabla 10 podemos afirmar que hay suficiente evidencia de la presencia de abscisinas y auxinas en la muestra analizada, mientras que para los extractos correspondientes a las citocininas y giberelinas no existe evidencia de la presencia de alguno de estos en la muestra de composta.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RCV

Como una técnica adicional a las empleadas anteriormente se puede echar mano del uso de los bioensayos modificados, es decir se realiza el bioensayo pero ahora se emplea un gradiente de concentración del estándar del RCV a analizar (obteniéndose una curva de dosis-respuesta), esta es comparada con el extracto purificado obtenido a partir de la composta, esta es una herramienta que nos servirá para poder encontrar de manera indirecta la concentración del RCV presente en el extracto purificado y por ende en la muestra analizada, ya que se comparan los resultados de la curva patrón o estándar con los del extracto, el resultado del extracto evaluado se extrapola obteniéndose así de manera indirecta la concentración del Regulador del Crecimiento Vegetal analizado (Larqué, 1995).

Debido a los resultados obtenidos anteriormente solo se practico el análisis cuantitativo para las muestras correspondientes a la evaluación de ABA y AIA, pues son las únicas que presentan suficiente evidencia de la presencia del RCV, es decir

como se puede observar en la tabla 10, dieron positivas las pruebas de identificación en TLC y la actividad biológica (Bioensayo). En la tabla 11 se muestran los bioensayos empleados para este análisis indirecto.

Tabla 11. Bioensayos empleados para determinar la concentración de RCV.

ABA	AIA
Bioensayo de la inhibición de la germinación de <i>Lepidium sativum</i>	Bioensayo de la elongación de raíz de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L).
Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíces de <i>Lepidium sativum</i>	Bioensayo de la elongación de raíz de <i>Amaranthus Hybridus</i> .

Los bioensayos que se muestran en la tabla 11 son los que se emplearon para el análisis cuantitativo, ya que son los que mejor cubren con los requisitos indispensables para esta prueba: buena sensibilidad, selectividad y respuesta rápida (Weaver, 1972; Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; Bensen *et al.*, 1990; y Larqué, 1995).

Análisis cuantitativo de ABA

Bioensayo de la inhibición de la germinación de semillas de *Lepidium sativum* L. Cien semillas de *Lepidium sativum* L. se lavaron con agua y jabón, posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 5%, estas semillas se obtuvieron por donación del Programa de Botánica del Colegio de Posgraduados, posteriormente se mantuvieron en 100 mL de agua destilada estéril por una hora, mientras transcurría este tiempo se prepararon los tratamientos: A 10 cajas petri, en las que previamente se había colocado un circulo de papel filtro

Whatman # 1, a cada caja se le adicionaron 5 mL de una de las siguientes soluciones: 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} Molar de ácido abscísico; agua destilada (control o testigo) o el extracto purificado. Transcurrido el tiempo de las semillas en agua, se colocan 10 semillas en cada uno de los tratamientos descritos anteriormente. Las cajas así preparadas se tapan y se incuban en la cámara de germinación, cuarto con temperatura controlada a 24°C y oscuridad. Las lecturas del porcentaje y tiempo de germinación puede realizarse en lapsos de tiempo de 10 horas, después de haber establecido el experimento. Una vez concluido el bioensayo con los datos obtenidos, se realizaron las gráficas correspondientes a cada parámetro evaluado, se grafican los resultados del porcentaje o tiempo de germinación *versus* tratamiento (ABA, testigo y extracto), estos resultados se observan en las figuras 9 y 10. Ya con las gráficas se extrapola el valor del extracto purificado y se obtiene la concentración de ABA presente en el extracto purificado de la composta.

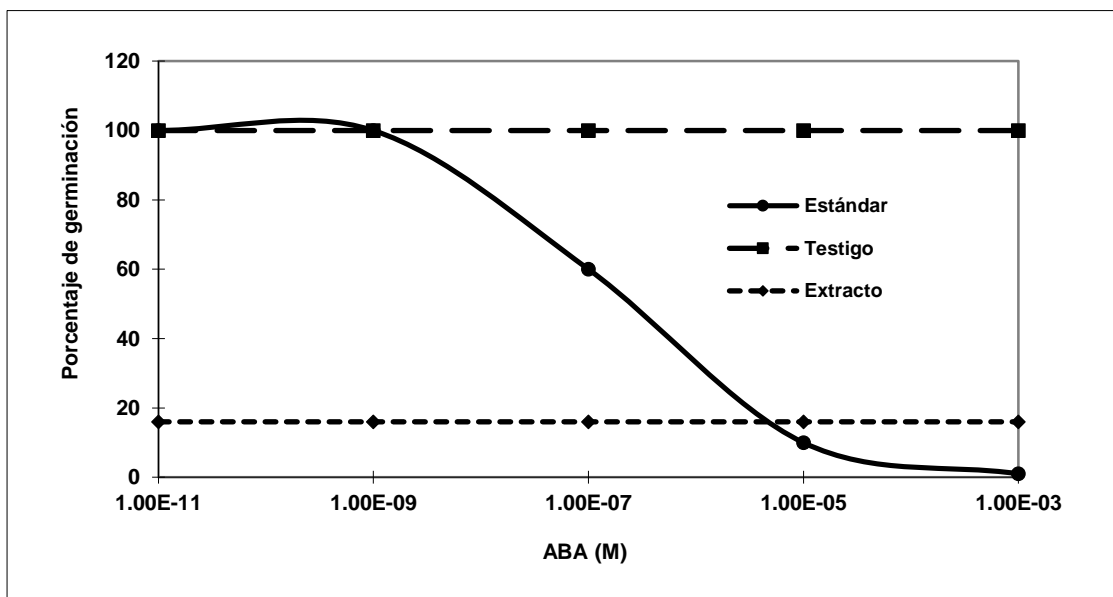


Figura 9. Gráfica de la inhibición del ABA en la germinación de *Lepidium sativum*

con respecto al porcentaje de germinación

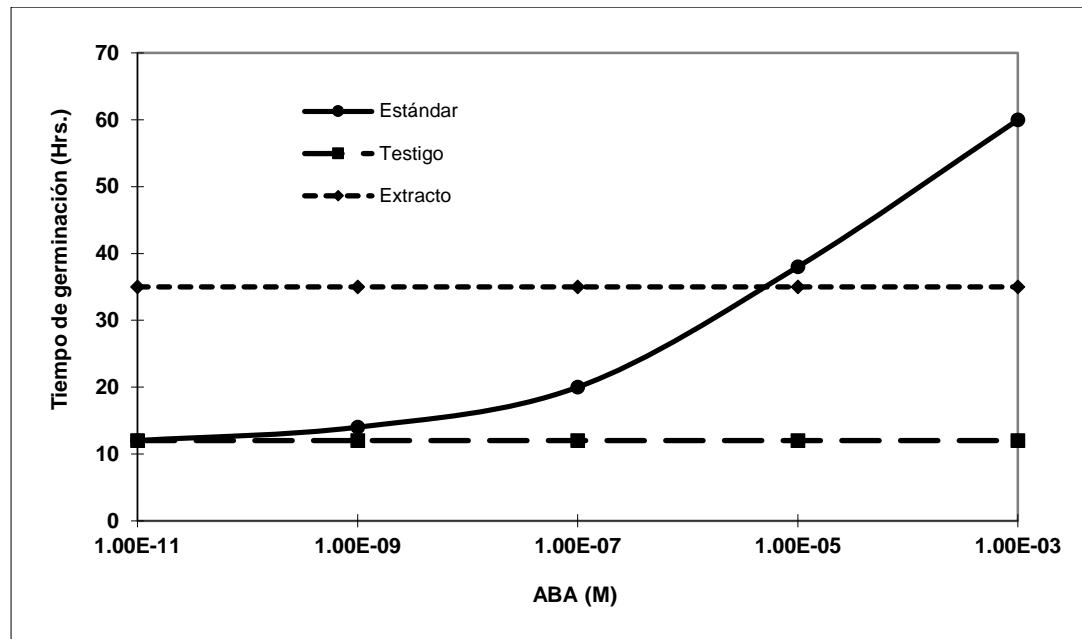


Figura 10. Gráfica de la inhibición de ABA en la germinación de *Lepidium sativum* con respecto al tiempo.

Bioensayo de la inhibición de la elongación de la raíz de *Lepidium sativum* L. Cien semillas de *Lepidium sativum* L. se lavaron con agua y jabón, posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 5%, estas semillas se obtuvieron por donación del Programa de Botánica del Colegio de Posgraduados, posteriormente se mantuvieron en 100 mL de agua destilada estéril por una hora. Las semillas lavadas, desinfectadas y sumergidas en agua, se colocan en cinco cristalizadores en donde previamente se colocó un soporte de papel filtro Whatman # 1, al cual se le adicionó hasta saturación agua destilada estéril, una vez colocadas las semillas se tapan los cristalizadores para evitar evaporación, preparados los cristalizadores, se llevan a la cámara de incubación y se mantiene a una temperatura de 24°C, obscuridad y humedad constante, después de 24 horas

se seleccionan las semillas que presenten una germinación lo más homogénea posible.

Tratamientos: A 10 cajas petri en las que a cada una, previamente se ha colocado un círculo de papel filtro Whatman # 1; se le adicionaron 5 mL de una de las siguientes soluciones: 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} Molar de ácido abscísico; agua destilada (control o testigo) y el extracto purificado (muestra a evaluar). A todas las semillas germinadas que se seleccionaron se les mide la radícula con una regla para corroborar que tienen en promedio el mismo tamaño, posteriormente se colocan en grupos de 10 en las cajas de petri con los tratamientos previamente descritos, las cajas se tapan para evitar la evaporación de los tratamientos. Las cajas se incuban en la cámara de germinación, cuarto con temperatura controlada a 24 °C, oscuridad y humedad, ahí permanecen por un período de 24 horas.

A las 72 horas de comenzado el bioensayo, se realiza una lectura de los tratamiento primeramente midiendo la longitud de la raíz de las semillas del lote con agua destilada (testigo), los valores obtenidos se denominan L_0 y nos servirán para obtener un cociente que se obtiene con las lecturas de los demás tratamientos (ABA y extracto purificado), las lecturas de la longitud de la raíz de las semillas con estos tratamientos se denominan L_T , posteriormente con todos los valores obtenidos, se efectúa el cociente L_T / L_0 y estos nuevos valores son los que se grafican *versus* los tratamientos, gradiente de concentración de ABA y extracto purificado de la composta, ver figura 11, con estos datos se extrapola el valor del extracto purificado y se obtiene la concentración de ABA presente en la muestra.

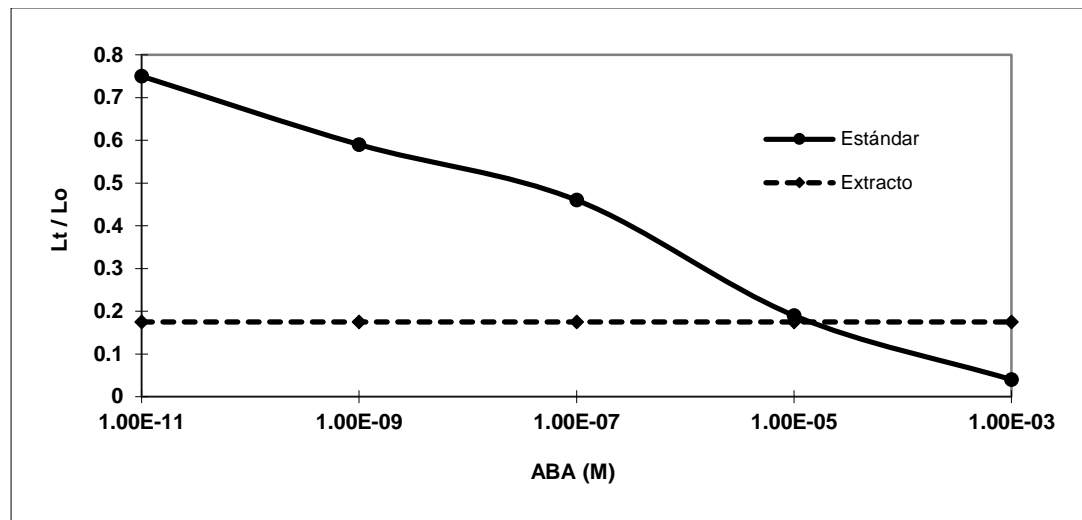


Figura 11. Gráfica de la inhibición de ABA en la elongación de raíces de *Lepidium sativum* L. Lt: Longitud del lote tratado, Lo: Longitud del lote testigo

Análisis cuantitativo de AIA

Se sabe que las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de las raíces, debido a que en general el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo* además de que incrementa su crecimiento, pero también puede provocar la inhibición de tales efectos a concentraciones relativamente altas.

Bioensayo de la elongación de la raíz de trigo (*Triticum aestivum* L). 100 semillas seleccionadas de *Triticum aestivum* L. se lavaron con agua y jabón, posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 2%, estas semillas se obtuvieron por donación del Programa de Botánica del Colegio de Posgraduados, posterior a su lavado y desinfección se colocaron en un cristalizador con 100 mL de agua destilada estéril por seis horas. Transcurrido este tiempo, las semillas se colocan en cinco charolas en donde previamente se colocó un soporte

de papel filtro Whatman # 1, al cual se le adicionó hasta saturación agua destilada estéril, las semillas se colocan con el embrión hacia abajo, para garantizar que la radícula que abajo del embrión, una vez colocadas las semillas se tapan las charolas con plástico adherente para evitar la evaporación del agua, preparadas las charolas, se llevan a la cámara de incubación y se mantiene a una temperatura de 24°C, obscuridad y humedad constante, después de 72 horas se seleccionan las semillas que presenten una germinación lo más homogénea posible, es decir que tengan una radícula de aproximadamente 10 milímetros de longitud.

Tratamientos: A 20 cajas petri en las que a cada una, previamente se le ha colocado un circulo de papel filtro Whatman # 1; se les adicionaron 5 mL de una de las siguientes soluciones: 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} Molar de Ácido-3-indól acético (AIA), agua destilada (control o testigo) o el extracto purificado (muestra a evaluar). A todas las semillas germinadas que se seleccionaron se les mide la radícula con una regla para corroborar que tienen en promedio el mismo tamaño (10 mm), posteriormente se colocan en grupos de 5 semillas germinadas en las cajas de petri con los tratamientos previamente descritos, las cajas se tapan para evitar la evaporación de los tratamientos. Las cajas preparadas se llevan a la cámara de incubación, cuarto con temperatura controlada a 24 °C, oscuridad y humedad, ahí permanecen por un período de 72 horas.

A las 72 horas de comenzado el bioensayo, se realiza la lectura de las radículas de los tratamientos, primeramente se mide la longitud de la raíz de las semillas del tratamiento con agua destilada (testigo), los valores obtenidos se denominan L_0 y

nos servirán para obtener un cociente que se obtiene con las lecturas de las lecturas de los demás tratamientos (ABA y extracto purificado), las lecturas de la longitud de la raíz de las semillas con estos tratamientos se denominan L_T , posteriormente con todos los valores obtenidos, se efectúa el cociente L_T / L_0 y estos nuevos valores son los que se grafican *versus* los tratamientos, gradiente de concentración de AIA y extracto purificado de la composta, ver figura 12, con estos datos se extrapola el valor del extracto purificado y se obtiene la concentración de AIA presente en la muestra evaluada.

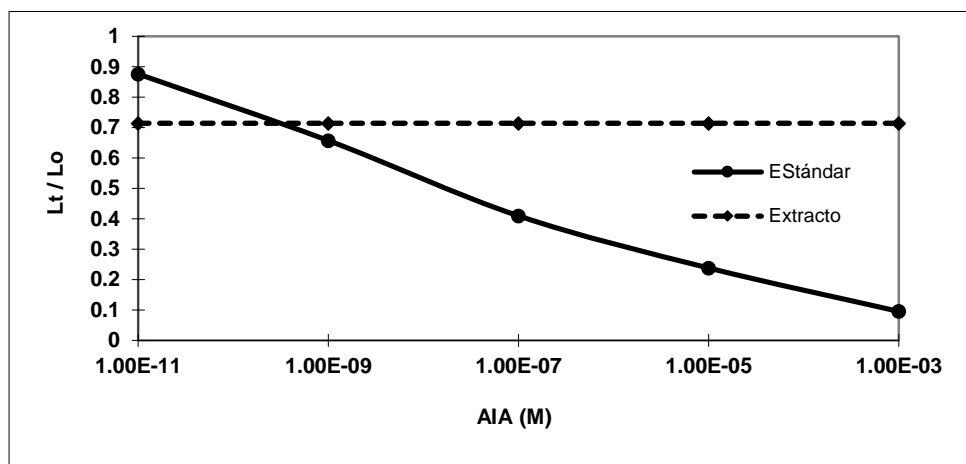


Figura 12. Gráfica del efecto del AIA en la elongación de la raíz de trigo *Triticum aestivum*. Lt: Longitud del lote tratado, Lo: Longitud del lote testigo

Bioensayo de la elongación de la raíz de *Amaranthus Hybridus*. Se seleccionan aproximadamente 100 semillas de *Amaranthus Hybridus* las cuales se lavaron con agua y jabón, posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 2%, estas semillas se obtuvieron por donación del Programa de Botánica del Colegio de Posgraduados, posterior a su lavado y desinfección se colocaron en un cristalizador con 100 mL de agua destilada estéril por una hora.

Transcurrido este tiempo, las semillas se colocan en dos charolas en donde previamente se colocó un soporte de papel filtro Whatman # 1, al cual se le adicionó hasta saturación agua destilada estéril, una vez colocadas las semillas se tapan los cristalizadores con plástico adherente para evitar la evaporación del agua, preparados los cristalizadores, se llevan a la cámara de incubación y se mantiene a una temperatura de 24°C, obscuridad y humedad constante, después de 36 horas se seleccionan las semillas que presenten una germinación lo más homogénea posible, es decir que tengan una radícula de aproximadamente 2 milímetros de longitud.

Tratamientos: A 10 cajas petri a las que previamente se le coloco un circulo de papel filtro Whatman # 1; se les adicionaron 5 mL de una de las siguientes soluciones: 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} Molar de Ácido-3-indól acético (AIA), agua destilada (control o testigo) o el extracto purificado (muestra a evaluar). A todas las semillas germinadas que se seleccionaron se les mide la radícula con una regla para corroborar que tienen en promedio el mismo tamaño (5 mm), posteriormente se colocan en grupos de 10 semillas germinadas en las cajas petri con los tratamientos previamente descritos, las cajas se tapan para evitar la evaporación de los tratamientos. Las cajas preparadas se llevan a la cámara de incubación, con temperatura controlada a 24°C, oscuridad y humedad, ahí permanecen por un período de 72 horas.

A las 72 horas de comenzado el bioensayo, se realiza la lectura de las radículas para todos los tratamientos, primeramente se mide la longitud de la raíz de las

semillas tratadas con agua destilada (testigo o control), estos valores obtenidos se denominan L_0 , posteriormente se realizan las lecturas de los demás tratamientos (ABA y extracto purificado), la longitud de la raíz de las semillas con estos tratamientos se denominan L_T , posteriormente con todos los valores obtenidos, se efectúa el cociente L_T / L_0 y estos nuevos valores son los que se grafican *versus* los tratamientos, gradiente de concentración de AIA y extracto purificado de la composta, ver figura 13, con estos datos se extrapola el valor del extracto purificado obtenido de la composta y se obtiene así la concentración de AIA presente en la muestra evaluada.

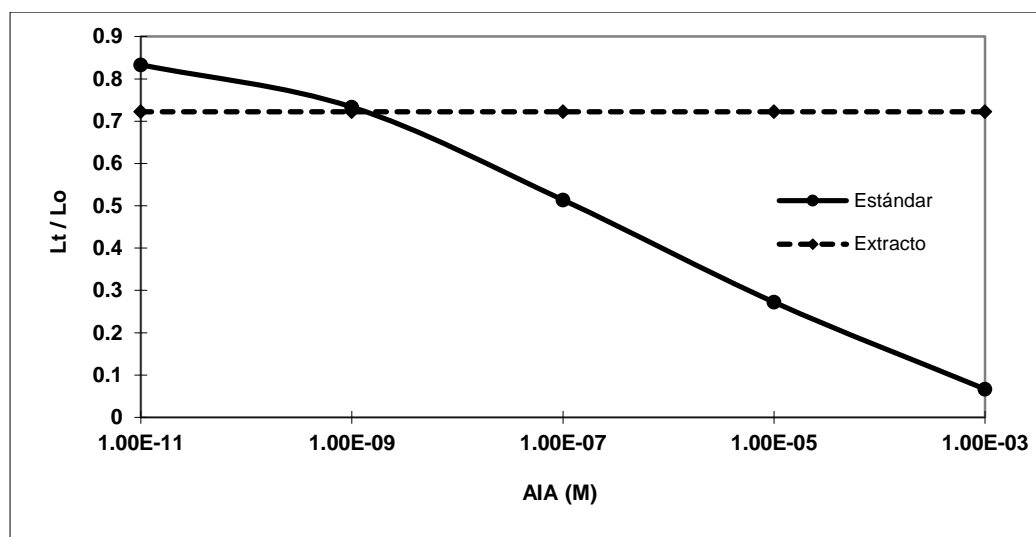


Figura 13. Gráfica de la inhibición de AIA en la elongación de la raíz de *Amaranthus Hybridus*. Lt: Longitud del lote tratado, Lo: Longitud del lote testigo

El objetivo de estos bioensayos es obtener una gráfica con un curva patrón de dosis-respuesta, la cual tendría un gradiente de concentración de 10^{-3} a 10^{-11} M de ABA o AIA. A la par se evalúa el extracto purificado de la composta y un testigo o control con agua destilada. Los resultados se comparan y posteriormente se realiza una extrapolación para determinar la concentración aproximada de ABA o AIA en el

extracto.

Como muestra la figura 9 la curva de dosis respuesta nos indica que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de ABA y el porcentaje de inhibición, tal que a una concentración alta de ABA el porcentaje de semillas germinadas de *Lepidium* se ve casi totalmente inhibido, por otra parte al comparar los valores del extracto purificado a evaluar, podemos apreciar que sus valores son similares al tratamiento 10^{-5} M de AIA, además que se encuentra dentro del rango de los niveles de la curva patrón. La figura 10, no indica que aún después de haber transcurrido un lapso de tiempo apropiado (60 horas) la inhibición de la germinación sigue acentuada, mostrando el cada vez mas marcado efecto del ABA en el extracto purificado, ya que sus valores son similares al tratamiento con 10^{-4} Molar de ABA.

Para una mayor percepción del efecto tanto de la curva dosis-respuesta como del testigo (agua destilada) y el extracto purificado, podemos observar la figura 11, la cual nuevamente indica que en nuestro extracto obtenido existe la presencia de un compuesto con actividad de ABA. Por otra parte los datos fueron analizados de acuerdo a SAS, 1982. Obteniéndose que la concentración aproximada de ABA en el extracto es de $1.0015 \cdot 10^{-5}$ M con un nivel de significancia de 0.001.

La figura 12 muestra el efecto de la concentración del AIA en la raíz de trigo, como podemos observar el resultado de la aplicación de este, es directamente proporcional con la inhibición del desarrollo de la raíz, es decir a mayor concentración de AIA mayor inhibición del crecimiento de la raíz. De la misma

manera e igual magnitud la figura 13 arroja resultados similares, pero ahora con respecto al crecimiento de la raíz de *Amaranthus*, tales efectos comparados con la respuesta observada con la aplicación del extracto, nos muestran de manera inequívoca que en el extracto purificado de la composta existe la presencia de un compuesto con actividad biológica de AIA, en una concentración de $2.2927 \cdot 10^{-8}$ M con un nivel de significancia de 0.001 (SAS, 1982).

Finalmente, los bioensayos han sido y continúan siendo una herramienta invaluable para determinar la actividad biológica en el análisis de RCV, particularmente cuando el compuesto(s) de interés no se pretende caracterizar químicamente o es analizado cuantitativamente. Sin embargo cuando el objetivo es mayor, como identificar y cuantificar el o los RCV posterior a una caracterización química, los procesos fisicoquímicos son una herramienta mucho mejor que los bioensayos. Pues en general estos métodos poseen gran especificidad comparados con los bioensayos permitiendo la identificación del compuesto a analizar o aislar, en un tiempo relativamente corto. Algunos de estos métodos son por ejemplo los inmunoensayos.

Como menciona García-Martínez *et al.* (1995) la composta, dada la naturaleza del material que le dio origen es un material difícil de caracterizar, debido a que para llevar acabo tal tarea sería necesario llevar un análisis durante todo el proceso y no solo puntualmente (Iglesias-Jiménez y Pérez-García, 1992; Iglesias-Jiménez y Alvarez, 1993; y Arozarena *et al.*, 1995). Además posterior a su caracterización la evaluación agronómica muestra diversos efectos al ser incorporada a un suelo empobrecido, disminuyendo el tiempo de germinación y promoviendo la

diferenciación celular (aumento de talla) en cultivos de alfalfa y sorgo. Estos solo se observan para concentraciones de alrededor del 30% de composta. (García-Martínez *et al.*, 1995 y López-Sánchez 1996)

Pero los efectos anteriormente descritos no tienen una respuesta en el análisis de la composta, pues la concentración de la fracción asimilable o hidrosoluble de cualquiera de los elementos analizados (macro o micro nutrientes) no rebasa el 10% de su valor total, por tal motivo podemos descartar que los cultivos tienen una respuesta debida a la incorporación de algún nutriente específico contenido en la composta y permite suponer que la composición química de la muestra analizada no es la responsable de tales atributos, dejando abierta la respuesta a la posible presencia de algún compuesto probable Regulador del Crecimiento Vegetal.

Para dar respuesta a esta incógnita se puede observar la tabla 7, donde se muestra que existe suficiente evidencia de la presencia de ABA y AIA en el extracto evaluado, obtenido de la muestra de composta. La respuesta de todas las técnicas empleadas para analizar la muestra de composta, nos muestran que para el caso del ABA, existen los resultados de la tabla 12, mientras que para el AIA, los resultados resumidos están en la tabla 13.

Tabla 12. Análisis de la presencia de ABA en la muestra de composta

Peso empleado De muestra	Concentración (M) de ABA	Concentración (g/L) de ABA	Cantidad de ABA en la muestra
50 gramos	$1.0015 \cdot 10^{-5}$	0.0026469	0.0013234 gramos

Conc.: Concentración, M: Molar (mol/litro), g/L: gramos/litro

Tabla 13. Análisis de la presencia de AIA en la muestra de composta

Peso empleado De muestra	Concentración (M) de ABA	Concentración (g/L) de ABA	Cantidad de AIA en la muestra
50 gramos	$2.2927 \cdot 10^{-8}$	0.000004	0.000002 gramos

Conc.: Concentración, M: Molar (mol/litro), g/L: gramos/litro

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de la concentración de ABA muestran que en general se encontró para la muestra analizada un promedio de 26.468×10^{-3} gramos de ABA por kilogramo de composta obtenida bajo las mismas condiciones que García-Martínez *et al.* (1995).

Por otra parte también los análisis muestran que algunos de los efectos observados por Lopez-Sánchez (1996) y García-Martínez *et al.* (1995) en relación a la incorporación de composta a cultivos de alfalfa y sorgo, al existir un incremento en la talla de estos cultivos en una concentración del 30%, es decir que se estaba incorporando alrededor de 4×10^{-5} gramos de AIA por kilogramo de composta

Sin embargo los efectos observados en los cultivos donde se incorporó composta no son causados únicamente por la adición de nutrientes externos, como nitrógeno, fósforo, potasio, etc. o algún RCV endógeno. Sino es importante señalar que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, ya que éstos están influenciados también por otros factores (no hormonales y nutricionales), tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, efectos físicos como luz, temperatura y aún por la calidad y tipo de la planta o tejido

empleado (Hurtado y Merino, 1994).

SEGUNDA PARTE

EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

PRÓLOGO

Las técnicas empleadas en la primera etapa del trabajo, cuyo objetivo era la extracción y purificación de reguladores del crecimiento vegetal, necesitan forzosamente ser evaluadas nuevamente para evidenciar si en realidad están cumpliendo con su función y objetivos; de tal forma que se diseñaron tres experimentos cuyo objetivo es monitorear durante el desarrollo de toda la metodología, la presencia de reguladores del crecimiento vegetal, de tal forma que durante todas las etapas de la extracción y purificación se siguió un estándar del RCV a extraer y purificar.

Para este objetivo, una técnica auxiliar empleada comúnmente para la comprobación de la técnica ó metodología (Durley *et al.*, 1989; Larqué, 1995; y Gutiérrez, 1996), es el uso de un estándar interno durante la extracción, es decir se coloca una concentración conocida de algún compuesto identificado como el

Regulador del Crecimiento Vegetal a analizar para cada técnica (AIA, Kinetina o Ac. Giberélico), este estándar se coloca en lugar de la muestra usada habitualmente (en nuestro caso la composta) y se realiza la extracción, empleando la técnica apropiada; durante el desarrollo y al final, se determina si el estándar no sufrió un cambio en su estructura (comúnmente ocurrida al extraer las GAs) y poder estar seguros que la técnica no causará alteraciones en la muestra y así arroje resultados erróneos (Brenner, 1981), además de evaluar cada uno de los pasos de las diferentes técnicas, también se evaluaron los solventes de desecho para así poder asegurar que no existían fugas o pérdidas en estos. Una vez obtenidas las muestras de cada técnica se evalúan, mediante cromatografía en capa (TLC)

EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE RCV

Los estándares de los Reguladores del crecimiento vegetal que se emplearon, son reactivos Sigma Cell Culture (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) para cada metodología a evaluar, de tal forma que para las auxinas se utilizó Ácido-3-indol acético (AIA); para giberelinas, Ácido Giberélico (GA₃) y para las citocininas, Kinetina [6 fulfuril amino purina] (Kin), mientras que todos los solventes empleados son grado analítico J.T. Baker S.A. de C.V., Xalostoc, México. Para la TLC se emplearon cromatoplasmas de Silica gel 60F₂₅₄ (Merck Germany)

AUXINAS

Se pesaron 0.005 gramos de ácido-3-indol acético, los cuales se disolvieron en 0.5 mL de etanol, posteriormente se aforo la solución a un volumen de 20 mL con agua destilada. Una vez terminada la solución se adicionaron 100 mL de metanol al 80%.

La solución preparada se envaso en un frasco ámbar y se guardo en refrigeración (4°C) y oscuridad por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se procedió con la metodología empleada para la extracción y purificación de auxinas figura 6. En la metodología evaluada se tomaron muestras de 5 mL en los puntos críticos de la técnica a evaluar (figura 14), los cuales previamente se habían seleccionado, aquellos que eran considerados críticos se catalogaron con numero, mientras que los que correspondían a solventes para desecho se les asignaron letras para catalogarlos, el objetivo de estos últimos fue evaluar posibles fugas en la técnica empleada. Una vez terminadas la rutina de extracción y purificación se procedió a realizar la evaluación de la metodología, mediante el seguimiento del estándares colocado previamente, identificándolo en cada una de las muestras que se tomaron en los diferentes puntos marcados, para esta identificación se utilizó Cromatografía en capa fina (TLC), empleando cromatoplasmas de aluminio impregnadas con Sílica gel 60F₂₅₄ (Merck, Germany).

Se obtuvieron 5 muestras de la técnica y 3 de los solventes de desecho, cada una de 5 mL, para su evaluación se empleo placas de TLC, en las cuales se colocaron con una micropipeta a un centímetro de la base de la placa de cromatografía, cada una de las muestras, colocando a su vez en los extremos de la placa una solución 10⁻⁴M de ácido-3-indol acético, el cual servirá de referencia, la cromatoplasma se colocó en la cámara de cromatografía, la cual previamente se saturo con la fase móvil a emplear, la cual era una solución de cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico (50:40:10); la cromatografía se realizó en condiciones controladas de

temperatura, una vez terminada la cromatografía se observó la cromatoplaaca bajo luz ultravioleta para poder identificar las bandas y así obtener el R_F de las muestras y el estándar (Bentley, 1962)

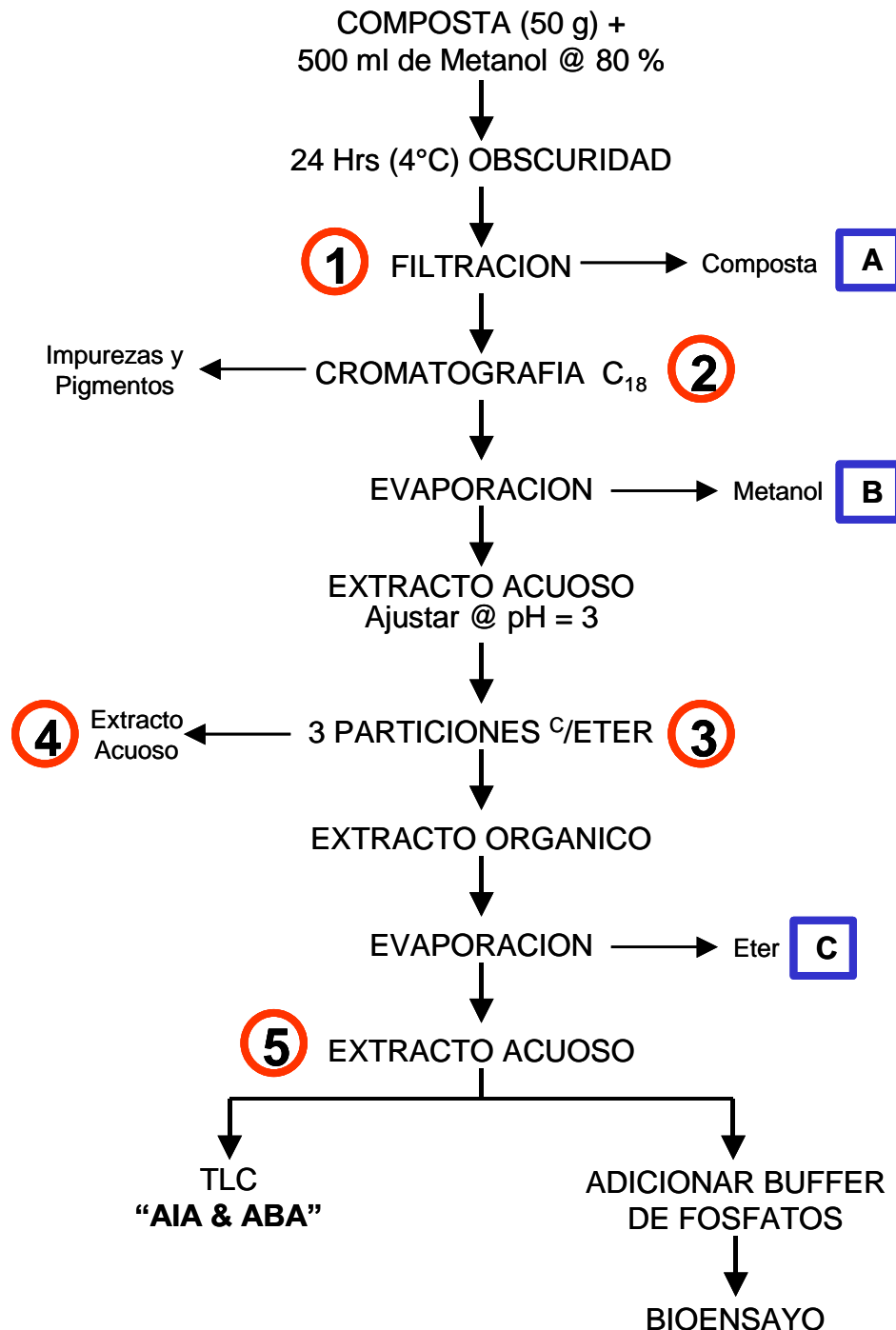


Figura 14. Puntos críticos para el monitoreo y evaluación de la técnica de extracción de ABA & AIA

CITOCININAS

Se pesaron 0.005 gramos de 6 furfuril amino purina y se disolvieron en 0.5 mL de una solución de NaOH 1N, posteriormente se aforo la solución hasta un volumen de 20 mL con agua destilada. Una vez terminada la solución se adicionaron 100 mL de una solución de HCl metanólico 1N. La solución preparada se envaso en un frasco ámbar y se guardo en refrigeración (4°C) y oscuridad por 2 horas.

Después de 2 horas, se procedió de acuerdo a la metodología empleada para extracción y purificación de Citocininas, figura 7. En la metodología a evaluar se tomaron muestras de 5 mL en los puntos críticos (figura 15), previamente seleccionados, estas muestras se envasaron en viales y se conservaron en refrigeración hasta su análisis. Una vez terminadas la rutinas de extracción y purificación se procedió a realizar la evaluación de la metodología, mediante el seguimiento de los estándares, identificándolos en cada una de las muestras que se tomaron en los diferentes puntos marcados, para esta identificación se utilizó cromatografía en capa fina (TLC), empleando cromatoplasmas de aluminio impregnadas con Sílica gel 60F₂₅₄ (Merck, Germany)

Para las citocininas se obtuvieron 8 muestras, las cuales se emplearon para la evaluación de la metodología, se empleo la TLC, ahora utilizando como referencia o estándar una solución de kinetina (6 furfuril amino purina) a una concentración de 10⁻⁴M, se empleo como fase móvil una solución de: isopropanol: hidróxido de

amonio: agua (10:4:6), la cromatografía se desarrollo bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, una vez terminada la cromatografía se observó la cromatoplaca bajo luz ultravioleta para identificar las bandas o manchas correspondientes a cada muestra y estándar, una vez identificadas se realizaron los cálculos para obtener el R_F .

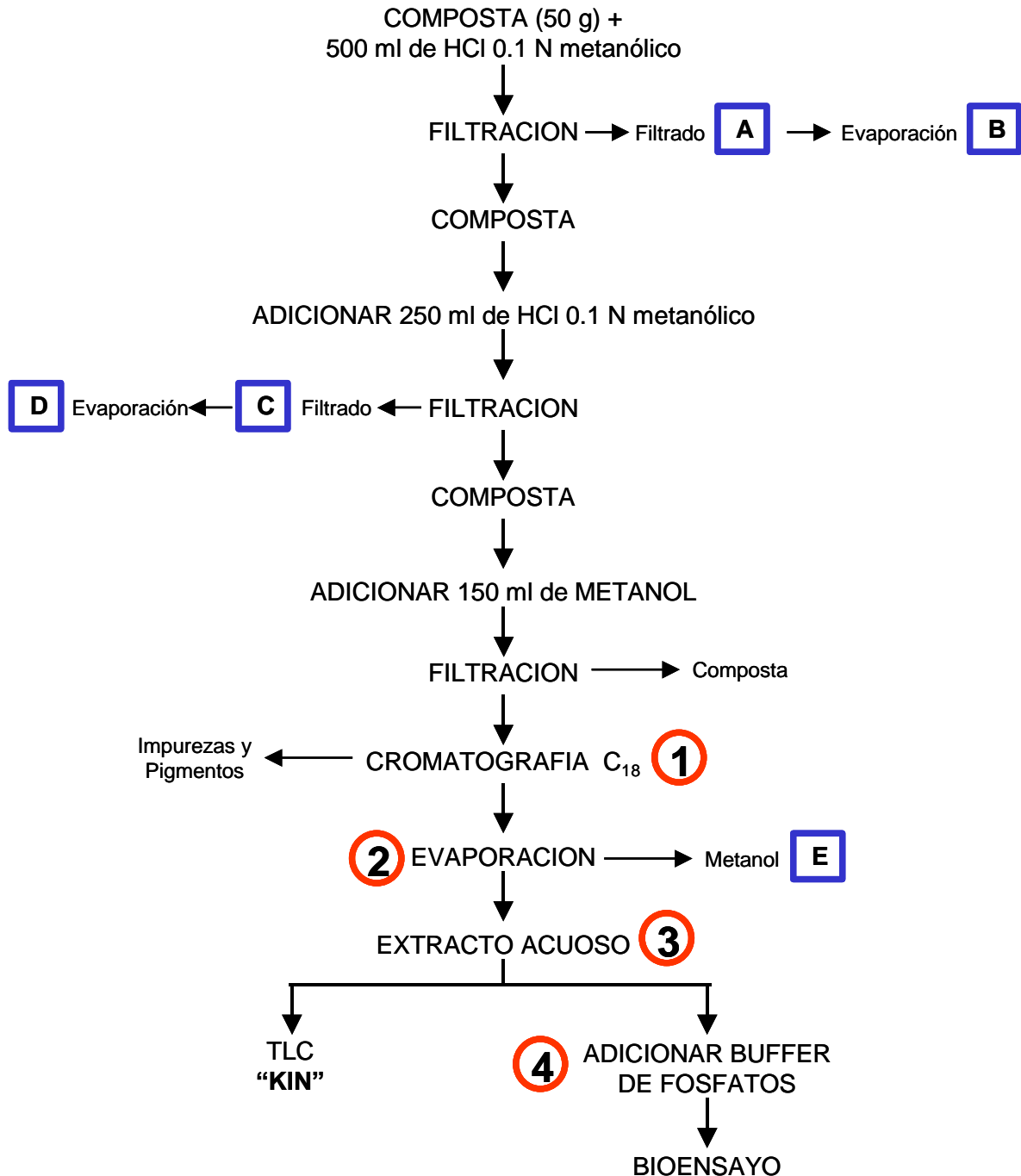


Figura 15. Puntos críticos para el monitoreo y evaluación de la técnica de extracción de Citocininas

GIBERELINAS

Se pesaron 0.005 gramos del Ácido Giberélico (GA₃) y se disolvieron en 0.5 mL de etanol, una vez disuelto el GA₃ se aforo la solución hasta un volumen de 20 mL con agua destilada. Una vez terminada la solución adicionaron 100 mL de acetona al 80%. La solución preparada se envaso en un frasco ámbar y se guardó en refrigeración (4°C) y oscuridad por 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se procedió con la metodología empleada para la extracción y purificación de giberelinas, figura 8. En la metodología a evaluar se seleccionaron los puntos críticos (figura 16), en estos puntos se tomaron muestras de 5 mL, las cuales se envasaron en viales y refrigeración para su posterior análisis. Una vez terminadas la rutinas de extracción y purificación se procedió a realizar la evaluación de la metodología empleada, mediante el seguimiento de los estándares, identificándolos en cada una de las muestras que se tomaron en los diferentes puntos marcados, para esta identificación se utilizaron placas de cromatografía en capa fina (TLC), empleando cromatoplasmas de aluminio impregnadas con Sílica gel 60F₂₅₄ (Merck, Germany).

En esta metodología se obtuvieron 11 muestras de los 11 puntos críticos seleccionados, cada uno de los cuales se colocó con ayuda de una micropipeta a un centímetro de la base de la placa de cromatografía de sílica gel, en los extremos

de la placa se colocó una muestra de ácido giberélico con una concentración de 10^{-4} M, la fase móvil empleada para su identificación fue acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (90:30:6), con la cual previamente se saturó la cámara de cromatografía y posteriormente se colocó la placa, la cromatografía se desarrolló a temperatura y humedad controlada, una vez terminada la cromatografía, se reveló la cromatoplaquea bajo luz ultravioleta, para identificar las bandas o manchas de las muestras a evaluar y así obtener los R_F de cada muestra.

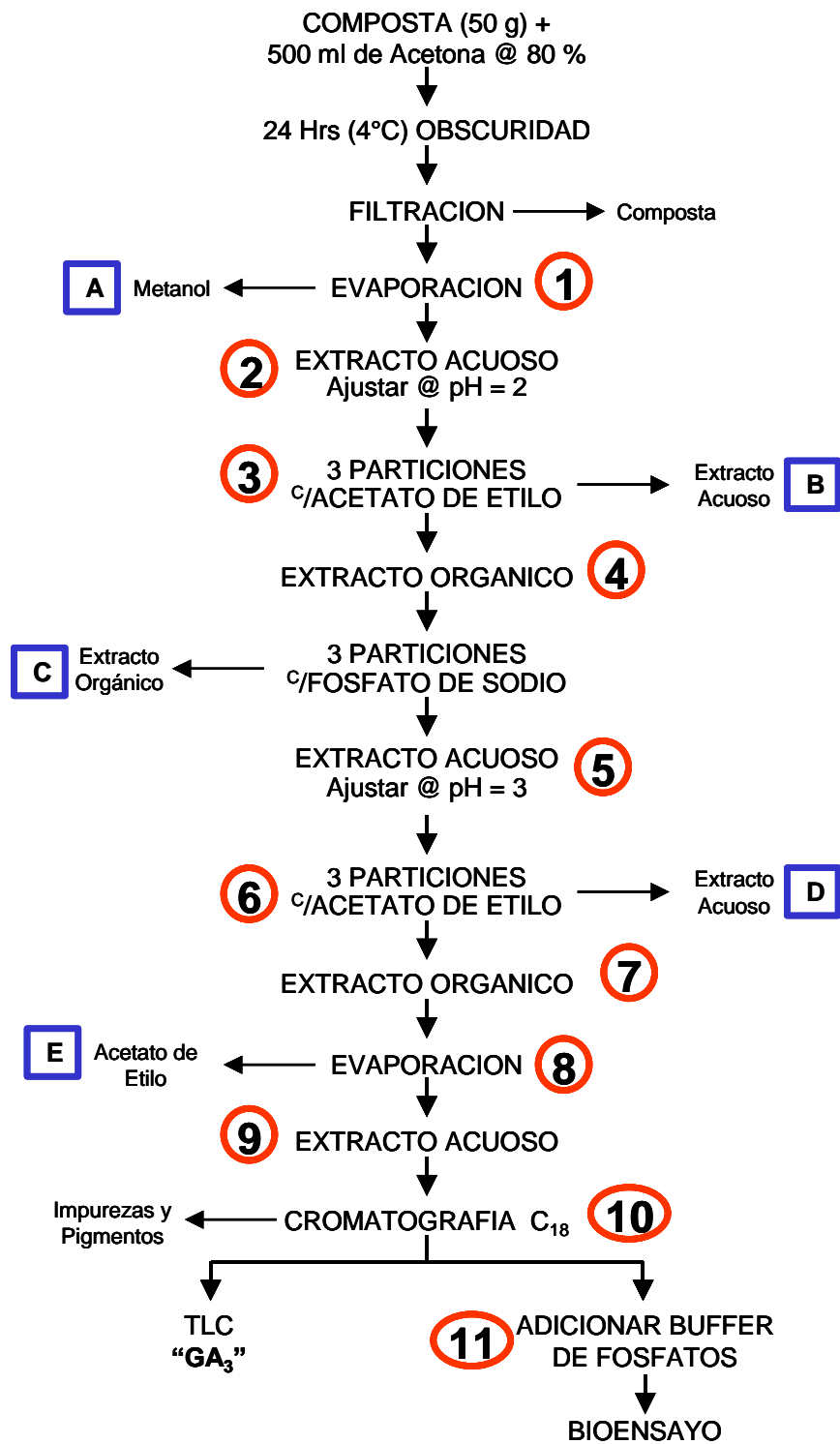


Figura 16. Puntos críticos para el monitoreo y evaluación de la técnica de extracción de Giberelinas

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Una vez obtenidos los datos de R_F para cada técnica evaluada y monitoreada, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos, también se realizó una prueba de Duncan para determinar si existía diferencia significativa entre las medias de los datos. Los valores de todos los puntos correspondientes a los solventes de desecho presentaron un valor de R_F de 1, por lo que estas muestras no presentaban indicios de poseer algún RCV, pudiendo afirmar que no existen fugas en las técnicas empleadas para la extracción de RCV.

En la figura 17 se puede observar la cromatoplaqueta obtenida de la TLC del monitoreo de la evaluación para la técnica de extracción y purificación de Auxinas, en la tabla 14 se pueden observar las medias de los valores para los R_F de la evaluación para la técnica de extracción y purificación de Auxinas, la tabla contiene los datos, los cuales nos muestran que no existe diferencia significativa ($P=0.05$) para los datos de las muestras 1, 2, 3, 5 y el estándar empleado, de tal forma que podemos decir que en estas muestras se encuentra AIA presente, sin embargo para la muestra 4 no existe tal evidencia, ya que en la muestra 4 no hay presencia de AIA, esto resulta obvio pues el punto 4 dentro de la técnica evaluada (ver figura 14) corresponde a una fase de desecho, esto nos ayuda a comprobar que no existen fugas en nuestra técnica empleada.

Tabla 14. R_F obtenidos en la TLC del monitoreo de AUXINAS

	STD	1	2	3	4	5
R_F	0.724	0.750	0.760	0.708	1.00	0.750

Medias de los valores con una desviación estándar de 0.01

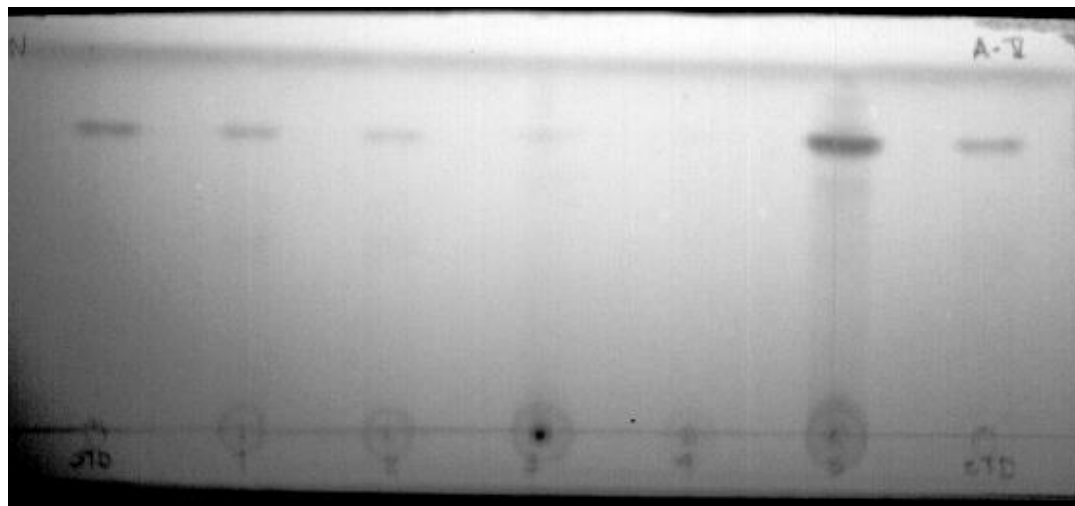


Figura 17. TLC obtenida del monitoreo de la evaluación para la técnica de extracción y purificación de Auxinas.

Para los datos de la evaluación de la técnica de Citocininas, estos se encuentran en la tabla 15, en esta tabla se puede observar que las muestras correspondientes a los puntos A, B, C y D de la técnica, presentan una gran diferencia con respecto al estándar, esto debido a que en estos puntos solo se evaluaba la posibilidad de fugas en nuestra técnica (ver figura 15), pero estas no se presentaron, mientras que para las muestras 1, 2, 3, 4 y estándar no existe diferencia significativa ($P = 0.05$), de tal forma que en estas muestras se encuentra KIN presente.

Tabla 15. R_F obtenidos en la TLC del monitoreo de CITOCININAS

	STD	A	B	C	D	1	2	3	4
R _F	0.851	1.00	1.00	1.00	1.00	0.836	0.821	0.821	0.836

Medias de los valores con una desviación estándar de 0.002

Los resultados de las muestras de la técnica de Giberelinas se pueden observar en la tabla 16, como podemos ver en esta tablas los valores de los puntos 5, 6 y 7 no tienen similitud con los otros valores, pero en la figura 16, estos puntos no corresponden a solventes de desecho, de tal forma que por lógica debería aparecer rastros de GA₃, sin embargo no es así, lo que nos puede hacer suponer que en realidad en estos puntos de la técnica la estructura de GA₃ cambia y posteriormente vuelve a recuperar sus estructura original, esto también lo podemos corroborar al observar que en el punto 11, el cual representa la etapa final de la técnica aparecen indicios de la presencia de GA₃, en relación a los resultados de las otras muestras podemos observar que no existe diferencia significativa ($P = 0.05$) entre el estándar y las muestras 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 y 11, por lo que podemos decir que existe evidencia suficiente de la presencia de GA₃ en las muestras analizadas. El cromatograma correspondiente a la TLC se puede observar en la figura 18. Por otra parte las muestras correspondientes a los puntos A, B, C, D y E no dieron positiva la prueba de detección de ácido giberélico, por lo cual podemos determinar fehacientemente que no existen fugas en nuestra técnica empleada, a menos claro esta que la concentración que se esta fugando sea casi cero por lo cual no se detectó.

Tabla 16. R_F obtenidos en la TLC para GIBERELINAS

STD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
R _F	0.51	0.49	0.48	0.48	0.46	1.00	1.00	0.49	0.50	0.48	0.48	0.43

Medias de los valores con una desviación estándar de 0.01

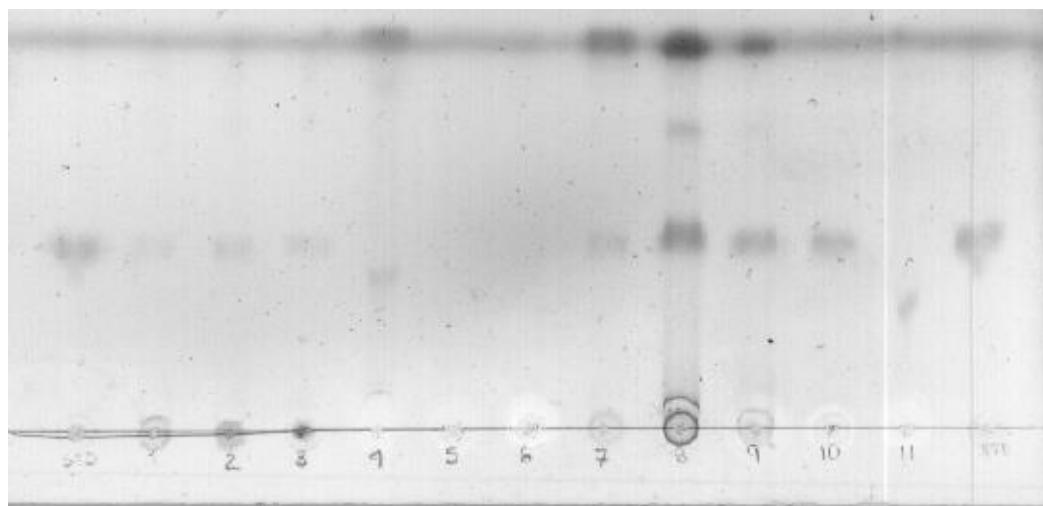


Figura 18. TLC obtenida del monitoreo de la evaluación para la técnica de extracción y purificación de Giberelinas.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a el análisis de los resultados obtenidos, podemos concluir que las técnicas empleadas para la extracción de Auxinas, Citocininas y Giberelinas si cumplen con su objetivo y que no existe evidencia de pérdidas de algún RCV durante su extracción y purificación.

TERCERA PARTE

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RCV

PRÓLOGO

Debido a la gran variabilidad que presentaba la muestra a analizar en sus componentes iniciales: basura institucional (residuos de la cafetería y pasto residual) y estiércol de vaca, en el proceso de elaboración de composta (composteo) que se desarrolló en la UAM-Iztapalapa y, que la variabilidad en los resultados de un lote a otro, era consecuencia de la heterogeneidad que caracteriza a las compostas como producto terminal (Gray *et al.* 1973) y; que la heterogeneidad de los materiales iniciales, varía de sobremanera la calidad de la composta como producto final, ocasionando que los resultados no podrían ser reproducibles para muestras de composta obtenidas de diferentes lotes ó en diferentes épocas del año, aún cuando el proceso por el cual se obtuvieron sea el mismo.

Por lo tanto, la variabilidad en los resultados de diferentes muestras analizadas, correspondientes a distintos lotes, sale de nuestro control, de tal forma que este problema nos llevó a tomar la decisión de emplear para esta ultima parte de la investigación, compostas comerciales, que aseguraran que la variabilidad en los componentes fuese menor y que la diferencia entre cada lote de producto obtenido sea pequeña o casi nula, de tal forma que se emplearon muestras de composta comercial de las marcas TIP MOR y *Hum Ecol.*

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa en donde se concluyó que existe suficiente evidencia de la presencia de compuestos con peso molecular similar al de las auxinas y abscisinas, se decidió no evaluar las Abscisinas, ya que estas solo se manifiestan de manera natural en periodos de estrés de las plantas, además se deduce que tanto las auxinas como las giberelinas poseen el mismo grupo funcional (grupo indol) ver figura 19, así se tomó la decisión de analizar y evaluar la presencia de auxinas y giberelinas en las compostas.

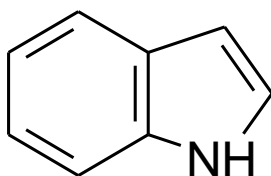


Figura 19. Indol

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista ecológico, es bien conocido por lo agricultores que buenos contenidos de materia orgánica, eliminan o reducen problemas de erosión eólica o hídrica. La adición de composta a los suelos favorece las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, haciendo crecer a las plantas más vigorosas y con mayor resistencia para algunas plagas y enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus (Gray et al., 1973; Smith, 1992; y Flanagan et al., 1993; y Sawhney y Shukla, 1994).

A pesar de la gran respuesta a la aplicación de compostas para el aumento en la

producción de cultivos, y su demostración a través de sus características estructurales de suelos mejorados y disponibilidad de nutrientes incrementada, aún hay fenómenos para los que no se encuentra alguna explicación a su presencia, así pues hay una disminución en el tiempo de floración, fructificación, un aumento en el tamaño de los frutos y otros aspectos más (Weaver, 1972; Giusquiani et al., 1989; Levi-Minzi et al., 1990; Smith, 1992; Iglesias-Jiménez y Alvarez, 1993; Hue et al., 1994; y López-Sánchez, 1996).

La escasa información al respecto que está disponible para evaluar la compatibilidad de las compostas como acondicionadores del suelo y fuente de nutrientes para usarse en la agricultura, deja abierta la pregunta acerca de la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o algún compuesto análogo de éstas.

El término de regulador de crecimiento vegetal (RCV), puede emplearse para las sustancias que en muy pequeñas concentraciones, provoca un efecto fisiológico en las plantas, ya sea inhibición o estímulo de alguna función (Hubick y Reid, 1984). Se conocen varias clases de RCV, algunos son promotores del crecimiento y desarrollo, y otros son inhibitorios; encontrándose clasificados en cinco grupos, Abscisinas (ABA), Auxinas (AIA), Citocininas (CIT), Giberelinas (GAs) y Etileno (Brenner, 1981; Hubick y Reid, 1984). Para los fines de esta última parte de la investigación, se realizaron pruebas para la detección de AIA y GAs, en los dos tipos de compostas.

METODOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

Se emplearon muestras de composta comercial TIP MOR (TP) (fig. 20), composta elaborada por Viveros de Cuernavaca y *Hum Ecol* (HE) (fig. 21), Fertilizante orgánico; producto agrícola elaborado por Rubén Zepeda Piña, para Comercializadora AMAUTA; Boyeros, Texcoco; Estado de México, México; las cuales presentaban el siguiente análisis de nutrientes:

Tabla 17. Contenido de nutrientes para *Hum Ecol*

ELEMENTO	VALOR
pH	7.2
Materia Orgánica	50-60%
Fósforo	0.98-1.5%
Nitrógeno	0.84-1.15%
Potasio	1.4-1.6%
Calcio	1.05-1.65%
Magnesio	1108-1618 ppm
Manganeso	18.4-30.5 ppm
Hierro	27-47
Zinc	37.4-49.3
Cobre	25-29
Boro	18.7-26.4
Conductividad Eléctrica	1.34 ds/m

El análisis de AIA y GAs se realizó, empleando una modificación de la metodología anteriormente establecida para la extracción, purificación e identificación de reguladores del crecimiento vegetal, presentes en una composta; La muestra a tratar se seco a temperatura ambiente y posteriormente se procedió según esta

metodología. Se tomaron 200 gramos de la muestra y se agregó el solvente referido por la técnica, el extracto obtenido posteriormente se envaso en frascos ámbar para su posterior identificación.

Se empleo cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) para la purificación e identificación preliminar, utilizando cromatoplasmas de aluminio impregnadas de sílica gel 60F₂₅₄, 0.50 mm, Merck KgaA, Germany; empleando como patrón de referencia una solución de 10⁻⁴ Molar de ácido-3-indól acético (AIA), para las auxinas y ácido giberélico (GA₃) para el análisis de las giberelinas. La placa se corrió en una cámara de cromatografía empleando la fase móvil adecuada. El cromatograma obtenido se reveló bajo luz ultravioleta (UV) para la identificación de las bandas correspondientes y obtención de los R_F de cada una de las bandas obtenidas, correlacionándose con los R_F de los estándares bajo las mismas condiciones (Brenner, 1981; Hedden, 1993). Los extractos purificados obtenidos de la TLC se analizaron para su identificación empleando un Espectrómetro de Masas (MS) marca Finnigan MAT TSQ 700 para el análisis de las auxinas y un MAT 900 para el análisis de la giberelinas.

Todos los estándares utilizados (ácido-3-indol acético y ácido giberélico) durante el experimento fueron grado reactivo, Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA. Los reactivos y solventes empleados fueron grado analítico, J.T. Baker S.A. de C.V., Xalostoc, Mexico.



Figura 20. Composta *TIP MOR*



Figura 21. Composta *Hum Ecol*

EXTRACCIÓN DE AUXINAS

Se pesaron 200 gramos de composta seca, posteriormente se adicionaron 400 mL de metanol @ 80% (vol/vol), se agitó la mezcla durante una hora, transcurrido este tiempo se envasó en un frasco ámbar, se sello, etiqueto y guardo en refrigeración, aproximadamente a 4°C y oscuridad por 24 horas, para su posterior uso.

Transcurridas las 24 horas, se homogenizo la mezcla y filtro empleando papel Whatman no. 40, para remover la fracción sólida y obtener un extracto metanólico lo mas limpio posible y libre de impurezas. Una purificación preliminar se realizó haciendo pasar el extracto metanólico por una columna de cromatografía, empleando columnas Adsorbex LiChrolut RP-18 (Merck KgaA, Germany), columna

para extracción en fase sólida, empacada con sílicageles sintéticos, previo a este paso, la columna se activo haciendo pasar 5 mL de cada uno de los siguientes solventes, en este orden: agua desionizada, éter y metanol, de esta forma se activa la columna y esta lista para emplearse, con el empleo de la columna, esta eliminándose la fracción correspondiente a los pigmentos y así obtener un extracto exento de algunos compuestos que interfieren en su purificación y posterior identificación (Gutiérrez, 1996), el extracto metanólico obtenido se concentró en un rotavapor, a 35°C y presión reducida (vacío). El extracto acuoso que se obtuvo se trato de acuerdo a la figura 22.

El extracto acuoso se ajusto a un pH de 3 adicionando HCl 6N, una vez ajustado el pH se procedió a realizar tres particiones, agregando en cada una un volumen de 50 mL de éter, recuperando y almacenando la fase orgánica y desechando la fase acuosa, obteniéndose 150 mL de la fase etérea, la cual se colocó en un rotavapor concentrándose el extracto hasta sequedad y desechándose el eter.

El extracto seco se resuspendió en 5 mL de metanol, para después pasarlo por una columna de cromatografía Adsorbex LiChrolut RP-18, previo a este paso, la columna se activo como anteriormente se describió, de esta forma se obtuvo un extracto parcialmente purificado y listo para un nuevo análisis (Brenner, 1981; Durley *et al.*, 1989; Poling, 1991; Hedden, 1993; y Taylor *et al.*, 1994).

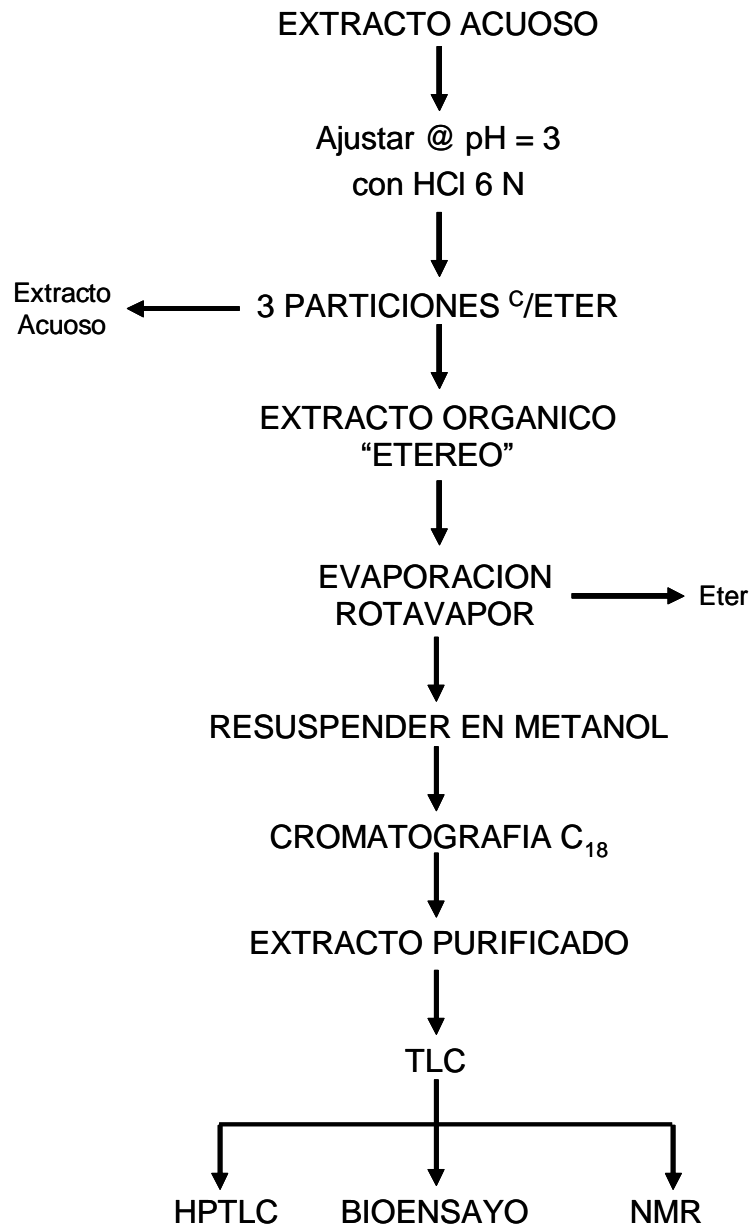


Figura 22. Metodología para la extracción purificación e identificación de AIA

Al extracto purificado se le realizó una nueva purificación, empleando la cromatografía en capa fina (TLC), al extracto de la composta obtenido se le realizaron tres análisis: Identificación preliminar, empleando cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC); identificación final, determinando su estructura

mediante espectrómetro de masa (MS) y establecer si poseía actividad biológica mediante el empleo de bioensayos específicos.

EXTRACCIÓN DE GIBERELINAS

Se pesaron 200 gramos de composta seca, posteriormente se adicionaron 400 mL de acetona @ 80% (vol/vol), se agitó la mezcla durante una hora, transcurrido este tiempo se envasó en un frasco ámbar, se selló, etiquetó y guardó en refrigeración, aproximadamente a 4°C y oscuridad por 24 horas, para su posterior uso.

Transcurridas las 24 horas, se homogenizó la mezcla y filtro empleando papel Whatman no. 40, para remover la fracción sólida y obtener un extracto orgánico-acuoso (acetona @ 80%) libre de impurezas. Una purificación preliminar se realizó haciendo pasar este extracto orgánico por una columna de cromatografía, empleando columnas Adsorbex LiChrolut RP-18 (Merck KgaA, Germany), obteniéndose de esta forma un extracto parcialmente libre de pigmentos y algunos compuestos que interfirieran en su purificación y posterior identificación (Gutiérrez, 1996), el extracto de orgánico obtenido se concentra en un rotavapor, a 35°C y presión reducida (vacío), eliminándose la fracción orgánica correspondiente a la acetona; al extracto acuoso obtenido se le ajusta el pH a 2 empleando ácido fosfórico para este fin, posteriormente el extracto acuoso se trató de acuerdo a la figura 23.

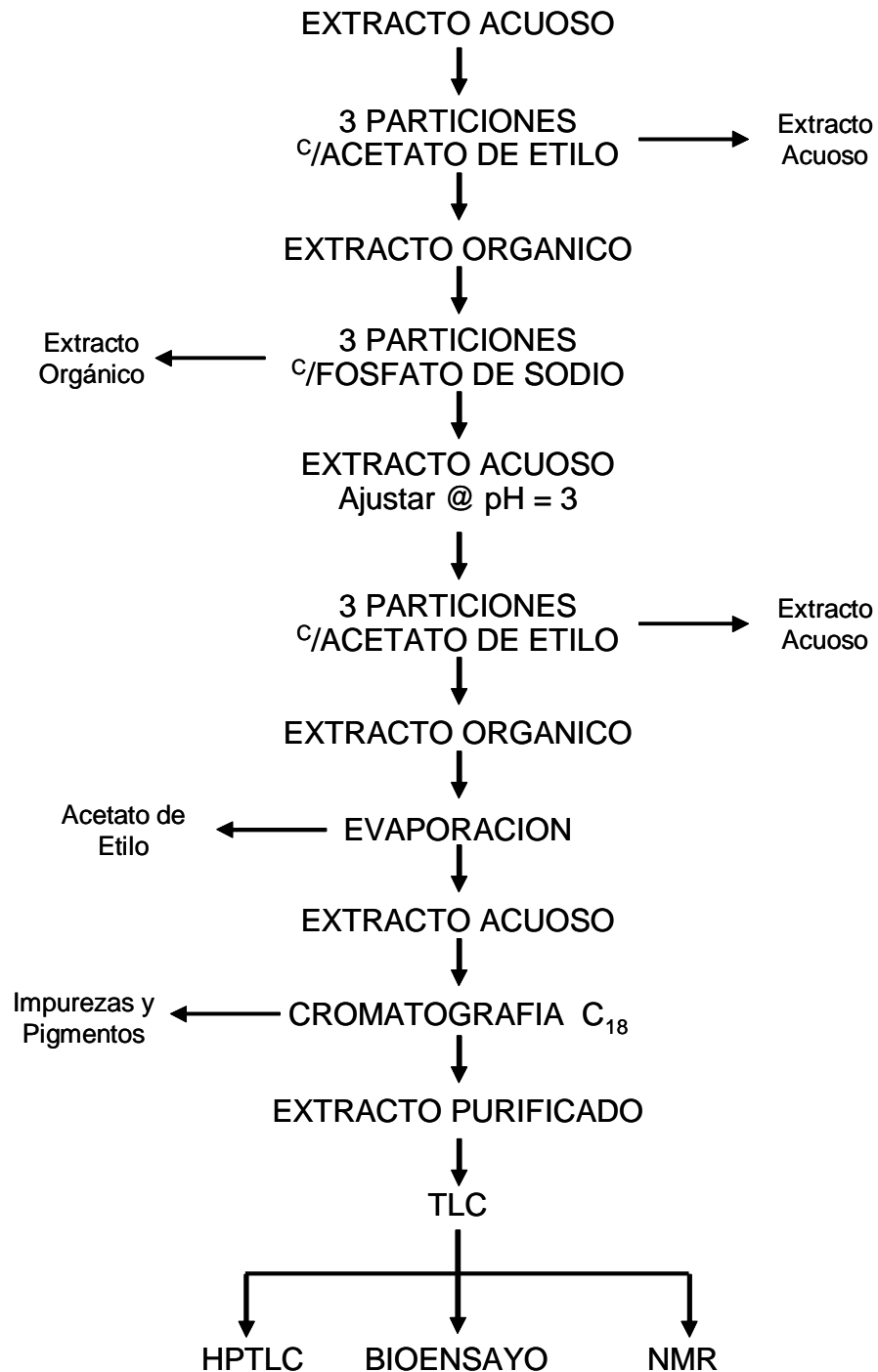


Figura 23. Metodología para la extracción purificación e identificación de GAs.

Las particiones se realizaron empleando un volumen de 50 mL de cada solvente (acetato de etilo o fosfato de sodio), el pH se ajusto empleando ácido fosfórico.

El extracto purificado que se obtuvo, posteriormente se paso por una última purificación empleando cromatografía en capa fina, al extracto de composta purificado obtenido se le realizan tres análisis finales: identificación parcial (HPTLC), identificación final, determinando su estructura empleando un espectrómetro de masas (MS) y finalmente su actividad biológica (bioensayos).

PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Para la cromatografía en capa fina (TLC), se elaboraron cromatoplasmas de vidrio de 20 x 20 cm, impregnadas con Sílica Gel Merck 60F₂₅₄, una vez elaboradas se dejaron secar por 24 horas en un gabinete de desecación, antes de su empleo; transcurridas las 24 horas y después de asegurarse que las placas estaban totalmente secas, se aplicó el extracto de composta a analizar en forma de banda (de 10 cm de longitud, dejando un margen de 2 cm en la parte que se elija como base de la placa) con ayuda de un tubo capilar; a la misma altura del extracto de composta y en ambos costados y con 2 cm de separación se colocan dos nuevas bandas, correspondiente al patrón de referencia o estándar, el cual esta compuesto por una solución de 10⁻⁴ M de Ácido Giberélico o Ácido-3-indol acético según sea el caso, una vez colocados el estándar y el extracto de composta, la placa se seca a temperatura ambiente, una vez seca la placa se procede a realizar la cromatografía. La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente empleando como fase móvil (eluyente) una mezcla de acetato de etilo: cloroformo: ácido acético en una relación de 90:30:6, el cromatograma obtenido se seca a temperatura ambiente y en el interior de la campana de extracción por 4 horas, una vez seco el cromatograma se

revela bajo luz ultravioleta (UV) de esta forma podemos identificar de forma rápida las bandas correspondientes al estándar y el extracto, pudiendo así determinar el R_F correspondiente a cada uno de estos y macar las zonas específicas en donde el valor de R_F del estándar y el extracto de composta sea similar. El R_F se obtiene de acuerdo a la siguiente formula:

$$R_F = \text{distancia del frente del disolvente} / \text{distancia del frente de la mancha.}$$

Una vez marcadas las zonas se realiza un raspado con ayuda de una espátula y la mezcla sílica-extracto purificado se coloca en un matraz erlenmeyer de 25 mL, adicionando de 5 a 10 mL de una solución de cloroformo:metanol (9:1) hasta cubrir toda la mezcla, una vez cubierta se entremezcla perfectamente todo y se mantiene en reposo por 15 minutos, transcurrido este tiempo se filtra la mezcla pasándola por un embudo de vidrio con papel Whatman # 1, obteniéndose un extracto purificado el cual se concentra en un rotavapor, sin presión y a una temperatura de 50-60°C, el extracto metanólico obtenido se envasa en frasco ambar, se etiqueta y almacena a 5°C previo a su identificación parcial mediante HPTLC.

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC)

Las diferentes técnicas cromatográficas se basan en distribuciones diferenciadas de los componentes de la muestra a analizar entre dos fases, una móvil y otra estacionaria. Es a través de este mecanismo, que la separación de componentes de una muestra compleja se alcanza, esto se logra optimizando los factores que controlan la resolución o separación, de esta manera, los componentes individuales

se pueden eluir y monitorear por separado, pues se obtienen libres de interferencia posible por otros componentes y/o contaminantes. Este mecanismo, que separa componentes de la muestra en "picos individuales" o "puntos", es básicamente la responsable de la especificidad de los sistemas cromatográficos.

La detección en la mayoría de los sistemas cromatográficos es no específica y no puede distinguir entre diversos compuestos, excepto cuando se utiliza la espectroscopia de masas para la detección. Las diferencias entre los distintos tipos de cromatografía se deben a la naturaleza de las fases estacionaria y móvil. Como resultado de tales diferencias, surgen los diversos tipos de cromatografía de acuerdo a sus aplicaciones y utilidad potencial.

TLC / HPTLC

La cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) se ha desarrollado reciente y se puede pensar, en términos generales como nueva y mejorada versión de la cromatografía de capa fina convencional (TLC). Algunas de las ventajas que ofrece la HPTLC sobre el TLC son:

1. Las separaciones de compuestos y de sus análisis son más rápidas y más distintivas.
2. Las cromatoplasmas de HPTLC son más fáciles de manejar.
3. La HPTLC es más conveniente para el análisis adicional, incluyendo la cuantificación, porque las placas se pueden cortar en tiras o formas especiales y preparar para análisis subsecuentes. Las placas de cristal convencionales de la TLC, no se pueden utilizar de este modo.

Las técnicas de TLC y HPTLC se utilizan a menudo, pues resultan ser las técnicas más convenientes para la detección rápida de compuestos en material biológico y no-biológico, debido a los siguientes criterios: Mínima instrumentación, bajo costo, simplicidad, requerimientos mínimos de espacio y mantenimiento, rapidez en el análisis, alta especificidad y resolución del análisis que es superior a las técnicas no cromatográficas

Otro aspecto importante a tomar en cuenta es la facilidad de interpretación de resultados obtenidos, pues la TLC y HPTLC se aplican al análisis químico de diversas muestras. Se utilizan principalmente como técnica básica o primaria de la investigación para detectar compuestos específicos. Esta información se puede utilizar como una guía para el trabajo analítico adicional que confirmará los resultados iniciales.

Con muestras no biológicas, la TLC/HPTLC se puede realizar directamente, por ejemplo, con soluciones disueltas o suspendidas en solventes como el metanol, sin los pasos largos de la extracción requeridos para las muestras biológicas como drogas o alcaloides. Existen numerosos métodos de uso de la TLC/HPTLC que se han reportado, incluyendo aquellos donde la separación de compuestos es poco factible, debido a su similitud química.

Como procedimientos cuantitativos la TLC/HPTLC son inferiores a la GC o HPLC en términos de la rapidez, comodidad de uso, conveniencia, precisión y sensibilidad.

Sin embargo, las técnicas de TLC/HPTLC desempeñan un papel inestimable cuando están utilizadas como pasos precedentes a un análisis más detallado, y se pueden realizar de forma más simple, barato y rápidamente. La selectividad del sistema de TLC/HPTLC facilitará el uso racional de otras técnicas analíticas.

Ya que se requiere analizar un número relativo de muestras de extracto purificado, sin que ello demande un tiempo considerable y un alto costo, es que en el presente trabajo se valida y propone un método analítico por HPTLC para cuantificar los compuestos indólicos (AIA y GA₃). Esta técnica posee importantes ventajas sobre otros métodos cromatográficos, pues no requiere de purificaciones exhaustivas, utiliza cantidades mínimas de solventes, es una metodología rápida y, además, por ser un sistema abierto, permite analizar distintas muestras en forma simultánea, lo que se traduce en economía en tiempo, material y reactivos.

Para la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), se emplearon cromatoplasmas de vidrio de 5 x 5 cm., impregnadas con Sílica Gel 60F₂₅₄, marca Merck; el extracto de composta purificado mediante TLC a analizar se aplicó en forma de mancha empleando una micropipeta (tubo capilar modificado), el sitio de la mancha se localizó a una distancia de 1 cm de la parte que se eligió como base de la placa y en el centro de la misma; a la misma altura del extracto de composta purificado en ambos costados y con 2 cm de separación, se colocan dos nuevas bandas, correspondiente al patrón de referencia o estándar, el cual está compuesto por una solución de 10⁻⁴ M de ácido-3-indol acético o ácido giberélico, una vez colocados la muestra y el estándar, la placa se seca a temperatura ambiente. La

cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente empleando como fase móvil (eluyente) 5 mL de una mezcla de cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico en una relación de 5:4:1 para el análisis del ácido-3-indol acético ó acetato de etilo: cloroformo: ácido acético en una relación de 90:30:6 para el análisis del ácido giberélico, el cromatograma obtenido se seca a temperatura ambiente y en el interior de la campana de extracción por 2 horas, una vez seco el cromatograma se revela bajo luz ultravioleta (UV, 254 nm.) de esta forma podemos identificar de forma rápida las bandas correspondientes al estándar y el extracto de composta purificado, pudiendo así determinar el R_F correspondiente a cada uno de estos y macar las zonas específicas en donde el valor de R_F de extracto sea similar con el del estándar empleado.

IDENTIFICACIÓN DE AUXINAS Y GIBERELINAS

Al extracto de composta purificado mediante la TLC, se le hace pasar una corriente de nitrógeno gaseoso, para así evaporar todo el solvente que contiene y quedarnos con el extracto sin solvente.

Los extractos sin solvente se pesan para obtener los rendimientos, se etiquetan y almacenan para su posterior identificación. La caracterización o identificación de los extractos purificados de composta se realizó mediante el análisis con un espectrómetro de masas, para las Auxinas se empleo un Finnigan MAT TSQ 700 equipado con una interfase de electrospray (ESI) para realizar la ionización; previo al análisis la muestra y estándar se disolvió en una solución de ácido acético al 1% con metanol/agua, para su comparación se empleo como referencia AIA ($m/z =$

175.6), el espectro se realizó en un rango de 50 a 300 m/z; para las giberelinas se utilizó un espectrómetro Finnigan MAT 900 equipado con una sonda de inserción directa (DIP), el espectro se obtuvo mediante un método de ionización de impacto de electrón (EI), el rango del espectro fue de 50 a 500 m/z, como referencia se utilizó GA₃. Los espectros se realizaron por Bertil Hofte de la Universidad de Holanda.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA (BIOENSAYOS)

Los bioensayos juegan un papel importante en la identificación de los RCV, debido a que la determinación de actividad biológica de las muestras analizadas es el último paso para confirmar que los extractos obtenidos además de poseer una estructura química similar al RCV a analizar, también pueden realizar sus funciones fisiológicas en las plantas. Existen dos limitantes para la elección y empleo de los bioensayos adecuados, estas son la selectividad y sensibilidad, por ello hay que tener en cuenta estos criterios para así asegurar la obtención de resultados confiables y fehacientes en el análisis de los Reguladores del Crecimiento Vegetal. De esta manera como mencionamos anteriormente la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal se determina cualitativamente mediante las técnicas anteriormente descritas, pero una herramienta auxiliar en su cuantificación es el empleo de los bioensayos, los cuales ayudan a dar una respuesta rápida sobre su actividad biológica. Los bioensayos que se emplearon para este fin se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Bioensayos realizados para determinar la actividad biológica de los extractos de composta purificados

AUXINAS (AIA)	GIBERELINAS (GA ₃)
<p>Bioensayo del coleóptilo de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)</p> <p>Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíz de <i>Lepidium sativum</i> L. y <i>Triticum aestivum</i> L.</p>	<p>Bioensayo de la prueba del crecimiento del tallo del chícharo (<i>Pisum sativum</i>)</p>

Estos bioensayos fueron seleccionados, debido a la respuesta rápida que presentan y su selectividad (Audus, 1972), ellos se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz, para obtener un resultado lo mas exacto posible y que no sea el resultado de factores ajenos a la actividad del extracto purificado obtenido o los estándares empleados en la comparación; sin embargo, de esta forma se llego al empleo de los bioensayos que cumpla con nuestros requerimientos (Weaver, 1972; Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; y Bensen *et al.*, 1990). A continuación se describen los bioensayos realizados.

AUXINAS

El nombre Auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación; el ácido-3-indol acético (AIA) es la forma predominante, sin embargo, existen otras formas auxínicas (indólicas) naturales en las plantas. A las auxinas se les implica en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos, tales como: promover el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta, estimula el crecimiento y maduración de frutas, floración, senectud entre otras funciones. Todas estas funciones se deben principalmente a las investigaciones iniciadas por Darwin y

Darwin y continuadas por Ralther (1894) Boysen-Jensen (1910), Paál (1919) Söding en 1923 y 1925, Went (1928) y McDougall y Hillmann en 1978. En general los bioensayos empleados ilustran el efecto mencionado mediante la aplicación exógena de soluciones de auxina a coleóptilos y semillas de trigo y semillas de *Lepidium sativum*. Entre los más aplicados por los fisiólogos vegetales están aquellos que utilizan coleóptilos, segmentos de tallo o raíces como material vegetal de prueba. En ellos, se mide el incremento o inhibición en la elongación, efecto resultante después de sumergir los cilindros de coleóptilo, segmentos de tallo o raíces en soluciones de auxinas o muestras en estudio.

Bioensayo del coleoptilo de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Se seleccionan 200 semillas de trigo, posteriormente se lavan y desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v, ya lavadas y desinfectadas las semillas se colocan en un recipiente con agua destilada durante seis horas aproximadamente; enseguida, se ponen a germinar en charolas de disección de 30 x 50cm, en las que previamente se colocó un soporte de papel filtro y se humedecido con agua destilada hasta saturación. Una vez preparadas las charolas se colocan aproximadamente 50 semillas por charola, todas con la misma orientación y con el embrión hacia arriba. Se dejan germinar en el cuarto oscuro dentro de una cámara con humedad constante, regando o humedeciendo cada 24 horas con agua destilada. Una vez que las semillas germinaron y los coleoptilos han alcanzado una longitud aproximada de dos cm (84 horas aproximadamente) se retira la semilla, utilizando unas pinzas de disección y con ayuda de un bisturí se desprende la raíz; a continuación se colocan los coleoptilos en una caja petri con agua destilada.

Enseguida, se cortan por el ápice y la base con una cortadora de segmentos Wightman, esta es una guillotina que nos ayudará para que los cortes de coleóptilos estén a una longitud constante de 1 cm. Inmediatamente después de cortarse se colocan nuevamente en agua destilada. El siguiente paso es retirar la hoja primaria de cada segmento y se ensartan 2 segmentos por capilar, dejando que nuevamente floten en agua destilada hasta que sean transferidos a las soluciones de prueba (extracto purificado, estándar de AIA y agua destilada como testigo).

Las soluciones de prueba o tratamientos se preparan de la siguiente manera: se prepara el stock de una solución de ácido-3-indol acético a una concentración de 10^{-4} Molar con agua destilada, a partir de esta solución se realiza un pool de concentraciones de 10^{-4} a 10^{-10} Molar, una vez listas las concentraciones del AIA o estándar, el extracto purificado se resuspende en 2 mL de etanol y se afora a 10 mL con agua destilada.

Preparadas las soluciones, los tratamientos se desarrollan de la siguiente forma: a nueve cajas petri se les coloca 10 mL de cada una de las soluciones preparadas obteniéndose así siete tratamientos para el AIA, un testigo con agua destilada y un último tratamiento con el extracto purificado de la composta, para cada tratamiento se realizan triplicados. Las cajas petri ya listas y con los coleoptilos se tapan para evitar evaporación y posteriormente se colocan en un cuarto oscuro con temperatura y humedad constante, cada 24 horas se mide la elongación de los coleoptilos, con los datos obtenidos se realiza un análisis estadístico.

Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíz de *Lepidium sativum* L. y *Triticum aestivum* L

Se seleccionaron 200 semillas de trigo o *Lepidium*, posteriormente se lavan y desinfectan con una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 5% v/v con agua destilada; una vez limpias y desinfectadas, las semillas se sumergen en agua por 4 horas aproximadamente, transcurrido este tiempo se ponen a germinar, colocando las semillas en charolas, en las que previamente se ha colocado un soporte de papel filtro humedecido con agua destilada hasta saturación, todas las semillas se colocan con la misma orientación y en el caso de las de trigo se colocan con el embrión hacia arriba. La germinación se realiza en un cuarto oscuro dentro de una cámara con humedad constante, regando cada 24 horas con agua destilada. Una vez que las raíces han alcanzado una longitud aproximada de 0.5 cm., se realiza una selección homogénea de semillas con raíces, realizada la selección estas se transfieren a cajas petri de 20 cm. de diámetro, con los tratamientos; los tratamientos se realizan de la siguiente forma:

Se preparan las soluciones para los tratamientos de la siguiente manera: un stock de una solución de ácido-3-indol acético a una concentración de 10^{-4} Molar con agua destilada, a partir de esta solución se realiza un gradiente de concentraciones de 10^{-4} a 10^{-10} Molar, una vez listas las concentraciones del AIA o estándar, el extracto purificado se resuspende en 2 mL de etanol y se afora a 10 mL con agua destilada. Preparadas las soluciones, los tratamientos se desarrollan de la siguiente forma: a nueve cajas petri de 20 cm. de diámetro se les coloca un disco de papel filtro Whatman de poro grueso, posteriormente se adicionan 10 mL de cada una de las

soluciones preparadas obteniéndose así siete tratamientos para el AIA, un testigo con agua destilada y un último tratamiento con el extracto purificado de composta, cada tratamiento se realiza por triplicado. Las cajas petri con los tratamientos se tapan para reducir la evaporación, ya preparadas, se incuban en la cámara de ambiente controlado a 23.5 °C. Después se determina la longitud de la radícula de las plántulas utilizando una escala milimétrica, y se calcula el promedio a partir de los valores obtenidos y realiza un análisis estadístico (Weaver, 1972; Hiroshi *et al.*, 1977; Russell, 1977; McDougall y Hillman, 1978; Mousdale *et al.*, 1978; Saunders, 1978; Brenner, 1981; Mitchell y Livingston, 1982, Hubick y Reid, 1984; Bialek y Cohen, 1989; Bensen *et al.*, 1990; Tien *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; y Taylor *et al.*, 1994).

GIBERELINAS

El ácido giberélico (GA₃) fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta, las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo, este RCV no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el tallo; su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis). Para las giberelinas, se ha implementado una amplia variedad de bioensayos, dado que se ha empleado prácticamente cualquier respuesta fisiológica a su aplicación exógena para detectarlas y cuantificarlas. Sin embargo, solo 3 tipos de bioensayos se han usado ampliamente por su facilidad de ejecución, exactitud, sensibilidad y especificidad. En ellos se utilizan básicamente hipocótilos, endospermos de cereales y plántulas

de cultivares mutantes enanos. Estas especies vegetales responden a la aplicación de giberelinas acusando prolongación en sus brotes, respuesta fácilmente visible y cuantificable.

Bioensayo de la prueba del crecimiento del tallo de chícharo (*Pisum sativum*)

Se seleccionan 200 semillas de chícharo y se lavan y desinfectan con una solución de hipoclorito comercial (cloralex) al 5 %^{v/v} con agua destilada, ya lavadas y enjuagadas las semillas se colocan en un vaso de precipitado con 500 mL. de agua destilada por un lapso de 6 a 8 h, antes de que haya transcurrido este tiempo se preparan dos charolas de disección en donde previamente se colocó una placa de papel filtro de poro grueso, posteriormente se le agregó agua destilada hasta saturar el papel filtro, ya listas las charolas se colocaron 100 semillas en cada una de las charolas, descartando las semillas que hayan flotado en el paso anterior, la charolas se sellan con una película de plástico envolpack para evitar la evaporación del agua, posteriormente se colocan en oscuridad y regando en caso de ser necesario cada 24 horas las charolas, ahí permanecen hasta 48 horas.

En el invernadero se preparan 30 macetas de plástico que contiene suelo fertilizado y regado a capacidad de campo, posteriormente se trasladan las semillas ya germinadas al invernadero y se siembran 5 semillas por maceta a una profundidad de 3 cm. de profundidad cubriéndolas con la misma tierra de las macetas; las macetas listas se mantienen en el invernadero regándolas cada vez que sea necesario. A la par del crecimiento de las plántulas de chícharo se preparan las soluciones para los tratamientos, se prepara un stock de una solución de ácido

giberélico a una concentración de 10^{-4} Molar con agua destilada, a partir de esta solución se realiza un gradiente de concentraciones de 10^{-4} a 10^{-10} Molar, el extracto purificado se resuspende en 2 mL. de etanol y se afora a 10 mL con agua destilada, el último tratamiento es agua destilada y sirve como testigo, a las 9 soluciones se les agrega Tween 20 (6 gotas por litro), todas las soluciones se agitan y envasan en frascos ambar y se mantiene en refrigeración para su posterior empleo.

Aproximadamente al décimo día cuando el cuarto entrenudo se alarga, las plantas están listas para el bioensayo. Se mide y registra la altura de cada planta, tomando la lectura desde el ras del suelo hasta el ápice del tallo. Se marcan las plantas y macetas para diferenciarlas. Los tratamientos se aplican de la siguiente manera: Con ayuda de una jeringa hipodérmica se aplican 2 mL. de la solución con agua destilada que contiene Tween 20 (testigo) en el ápice de las plantas de la maceta testigo, posteriormente se aplican los tratamientos correspondientes al gradiente de concentración del estándar (ácido giberélico), siete macetas y finalmente una última maceta en donde se aplica el extracto de composta purificado, este procedimiento se realiza tres días consecutivos, a partir de la última aplicación de los tratamientos se miden las plantas por última vez, transcurridos siete días después de la última aplicación, se mide la altura de cada planta y se determina el incremento medio en altura, realizando comparaciones de resultados, con los resultados obtenidos se realiza un análisis estadístico (Durley *et al.*, 1989; Bensen, 1990; Poling, 1991; Larqué y Rodríguez, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; Koshioka *et al.*, 1994).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Como se mencionó para esta última parte del trabajo, se puso énfasis únicamente en dos grupos de RCV a analizar en las muestras de composta, las auxinas representadas por el AIA y las giberelinas por el GA₃, describiéndose las técnicas empleadas.

EXTRACCION Y PURIFICACION

Para la extracción de AIA y GA₃, el volumen de la muestra de composta empleada (200 gramos) fue satisfactorio para la extracción de los RCV, pues el volumen de extracto obtenido fue suficiente para la realización del resto del análisis, en promedio se obtuvieron 1 ± 0.05 gramos de extracto seco en ambas técnicas AIA y GA₃. Este extracto de auxinas se resuspendió en 5 mL de metanol, mientras que el extracto de giberelinas se empleo así en solución acuosa, envasándose para su posterior análisis, cabe mencionar que al menos se realizaron tres extracciones de cada RCV, pues son tres los análisis a realizar posterior a la extracción: HPTLC, Bioensayo y NMR.

Para la cromatografía en capa fina (TLC), no se encontró menor inconveniente, pues se corrieron primeramente cromatoplasmas de aluminio de 1 cm de base por 6 cm de largo, con la fase móvil y condiciones apropiados, obteniéndose que el R_F de los extractos obtenidos era similar al de los estándares empleados como referencia; una vez establecido que el extracto contenía algún compuesto de peso molecular similar al del estándar se procedió a realizar una nueva cromatografía ahora empleando placas de vidrio de 20 cm por 20 cm impregnadas con Sílica Gel Merck 60F₂₅₄, una vez terminada la cromatografía se trazaron líneas paralelas a la base de la cromatoplasma las cuales abarcaban el R_F del estándar con una diferencia de ± 2.5 cm, de tal forma que se tomó una banda de aproximadamente 5 cm de ancho para raspar. Una vez que se rasparon las zonas trazadas para tal fin, la mezcla sílica-extracto purificado se colocó en matraces erlenmeyer de 25 mL, a los cuales se les adicionó 5 mL de una mezcla cloroformo:metanol (9:1), se agitó y se dejó

reposar 15 minutos, posteriormente se filtro la mezcla y se obtuvo un extracto purificado, este extracto se evaporó a temperatura ambiente en un rotavapor, hasta sequedad obteniéndose así el extracto purificado de auxinas y giberelinas respectivamente, estos extractos purificados se envasaron en viales de vidrio color ámbar de 5 mL, se etiquetaron y el exceso de metanol presente se evaporo empleando una corriente de nitrógeno gaseoso, los pesos de los extractos se muestran en la tabla 19, cabe mencionar que estos pesos de auxinas y giberelinas corresponden a 200 gramos de muestra, ya listos los extractos purificados se guardaron en refrigeración para su posterior empleo.

Tabla 19. Pesos promedio de los extractos purificados de ambas compostas gramos de RCV por 200 gramos de composta

AUXINAS		GIBERELINAS	
<i>Hum Ecol</i>	0.19062 ± 0.0001	<i>Hum Ecol</i>	0.07878 ± 0.00025
<i>TIP MOR</i>	0.01312 ± 0.0001	<i>TIP MOR</i>	0.07288 ± 0.00006

HPTLC

La HPTLC resultó ser una herramienta de apoyo indiscutiblemente excelente pues de una manera rápida y precisa, podemos determinar de forma cualitativa la presencia del los RCV a analizar de tal forma que bajo las condiciones anteriormente descritas los resultados de R_F obtenidos para cada caso son:

Tabla 20. Promedio de R_F obtenidos para la identificación de AIA y GA_3 empleando HPTLC

AUXINAS		GIBERELINAS	
AIA (std) ¹	0.663 ± 0.00005	GA_3 (std) ²	0.550 ± 0.00005
<i>Hum Ecol</i>	0.638 ± 0.00001	<i>Hum Ecol</i>	0.538 ± 0.00001
<i>TIP MOR</i>	0.625 ± 0.00001	<i>TIP MOR</i>	0.575 ± 0.00001

¹ Se empleo como estándar de referencia ácido-3-indol acético

² Se empleo como estándar de referencia ácido giberélico

El único inconveniente que se presentó durante el análisis, fue durante la cromatografía de la muestra correspondiente a la composta *TIP MOR* para el análisis de giberelinas, pues mostró no solo una mancha sino una banda que corría perpendicularmente a la base de la cromatografía, de tal forma que se realizo nuevamente la extracción con una nueva muestra, poniendo énfasis en la purificación, pues al parecer presentaba una serie de impurezas que podían interferir en nuestros resultados, posterior a la nueva extracción y purificación se volvió a presentar este fenómeno pero ahora ya apareció una mancha con un R_F similar al estándar (figura 24) dando por valido este resultado, para el análisis de identificación de GA_3 .

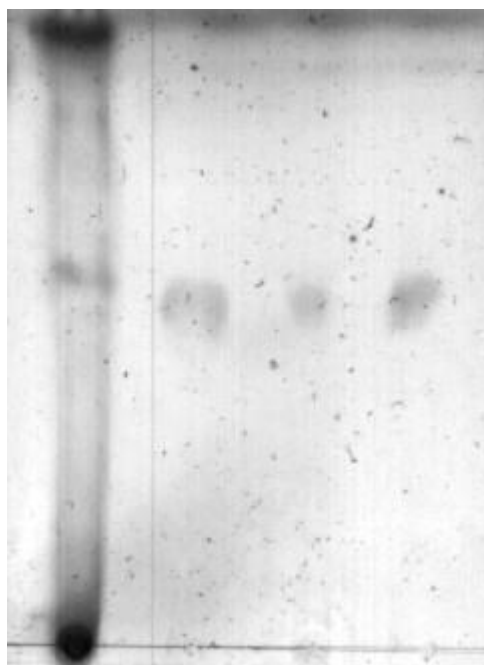


Figura 24. Cromatoplaque de HPTLC para la identificación de giberelinas (de izquierda a derecha: *TIP MOR*, *AIA*, *Hum Ecol*)

De acuerdo a los resultados de la HPTLC podemos decir que en ambas compostas existe suficiente evidencia de la presencia de compuestos con peso molecular similar al de los estándares (ácido-3-indol acético y giberélico) en ambas muestras de composta *TIP MOR* y *Hum Ecol*.

BIOENSAYOS

Auxinas

Bioensayo del coleoptilo de trigo (*T. aestivum* L.)

Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíz de *L. sativum* L.

Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíz de *T. aestivum* L.

Giberelinas

Bioensayo de la prueba del crecimiento del tallo de chícharo (*P. sativum*)

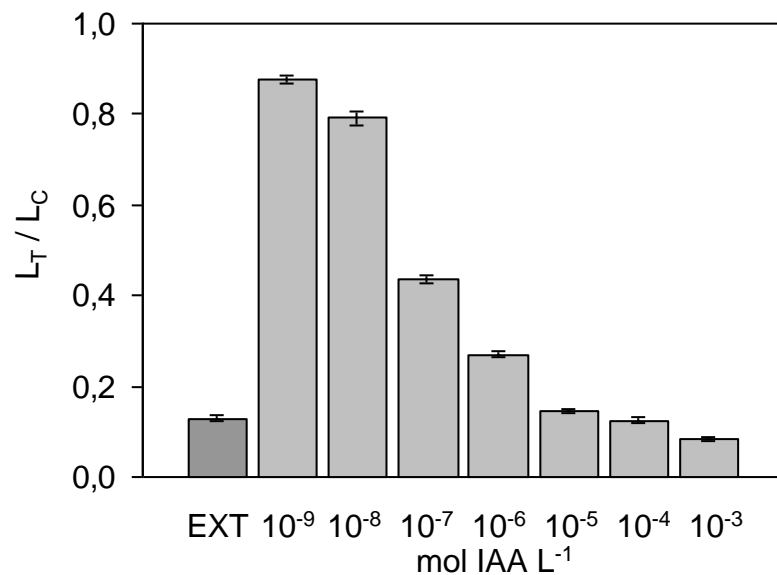


Figure 25. Response of compost extract (EXT) and range of dilutions of indol-3-acetic acid (10^{-3} to 10^{-9} mol IAA L^{-1}) on root length treatment over root length control (L_T/L_C) of *Lepidium sativum* L. after of 72 hours.

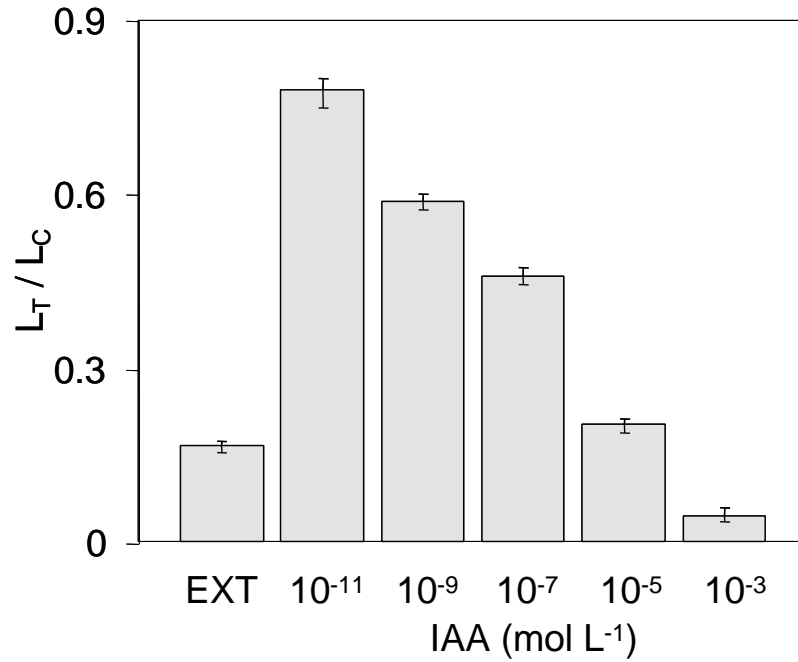


Figure 26. Response of purified extract from the compost and different concentrations of IAA in bioassay with *Lepidium sativum* root growth, on root length treatment over root length control (L_T/L_C), after of 72 hours of treatment.

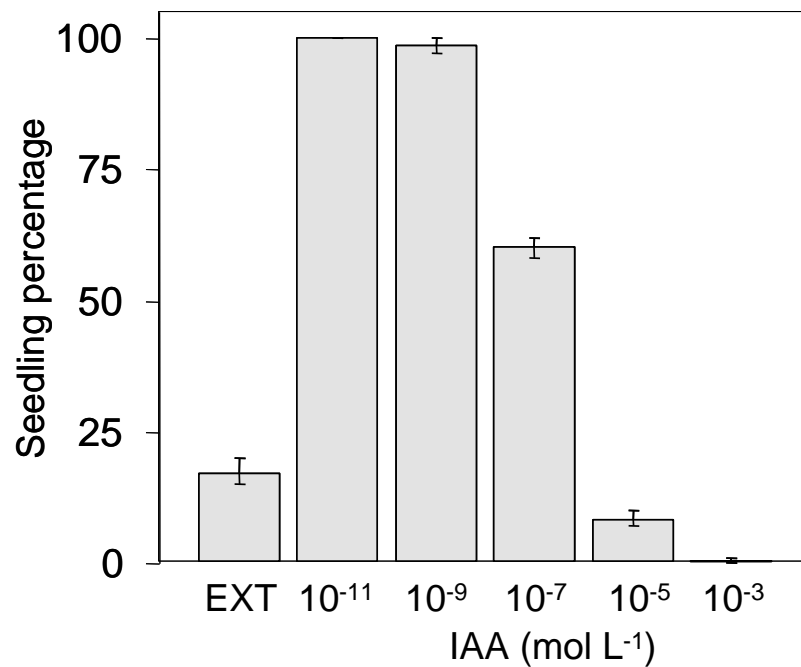


Figure 27. Response of purified extract from the compost and different concentrations of IAA in a bioassay with *Lepidium sativum* seedling test, after of 48 hours of treatment.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos permiten concluir que tanto la composta como la vermicomposta resultan una muestra no convencional para el análisis de RCV, pero con el establecimiento de las técnicas empleadas es posible realizar una evaluación certera de la presencia de tales sustancias en la muestra, obteniéndose resultados similares. La TLC, indico la presencia de compuestos con pesos moleculares parecidos a auxinas y giberelinas, esto es debido a que el R_F obtenido, comparándolo con el estándar es similar y por ende, se puede concluir que se extrajeron y purificaron tales compuestos. Por otra parte, para el caso de las citocininas, no existe evidencia de la presencia de compuestos con peso molecular parecido a estos.

Por otra parte, la obtención de los extractos fue la adecuada para la muestra analizada; pudiéndose concluir que existen compuestos con estructura similar a la del ácido-3-indol acético y giberélico.

Aún queda abierta la posibilidad de corroborar la actividad biológica de los extractos, ya que existe la posibilidad de que aun lo extractos donde la TLC dio negativa, si posean actividad biológica, o no la posean aquellos que dieron positiva la prueba de TLC.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez M.A.D.; S. Gagne and L. Antoun. (1995). Applied and enviromental Microbiology 61(1): 194-199.

Arozarena D.N.J.; I. García Martínez; R.G. Campos; C.A. Rodríguez; y A. Carmona (1995). Análisis Comparativo de compostas I. En: productos naturales Vol. 2. Cruz, S.F.; J.A. Lechuga y J.C. Peña Editores; UAM-Iztapalapa, México.

Azaola Espinosa, A. (1997). Comunicación personal. UAM. México DF.

Bandurski, R.S. and H.M. Nonhebel (1989). Auxins. In: Advanced plant Physiology; Malcom B. Wilkins Ed.; Longman scientific &technical; USA.

Bandurski, R.S.; J.P. Slovin y J.D. Cohen (1993). Auxinas. En fisiología y Bioquímica vegetal; J. Azcon-Bieto y M. Talon Editores, Mc Graw-Hill-Interamericana, España.

Bensen, R.J.; Beall, F.D; J.E. Mollet and P.W. Morgan,(1990). Plant Physiology. 94:77-84.

Beyer, M.E.; P.W. Morgan and S.F. Yang (1989). Ethylen. In: Advanced Plant Physiology; Malcom B. Wilkins Ed. Longman Scientific & Technical; USA.

Bialeck K. y J.D Cohen (1989). Plant Physiol. 90: 398-400.

Biddlestone, A.J. and K:R. Gray, (1991). Procces Biochemistry 26:275-279.

- Bidwell, R.G. (1979). Fisiología Vegetal AGT Editor, S.A. México DF.
- Boerjan W.;C. Genetello; M.V. Montagu y D. Inze (1992). Plant Physiol. 99:1090-1098.
- Brenner, M.L., (1981). Annu. Rev. Plant Physiol. 32 :511-538.
- Burch , L.S. y B.A. McGraw (1993). Citoquinasas. En: fisiología y Bioquímica Vegetal ; J. Azcon-Bieto y M. Talon Editores; Mc Graw-Hill-Interamericana, España.
- Crawford, J.H., (1983). Process Biochemistry. January/February: 14-18.
- Cruz Sosa, F. (1996) Comunicación Personal. UAM. México DF.
- Chanyasak, V. y H.K. Kubota (1981). J. Ferment. Technol. 59:215-219.
- Chapman, H.D. and P.F. Pratt, (1981). Methods of Analysis for soils, Plants and waters. Riverside, University of California.
- Chongrak Polsprasert, (1989). Organic Waste Recycling. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. John Wiley & Sons. Great Britain.
- Dean C. Alexander, (1993). Calidad ambiental 1(1):3-5.
- Flanagan, M.S.; R.E.Schmidit and R.B. Reneau, (1993). HortScience 28(9): 914-916.
- García-Martines, I.; Arozarena, López y Carmona, A.A. (1995). Producción Y Evaluación Agronómica de compostas. En VII Jornadas de biotecnología. Cruz, S.F.; J.A. Lechuga y J.C. Peña Editores; UAM-Iztapalapa, México.

Gaskin, P.J. MacMillan (1978). G.C. and GC-MS Techniques for gibberellins. In: Isolation of plant Growth substances. Hillman J.R. de Cambridge University Press.

Giusquiani, P.L.; M. Pagliani; G. Gigliotti ; D. Businelli and A. Benetti, (1995). Journal of environmental Quality 24(1):175-182.

Gray, K.R.; A.J. Biddlestone and R. Clarck,(1973). Process Biochemistry October: 11-15.

Gutiérrez, M. (1996). Comunicación Personal. Colegio de postgraduados. Montecillos, México.

Hedden, P., (1993). Annu Rev. Plan Physiology 44:107-129.

Hernandez- Miñana, F.M., (1991). Journal of horticultural Science. 66(4):505-511.

Hiroshi, F.;K.N. Koichi and Ryochi; Yosimitzu and U. Sadakazu,(1977). Agric. Biol. Chem. 41(1): 175-180 189—194 187-187.

Horgan R. (1978). Analytical Procedures for cytokinins. In: Isolation of plant growth Substances . Hillman J.R. de Cambridge University Press.

Horgan R. (1987) Instrumental Method Of plant hormone Analysis In: Plant Hormones and their role in plant growth and development. USA.

Horgan, R. (1989). Cytoknins. In: Advanced Plan Physiology; Malcom B. Wilkin. Ed. Longman Scientific & Technical, Inc. USA.

Hubick, K.T. and D.M. Reid , (1984). Isolation and analysis Of plant growth

regulators, pp. 658-683; In: cell Culture and somatic cell genetic of plants; Vol 1; Vasil, I.K. Ed.; Academic Press, Inc. USA.

Hue, N.V.; H Ikawa and J.A. Silva , (1994). Soil science and Plant analysis 25:19-20.

Iglesia- Jiménez E. And C.E. Álvarez, (1993). Biology and Fertility of soils 16(4) 313-318.

Iglesia-Jiménez E. y V. Pérez-García, (1992). Agricultura, Ecosystems and Enviroment 38:331-343.

King R.W. (1979) aust. J. Plan Physiology. 6:99-108.

Korhamer, S.A. and E. Haslinger (1994). J. Agric. Food Chem. 42,2048-2050.

Koshioka, T.;H. Nishijima; H. Yamasaki; Y. Liu; M. Monaka and L.N. Mander , (1994) Journal of Horticultural Science 69(1):171-179.

Kuhlman, L.R., (1990). Conservation and Recycling 4:151-160.

Kuhlman, L.R.,(1992). Value of composting cattle feedlot manure. In: Australian Lot Feedersb Association Conference (BEEFEX 92). Coff Harbour, New South Wales, Australia.

Laboratorio de tratamientos de residuos sólidos (1994). Manual de técnicas analíticas. UAM-I, México.

Larqué Saavedra A. y M.T. Rodríguez, (1993). Fisiología vegetal experimental, Ed. Trillas, México.

Larqué Saavedra A. (1995). Apuntes del curso reguladores del crecimiento vegetal,

Adscrito al programa de botánica, Colegio de postgraduados. Montecillos, México.

Levi-Minzi, R.; R. Riffaldi and A. Saviozzi, (1990). Agriculture, Ecosystems and environment 31:325-335.

Little T. y F. Jackson Hills, (1981). Métodos estadísticos aplicados ala agricultura editorial trilla México.

López-Sánchez, J.M. (1996). Efecto sobre la calidad nutricional de un sustrato (suelo) pobre al incorporarle composta; Reporte de servicio social, Ing. Bioquímico; UAM; México.

Mass, M.J. y García-Oliva F., (1990). Ciencia y desarrollo 15(90):20-36.

McDougall, J. y J.R. Hillman (1978). Analysis of indole-3-acetic acid using GC-MS Techniques . In: Isolation of plant growth Substances. Hillman J.R. de Cambridge University Press.

McKenzie, H.A.(1979). pH and Buffers In: Date for biochemical research. DawsonR.M.L.; D.C. Elliont y K.M. Jones. Clarendon Press Oxford.

Melillo, J.M.; J.D. Arber and J.F Muratore, (1982). Ecology63:321-326.

Milborrow, B.V. (1989). Inhibitors. In: Advanced Plan physiology; Malcom B. Wilkins Ed.; Longman scientific & technical; USA.

Mitchell, J.W. and G. A. Livingstone, (1973). Methods of estuding plant hormones and growth regulators substance. Ed. Trillas México.

Montgomery, Douglas C., (1991).Desing and analysis of experiments John Wiley & sons., Inc USA.

Mousdale, D.M.A.; D.N. Butcher y R.G. Powell (1978). Spectrophotofluorimetric methods of determining indole-3-acetic acid. In: isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de Cambridge University Press.

Poling, Stephen M., (1991). J. agric. Food Chem. 39,677-680.

Quatrano, R.S., (1974). Polyacrilamide Gel Electrophoresis of plant proteins; In: Research experiences in plant physiology a laboratory manual; Springer-Verlag Inc. USA.

Reeve D.R. y A. Crozier (1978). The analysis of gibberellins by high performance liquid Chromatography. In: isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de Cambridge University Press.

Rizo Almenara, M.P., (1996). Establecimiento de técnicas de evaluación de RCV en un análisis no convencional; Reporte de servicio social , Ing. De los alimentos UAM; México.

Rodríguez , F., (1994). Materia orgánica. Efecto en el suelo e influencia directa en la planta. UACH, Departamento de suelos ; México.

Romani, J., (1991) Ecológicas 2(14):20-24.

Romo de Vivar A., (1985). Productos naturales de la flora Mexicana. Ed. LIMUSA, México.

Russell, L.J. and J. McMillan (1989). Gibberellins . In: Advanced plant Physiology Malcom B. Wilkins Ed.; Longman Scientific & technical; USA.

Russell, S., (1977). Extraction, Purification and chemistry of gibberellins and plant growth ; Ed. Krishnamoorthy, H.N. Editorial John Wiley & Sons . USA.

Salisbury, F.B. y Ross, C.W., (1992). Fisiología vegetal . Editorial Iberoamericana. México.

Saunders, P.F. (1978). The Identification and Quantitative Analysis of abscisic acid in plant extracts. In isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de Cambridge University Press.

Sawhney, V.K. and A. Shukla, (1994), American Journal of Botany 81(12):1640-1647.

Secretaria de desarrollo social/ Instituto nacional de ecología , (1991-1992). Informe de la situación general en materia ambiental en equilibrio ecológico y protección al ambiente.

Smith, S.R., (1992). Journal of horticultural science 67(5): 703-706.

Staff of Biocycle. (1991). The biocycle Guide to the art & science of composting. Journal of Waste Recycling. The J.G. Press Inc Emmaus, Pennsylvania.

Talon Manuel (1993). Giberelinas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal; J. Azcon Bieto y M. Talon Editores; Mc Graw-Hill- Interamericana, España.

Taylor J.S.; Robertson; K.N. Harper; M.K. Bhalla; E. J. Daly; and D.W. Pearce. (1994). Can. J. Bot. 73:307-314.

Tchbanoglous, G.; H Theisen and S. Vigil, (1993). Integrated solid waste management. McGraw-Hill International Editions, Singapore.

Tien, T.M., M.H. Gaskinns, and D.H Hubell, (1979). Applied and Environmental Microbiology 37(5): 1016-1024.

Trejo Vázquez, R., (1994). Procesamiento de la basura urbana. Editorial Trillas,

México.

Trewavas, A.J., (1979). What's New. In: *Plant Physiology* 10:33-36.

Varner, J.E. and D. Tuan-hua-ho (1976). Hormones; In: *Plant biochemistry*; J. Bonner & J.E. Varner De.; Academic Press; USA:

Weaver Robert J., (1972). *Plant Growth substances in Agriculture*. W. H. Freeman and Company. San Francisco, USA.

Zhang, W.; H. Yamame and D.J. Chapman (1993). *Botanica marina*. 36,257-266.