

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



“Purificación de ácido Indolacético obtenido a partir de una fermentación microbiana y su evaluación *in vitro* en *Spathiphyllum wallisii* var. chopin”

Por:

CLARA SÁNCHEZ GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México.

Agosto, 2013.

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el proyecto titulado “**DESARROLLO DE UN PRODUCTO ORGÁNICO A BASE DE EXTRACTOS BACTERIANOS COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y CONTROL DE FITOPATÓGENOS**” con clave ECO-2011-01-175177, elaborado en el programa de cooperación entre la empresa **Biorganix Mexicana S.A de C.V.**, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, el Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria (INIFAP) y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). El proyecto fue Cofinanciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Secretaría de economía (SE) bajo la convocatoria 2011-03 de biotecnología productiva **FINNOVA-2011-03**.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

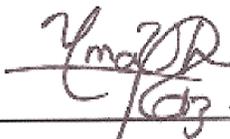
“Purificación de ácido Indolacético obtenido a partir de una fermentación microbiana y su evaluación *in vitro* en *Spathiphyllum wallisii* var. chopin”

Por:

CLARA SÁNCHEZ GARCÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Asesor Principal



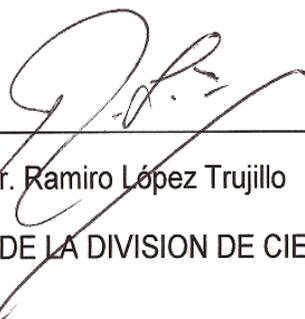
M. C. Rebeca Casique Valdés

Coasesor



M. C. Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez

Coasesor



Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL



Saltillo, Coahuila, México.

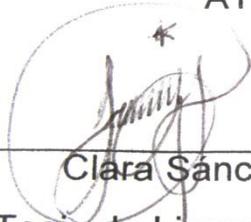
Agosto, 2013.

MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA

El suscrito, Clara Sánchez García, estudiante de la carrera de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos, con matrícula 295586 y autor de la presente Tesis manifiesto que:

1. Reconozco que el Plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país.
2. Las ideas, opiniones, datos e información publicadas por otros autores y utilizadas en la presente tesis han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.
3. Toda la información consultada ha sido analizada e interpretada por el suscrito y redactada según su criterio y apreciación, de tal manera que no se ha incurrido en el “copiado y pegado” de dicha información.
4. Reconozco la responsabilidad sobre los derechos de autor de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifiesto no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.
5. Entiendo que la función y alcance de mi comité de Asesoría está circunscrito a la orientación y guía respecto a la metodología de la investigación realizada para la presente tesis, así como del análisis e interpretación de mis resultados obtenidos, y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionado al plagio académico a mi comité de Asesoría y acepto que cualquier responsabilidad al respecto es únicamente mía.

ATTE



Clara Sánchez García

Tesis de Licenciatura/UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** y al **Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, por abrirme las puertas del aprendizaje, por todos los servicios que en su tiempo bueno o no tan bueno, siempre estuvieron disponibles.

A la empresa **Biorganix Mexicana SA. De C.V.** por brindarme la oportunidad de trabajar en sus proyectos de investigación dentro de sus instalaciones.

Al **INIFAP** Campo Experimental Saltillo, por permitirme trabajar en sus instalaciones para los ensayos de este proyecto.

A la **Dra. Ana Verónica Charles**, por brindarme su apoyo en el proyecto, como asesora de tesis, como profesora en el aula, como persona la admiro mucho y agradezco grandemente sus atenciones y enseñanzas brindadas durante mi etapa formativa

A la **M.C. Rebeca Casique**, por su paciencia al enseñarme, apoyo incondicional, disponibilidad, comprensión y todas aquellas enseñanzas durante el desarrollo del proyecto, por tus calidez para tratar a las personas, muchas gracias Rebe, has sido un pilar para poder terminar.

A la **M.C. Edith Villavicencio** por su paciencia, colaboración y enseñanzas brindadas en la etapa de bioensayos y análisis del proyecto, muchas gracias maestra, ha sido de gran apoyo.

A la **M.C. Arely González** por su gran paciencia, apoyo y enseñanzas en la última etapa de tesis, aprendí mucho de tí.

Finalmente quiero agradecer enormemente a **Irma** y **Brenda** por su apoyo incondicional, hemos convivido poco tiempo y han demostrado ser excelentes personas.

DEDICATORIAS

A mis padres **Daniel Sánchez** y **Esperanza García** por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este largo proceso formativo, por su constante apoyo principalmente moral y económico.

A mis hermanos, **Norma, Abel, Daniel, Rebeca y Catalina** porque inconscientemente me han impulsado a salir adelante, especialmente Norma, Daniel y Abel quienes han sido ejemplo a seguir.

Al **Dr. Trujillo y la MC. María Hernández y la Dra. Lulú**, quienes con sus consejos y llamados de atención, así como su aprecio y apoyo siempre incondicional, fueron y serán siempre mis buenos amigos, me han enseñado. ¡Muchas gracias!

A la **Lic. Laurita** por su apoyo incondicional, académicamente como profesora y como amiga ha sido una persona muy buena conmigo.

Al **Dr. Heladio Cornejo**, quien además de dirigir nuestra Máxima casa de estudios, siempre me tendió su mano de apoyo. Ha sido un gran honor conocerle.

A una gran amiga, **Dulce González**, con quien he pasado tantas experiencias, de quien he aprendido tanto y me ha dado pautas para seguir adelante.

A **Luis Gutiérrez, Charys, Ana Karen Trejo, y Ale Aguilar**, por su apoyo incondicional y sobre todo moral. Me han sido de gran ayuda a lo largo de esta etapa.

A **Abel Salas**, por tu apoyo he salido de tantos conflictos académico-emocionales. ¡Has sido un pilar y gran amigo!

Contenido	
RESUMEN	12
I. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. ANTECEDENTES.....	15
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	16
1.3. HIPÓTESIS	16
1.4. OBJETIVOS	17
1.4.1. GENERAL	17
1.4.2. ESPECÍFICOS.....	17
II. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 Fitohormonas.....	18
2.1.1 Características de las fitohormonas	19
2.1.2 Auxinas.....	20
2.1.3 Localización del ácido indolacético en las plantas (AIA)	22
2.1.4 Biosíntesis del ácido indolacético.....	23
2.1.4.1 Ruta de la Indolacetal Doxima	25
2.1.4.2 Ruta del Ácido Indol Pirúvico	25
2.1.4.3Ruta de la Triptamina(TAM)	25
2.2 Conjugación del AIA	25
2.3 Catabolismo del AIA	27
2.4 Elongación celular	28
2.5 Obtención de AIA por Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal	29
2.5.1 Extracción y determinación de Ácido Indolacético	30
2.6 Las plantas ornamentales.....	32
2.6.1. Producción de plantas ornamentales en México	33
2.6.2. Spathiphyllum	34
2.6.3. Spathiphyllum wallisi.....	35
2.6.4. Características de Spathiphyllum.....	36
2.7 Reproducción asexual	37
2.6.5. Cultivo <i>in vitro</i>	38
2.6.6. Ventajas de la micropropagación	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1. Obtención del Ácido Indolacético por Fermentación microbiana de la cepa JR2	42

3.1.1 Activación de la cepa JR2.....	42
3.1.2 Obtención del Ácido indolacético por fermentación microbiana	42
3.1.3. Recuperación de metabolitos secundarios (fitohormonas).....	43
3.2. Análisis de la presencia de AIA en caldo por método colorimétrico	44
3.2.1. Preparación de la curva estándar del reactivo de Salkowski.....	44
3.3. Purificación del Ácido Indolacético por cromatografía en columna.....	45
3.3.1 Recuperación del Ácido Indolacético	47
3.3.2 Determinación, cuantificación y verificación de la pureza de AIA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	47
3.3.2.1 Condiciones del método.....	48
3.4 Ensayos in vitro en plántulas de <i>Spathiphyllum wallisii</i> var. chopin.....	50
3.4.1 Condiciones de los tratamientos	50
3.4.2 Preparación de los tratamientos.....	51
3.4.3 Explantos.....	52
3.4.4 Variables evaluadas.....	54
3.5 Análisis de datos.....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
4.1. ETAPA 1. Producción de AIA por fermentación microbiana usando la cepa JR2 y Cuantificación de AIA en los cultivos microbianos por colorimetría y cromatografía.....	56
4.2. Purificación de AIA por cromatografía en columna (Sólido-Líquido).....	58
4.3. Determinación de la Pureza del AIA Purificado por Cromatografía en Columna	63
4.4. Determinación de la concentración del AIA Purificado por Cromatografía en Columna	64
4.5 ETAPA 3. Ensayos <i>in vitro</i> en plántulas de <i>Spathiphyllum wallisii</i>	65
SECCIÓN FOLIAR.....	67
4.6 Altura foliar.....	67
4.7 Número de hojas.....	69
4.8 Número de brotes	70
SECCIÓN RADICULAR	71
4.9 Longitud radicular.....	72
4.10 Número de Raíces	73

4.11 Peso fresco de raíz	75
4.12 Peso seco de raíz	76
V. CONCLUSIONES	82
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
VII. ANEXOS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 ESTRUCTURA DEL AIA (TOMADO DE WWW.PLANT-HORMONE INFO.)	20
FIGURA 2.2 BIOSÍNTESIS DE AIA EN PLANTAS (TAIZ Y ZEIGER, 2006)	26
FIGURA 2.3 TRANSPORTE DE AIA A TRAVÉS DE LA PLANTA (TANIMOTO,2005)	28
FIGURA 2.4 <i>SPATHIPHYLLUM WALLISI</i> VAR. CHOPIN: ESPATATA JÓVEN (IZQUIERDA); PLANTA COMPLETA (CENTRO) Y ESPATATA MADURA (DERECHA)	36
FIGURA 3.1 DIAGRAMA DE LA PRODUCCIÓN DE AIA	43
FIGURA 3.2 SHAKER (MRC-ORBITAL)	43
FIGURA 3.3 DIAGRAMA DE LA RECUPERACIÓN DE AIA	44
FIGURA 3.4 CENTRIFUGA LABNET (Z 300)	44
FIGURA 3.5 CUANTIFICACIÓN DE AIA CON EL REACTIVO DE SALKOWSKI (B) Y ESPECTROFOTÓMETRO (GENESYS 20) (A)	45
FIGURA 3.6 SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE AIA POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	46
FIGURA 3.7 ROTAVAPOR (BUCHI® R-210/R-215)	47
FIGURA 3.8 CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS AGILENT TECHNOLOGIES 1200. Y COLUMNA LUNA C-18 (PHENOMENEX)	48
FIGURA 3.9 BAÑO ULTRASÓNICO (BRANSON 3510)	49
FIGURA 3.10 CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE AIA (SIGMA®)	50
FIGURA 3.11 ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTOS DE <i>S. WALLISII</i> VAR. CHOPIN PARA LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	53
FIGURA 3.12 EVALUACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>S. WALLISII CHOPIN</i> DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS	54
FIGURA 4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE AIA DETERMINADA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO (USANDO EL REACTIVO DE SALKOWSKI)	56
FIGURA 4.2 SEPARACIÓN DEL METABOLITO AIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN EL CALDO DE FERMENTACIÓN DE JR-2, POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (EN FRACCIONES RECUPERADAS)	59
FIGURA 4.3 CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE AIA (SIGMA®)	60
FIGURA 4.4 CROMATOGRAMA DE UN ESTÁNDAR DE TRIPTÓFANO	61
FIGURA 4.5 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN 1	61
FIGURA 4.6 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN 4	62
FIGURA 4.7 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN 7	62
FIGURA 4.8 CROMATOGRAMA DE LA FRACCIÓN 9	63
FIGURA 4.9 CROMATOGRAMA DEL CONCENTRADO DE AIA DESPUÉS DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN EN CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	64
FIGURA 4.10 PLÁNTULAS DE <i>SPATHIPHYLLUM WALLISII</i> VAR. CHOPIN (AF Y NH) PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS ADICIONADOS CON AIA-JR2	65
FIGURA 4.11 PLÁNTULAS DE <i>SPATHIPHYLLUM CHOPIN</i> (NR) PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS ADICIONADOS CON AIA-JR2	66
FIGURA 4.12 PLÁNTULAS DE <i>SPATHIPHYLLUM CHOPIN</i> PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS ADICIONADOS CON AIA-STD	66
FIGURA 4.13 PLÁNTULAS DE <i>SPATHIPHYLLUM CHOPIN</i> PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS ADICIONADOS CON AIA-P	67
FIGURA 4.14 EFECTO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE AIA EN LA ZONA FOLIAR DE <i>S. CHOPIN</i> <i>IN VITRO</i>	71
FIGURA 4.15 EFECTO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE AIA EN LA ZONA RADICAL DE <i>S. CHOPIN</i> <i>IN VITRO</i>	80

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 2.1 ALGUNOS EFECTOS FISIOLÓGICOS MÁS IMPORTANTES CAUSADOS POR HORMONAS VEGETALES EN PLANTAS (PÉREZ Y MARTÍNEZ-LABORDE, 1994).	21
CUADRO 2.2 FUNCIÓN EJERCIDA POR LAS FITOHORMONAS EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA (PÉREZ Y MARTÍNEZ-LABORDE, 1994).	22
CUADRO 2.3 PLANTAS DE MAYOR IMPORTANCIA COMERCIAL EN MÉXICO (LESZCYŃSKA-BORYS, 1992).	34
CUADRO 2.4 COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS VEGETALES (ADAPTACIÓN DE MUÑOZ, 2006).	40
CUADRO 3.1 CONDICIONES DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	51
CUADRO 4.1 LECTURAS DE ABSORBANCIA DE LA REACCIÓN DE AIA A DIFERENTES	57
CUADRO 4.2 FRACCIONES RECUPERADAS A DIFERENTES TIEMPOS DE ELUCIÓN (CALDO FERMENTADO POR JR2) CON H_3PO_4 + ACN EN CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.	58
CUADRO 4.3. MEDIAS DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS EN PLANTAS DE S. CHOPIN IN VITRO DESPUÉS DE 4 SEMANAS DE EXPOSICIÓN A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS (T1-T12 Y T13 (CONTROL)).	79

RESUMEN

Las bacterias representan una alternativa para mejorar el aporte nutricional de las plantas. Dentro de sus efectos benéficos destaca la secreción de reguladores de crecimiento (auxinas), que pueden mejorar los procesos de germinación de semillas, nutrición, desarrollo de raíces, entre otros. Los usos de las auxinas en la esfera agrícola son muy diversos y se aplican de forma rutinaria en biofábricas, en cultivos *in vitro* de material vegetal y en las plantaciones. Algunas auxinas, como el propio AIA, son sintetizadas por algunos microorganismos de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc.

En el presente trabajo se estudió el efecto del AIA obtenido de caldos de fermentación microbiana a partir de la cepa JR2 la cual fue aislada de la rizósfera de maíz proveniente de Galeana, N.L. en el crecimiento *in vitro* de plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin comparando este efecto con el AIA estándar de Sigma®, de origen sintético y el AIA obtenido de caldos de fermentación microbiana pero purificado por cromatografía en columna.

La investigación se realizó en tres etapas. La primera consistió en la obtención del AIA a partir de fermentación en medio LB adicionado con triptófano de la cepa JR2 identificada por la empresa BIORGANIX MEXICANA S.A. de C.V. La segunda etapa abarcó la identificación y purificación así como cuantificación del AIA producido a partir de la cepa JR2. La purificación se realizó por medio de cromatografía en columna (sólido-líquido) empleando como eluyente una solución de ácido fosfórico-acetonitrilo y sílica 60* como fase estacionaria en el CINVESTAV unidad Saltillo. La última etapa consistió en la evaluación *in vitro* de la actividad del AIA como promotor de crecimiento vegetal de plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var. Chopin. En las pruebas de actividad biológica *in vitro* se comparó el efecto del AIA purificado y del caldo directamente obtenido a partir de la fermentación (AIA-JR2) a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0, y 2.0 ppm), comparando este efecto contra el AIA comercial (Sigma®) en las mismas dosis y

un control (sin tratamiento) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE- INIFAP.

Se obtuvieron 14 fracciones por cromatografía en columna de AIA obtenido por fermentación microbiana de las cuales solo las fracciones 4 a 8 fueron los que presentaron una mayor recuperación del metabolito con áreas de 1960 hasta 7170 mA (500 a 1250.87 ppm).

Mediante un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x4, se analizó el efecto de los diferentes tipos de AIA aplicados a diferentes concentraciones. En el análisis estadístico realizado se determinó que existen diferencias significativas entre los diferentes tipos y concentraciones de AIA utilizados, siendo el caldo directamente obtenido a partir de la fermentación de JR2 del que se obtuvo para la mayoría de las variables los mayores resultados a las concentraciones indicadas; para altura foliar (AF) (T9=0.25 ppm), número de hojas (NH) (T9= 0.25 ppm y T11= 1.0 ppm), número de brotes (NB) (T9= 0.25 ppm y T11= 1.0 ppm), peso fresco de raíz (PFR) (T11= 1.0 ppm), número de raíces (NR) (T11= 1.0 ppm), y peso seco de raíz (PSR) (T10=0.5 ppm). Los tratamientos con AIA purificado (AIA-P) mostraron un comportamiento similar a los obtenidos con AIA-JR2 para las variables; AF (T3=1.0 ppm) y NH (T1=0.25 ppm, T2=0.5 ppm, y T3=1.0 ppm). Los tratamientos con AIA comercial (Sigma®) registraron promedios menores en las variables referidas, siendo estadísticamente superiores solo con la variable LR (T5=0.25 ppm, T6=0.5 ppm y T8=2.0 ppm).

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que la concentración de 0.25 ppm de AIA-JR2 (T9) promueve el crecimiento de plántulas de *S. wallisii* var. chopin mediante el incremento de AF, NH, y NB, mientras que al aplicar 0.5 ppm de AIA-JR2, se presentaron mejores resultados en PSR e inferiores en AF, NH. Con 1.0 ppm se obtuvo mayor NH, NB, PFR y NR; en el caso de 2.0 ppm (T12) se encontraron valores inferiores para NH y AF.

Los tratamientos con 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de AIA- P registraron valores mínimos para LR, NR, PFR y PSR. A 0.25, 0.5 y 1.0 ppm se encontró que existen

valores más bajos en NB, mientras que con 0.25, 0.5 y 1.0 se registró un mayor valor para NH.

Los tratamientos con AIA-STD (Sigma®) a 0.25, 0.5 y 2.0 ppm fueron los que mostraron los valores más altos para la variable LR con valores de 33.46 mm y a 0.5 ppm de AIA-STD (Sigma®) se encontraron valores íferos para NH de hasta 4.38 respecto a los demás tratamientos.

El uso de concentraciones a partir de 0.25 ppm de AIA-JR2 generó mayor influencia en el crecimiento foliar y radicular en las vitroplantas de *S. wallisii* var. chopin que las concentraciones del AIA-STD y las de AIA-P. Dada la capacidad de ésta cepa para producir AIA a partir de Triptófano ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y dicho metabolito ejerce una fuerte influencia en el desarrollo de plantas, ésta puede ser utilizada como insumo en la formulación de biofertilizantes orgánicos dirigidos a la promoción del crecimiento de plantas *in vitro*.

La cepa JR2 posee un amplio potencial para su uso en la producción agrícola orgánica, tanto en la estimulación del crecimiento foliar como radicular de vitroplantas de *S. wallisii* var. chopin.

Palabras clave: purificación, Rizobacterias, fitohormonas, auxinas, ácido Indolacético, *Spathiphyllum*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Con la llegada de la segunda revolución verde se han establecido nuevas tecnologías, las cuales buscan la optimización de los sistemas agrícolas. De este modo, se ha abierto campo a la investigación y producción de fórmulas comerciales de origen biológico, basados en microorganismos con reconocida actividad como promotores de crecimiento vegetal, la cual es atribuida a la producción de reguladores de crecimiento.

Las bacterias representan una alternativa para mejorar el aporte nutricional de las plantas; dentro de los efectos benéficos se destacan la secreción de reguladores de crecimiento (auxinas), mejorando los procesos de germinación de semillas, nutrición, desarrollo de raíces, entre otros.

El ácido indol acético (AIA) es una auxina natural presente en la mayoría de las plantas. Las auxinas son hormonas vegetales que regulan diversos procesos del desarrollo vegetal, por lo que su aplicación en agricultura es muy frecuente (Castillo *et al.*, 2005).

Frente a la actual utilización de auxinas obtenidas por síntesis química, la síntesis microbiológica de estas sustancias resulta de gran importancia ya que la aplicación de caldos de fermentación que contienen auxinas, puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica.

El empleo de microorganismos con potencial biofertilizante productores de AIA ha demostrado ser eficiente gracias a que pueden aumentar los rendimientos y la calidad de las cosechas; así lo han demostrado los trabajos en campo realizado en Colombia (Moreno *et al.*, 2006; Montoya, 2004) en los cuales se reporta rendimientos en pastos del 80% con respecto al testigo, aplicando biofertilizantes a partir de microorganismos nativos.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las aplicaciones prácticas de compuestos hormonales son muy diversas y su utilización actual en la agricultura es frecuente y en continuo aumento.

La industria agroquímica proporciona un amplio repertorio de fitorreguladores que, en general, se obtienen por síntesis química. Por otra parte, la Agricultura industrial, se enfrenta a una problemática importante debido a una mayor sensibilidad de la sociedad ante los problemas medioambientales y una mayor valoración de los productos ecológicos por los consumidores de los países desarrollados. Existe por tanto, un interés creciente en desarrollar una agricultura sostenible que sustituya la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores del crecimiento sintéticos (análogos a las fitohormonas) por productos naturales. La síntesis microbiológica de fitohormonas puede constituir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica sostenible ya que la aplicación de caldos de fermentación que contienen estos metabolitos reduce el impacto medioambiental y su obtención a escala industrial resulta económicamente más atractiva. La eficacia de estas fitohormonas de origen biológico se ha comprobado en diversos estudios en los que se ha demostrado que su aplicación produce un aumento en los rendimientos y la calidad de las cosechas (Frankenberger y Arshad, 1995).

La micropropagación *in vitro* de plantas, se ha empleado como una buena técnica para la propagación extensiva de especies de plantas que presentan bajos índices de multiplicación, logrando exitosamente la reproducibilidad de las mismas y asegurando además su inocuidad y calidad.

1.3. HIPÓTESIS

El ácido indolacético purificado de extractos microbianos tiene un efecto positivo en el crecimiento radicular de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin cultivada *in vitro*.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. GENERAL

Evaluar el efecto de ácido indolacético (AIA) purificado a partir de extractos microbianos como promotor de crecimiento vegetal de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin *in vitro*.

1.4.2. ESPECÍFICOS

- Obtener ácido Indolacético a partir de una fermentación bacteriana usando una cepa aislada de la rizósfera de maíz (JR2).
- Purificar y cuantificar el ácido indolacético presente en caldos de fermentación bacteriana empleando cromatografía en columna y HPLC.
- Evaluar el efecto del AIA purificado (AIA-P) en plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var chopin *in vitro* y comparar su efecto contra el AIA-JR2, AIA-STD (Sigma®) y un blanco o testigo (Sin tratamiento).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fitohormonas

Las fitohormonas son sustancias endógenas bioactivas presentes en las plantas, que controlan diversos procesos del desarrollo vegetal, éstas se encargan de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas (Srivastava, 2002).

Weaver (1982) define los fitorreguladores como compuestos orgánicos que en pequeñas dosis fomentan, inhiben o modifican, cualquier proceso fisiológico de plantas. Cantidades mínimas, por ejemplo 1.0 ppm, ejercen efectos fisiológicos que son medibles. Por otra parte, Salisbury y Ross (1994) lo definen como un compuesto orgánico que es sintetizado en alguna parte de la planta y se trasloca a otra parte, en donde a concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica.

En la actualidad se conocen compuestos que inducen o inhiben el crecimiento, floración o producción. En ocasiones, a una concentración determinada, un compuesto inhibe y en otra promueve. Por lo cual existe un importante potencial para la aplicación práctica de este conocimiento ya que la inducción o represión de raíces, es crucial para el cultivo *in vitro* de plantas.

Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, a diferencia de las hormonas animales, las cuales son sintetizadas en glándulas. Pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos xilemáticos y floemáticos. Las hormonas vegetales controlan un gran número de procesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. Se establecen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones vegetales, lo que permite solucionar el problema de la ausencia de sistema nervioso. Las fitohormonas ejercen sus efectos mediante complejos mecanismos moleculares, que desembocan en

cambios de la expresión génica, cambios en el citoesqueleto, regulación de las vías metabólicas y cambio de flujos iónicos (Rost, 1979).

Bidwell (1979) citó que la concentración hormonal de promotores e inhibidores de crecimiento es muy baja o proporcionalmente igual durante el invierno, cuando ocurre la vernalización, pero a medida que avanza la primavera, frente el cambio de temperatura y fotoperiodo, dicha concentración se modifica prevaleciendo los promotores sobre los inhibidores de crecimiento.

Los precursores o activadores de las fitohormonas y sustancias del crecimiento son los aminoácidos. La L-metionina es precursor del etileno y otros factores de crecimiento como el esperamino y esperadimina, los cuales son sintetizados de 5-adenosil metionina.

Por su parte, el L-triptófano es precursor de la síntesis de auxina y está disponible solamente si se usa la hidrólisis proteica en su extracción. L- triptófano es utilizado por la planta en su forma –L y su biosíntesis se lleva a cabo por medio de enzimas (Taiz y Zeiger, 2006).

2.1.1 Características de las fitohormonas

Los reguladores de crecimiento (fitohormonas) son sintetizados por la planta, se encuentran en muy bajas concentraciones en el interior de los tejidos, y pueden actuar ya sea en el lugar en que fueron sintetizados o en otra región diferente de la planta, estos reguladores son transportados en el interior de la planta empleando para ello un gasto de energía. Los efectos fisiológicos producidos no dependen de una sola fitohormona, sino más bien de la interacción de muchas de estas sobre el tejido en el cual inciden. A veces un mismo factor produce efectos contrarios dependiendo del tejido en donde efectúa su respuesta. Esto podría deberse a la interacción con diferentes receptores, siendo éstos los que tendrían el papel más importante en la transducción de la señal. En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas, en un tejido. Así por ejemplo, auxinas y citocininas, de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir

a la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de masas celulares (Taiz y Zeiger, 2006).

El ácido abscísico (ABA), el ácido indolacético (AIA) y las citocininas (CQ) participan en los mecanismos de regulación del estado fisiológico de la planta. Así, además de otras funciones, el ABA estimula el cierre de los estomas, mientras que el AIA y CQ ejercen la acción contraria. Por otra parte, las CQ estimulan la multiplicación celular y el AIA favorece el crecimiento celular. Determinar sus niveles foliares es fundamental para poder establecer la respuesta de la planta frente a los estreses abióticos (Mansfield y Mc Ainh, 1995; Azcón y Talón, 2000).

2.1.2 Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos reguladores del desarrollo de las plantas que, entre otros efectos, influyen en el crecimiento, la división celular y la formación de raíces (Cuadro 2.1 y 2.2).

Este grupo de hormonas cuyo nombre proviene del griego y significa “crecer”, le es dado a una serie de compuestos que estimulan la elongación celular. La auxina natural más importante es el ácido indolacético (AIA) aunque existen otros compuestos denominados auxinas sintéticas que producen efectos similares al AIA y se utilizan en la práctica agrícola con preferencia al AIA (Patten y Glick, 1996).

La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (AIA) (Figura 2.1), muy activo en bioensayos y presente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-CIIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA) (Ludwig y Cohen 2002).

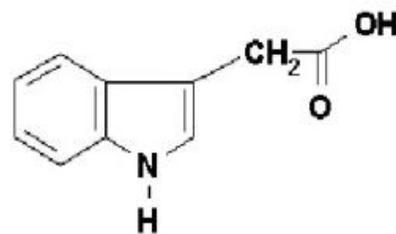


Figura 2. 1 Estructura del AIA (Tomado de www.plant-hormone.info.)

Cuadro 2 1. Algunos efectos fisiológicos más importantes causados por hormonas vegetales en plantas (Pérez y Martínez-Laborde, 1994).

Efecto fisiológico	Auxinas	Giberelinas	Citocininas	Ácido	Etileno
				Abcísico	
Respuestas trópicas	Si	Si	No	Si	Si
Crecimiento	A veces	A veces	Lo activa	Lo inhibe	Lo inhibe a veces
Aumento de tamaño celular en cultivo de tejidos	Si, en algunos casos	Si en algunos casos	Si	No	No
Control de la diferenciación en cultivo de tejidos	Si	Si	Si	Si	Si
Estimula el enraizamiento en estaquillas	Si	No	Respuesta variable	Si, en algunos casos	Si
Inhibe el desarrollo radicular	Si	No	Se desconoce	Si	Si
Activa el crecimiento de frutos	Si	Si	Si, en algunos	No	No
Estimula la división del cambium	Si	Si	Si	Puede inhibirla	No
Abscisión de hojas y frutos	Si	No de forma directa	Si, en algunos	No	No
Activa el crecimiento de frutos	Si	Si	Si, en algunos	No casos	No
Afecta al crecimiento del tallo	No	Si, lo activa	No	Lo inhibe	Lo inhibe
Interrumpe el reposo de yemas vegetales	No	Si	Si	No, lo induce	Si, en algunos casos
Favorece la germinación en algunas semillas	No	Si	No	No, la inhibe	Si, en algunos casos
Favorece la síntesis de α -amilasa en granos de cereal	No	Si	No	No, la inhibe	Si, en algunos casos
Mantenimiento de la dominancia apical	Si	Si	No	Se desconoce	Si
Inhibe la degradación de proteínas y clorofilas en la senescencia	Si, en algunos casos	Si	Si, en algunos casos	No, la acelera	No, la acelera
Aumenta la respiración del fruto durante la maduración	Se desconoce	No	No	No	Si

Una auxina debe poseer una estructura con una carga negativa en el carboxilo, separada por una distancia de 0.55 nm (5.5 Å) de otra carga residual positiva, la cual puede estar localizada sobre un anillo indólico, como el AIA, o aromático como el ácido 2,4 dicloro fenoxiacético. Para que una auxina tenga efecto, necesita tener estas dimensiones, debido a que éstas son las condiciones necesarias para ser reconocida por el receptor (Azcón y Talón, 1996).

Para que una sustancia exhiba acción auxínica debe tener un radical ácido o ser fácilmente convertible a él, un anillo aromático y de uno a cuatro carbonos entre el carboxilo y el anillo (Rojas y Ramírez, 1987). Todas las auxinas sintéticas causan efectos parecidos pero cada producto individual tiene una aplicación particular dentro de la regulación o acción auxínica (Taiz y Zeiger, 2006)

Los usos de las auxinas en la esfera agrícola son muy diversos y se aplican de forma rutinaria en empresas que producen productos de bajo impacto ambiental, en los cultivos *in vitro* de material vegetal y en las plantaciones.

Cuadro 2 2. Función ejercida por las fitohormonas en los diferentes órganos de la planta (Pérez y Martínez-Laborde, 1994).

Hormonas	Lugar de síntesis	Función
Auxinas	Brotes terminales de los tallos	Crecimiento de los tallos por alargamiento celular. Regulan el crecimiento de las raíces.
Giberelinas	Tallos	Germinación de semillas.
Citocininas	Raíces	Crecimiento de la planta por multiplicación celular. Estimulan el desarrollo de las ramas laterales.
Etileno	Frutos	Maduración de frutos.
Ácido abcísico	Hojas	Inhibe el desarrollo de semillas. Controla el cierre de estomas.

2.1.3 Localización del ácido indolacético en las plantas (AIA)

Aunque las auxinas se encuentran en toda la planta, las concentraciones más altas se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg·kg⁻¹ peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada es sustancialmente más elevada.

Ensayos con bloqueadores de transporte (por ejemplo el ácido triiodododenzoico, TIBA) y estudios con mutantes han demostrado que el transporte de auxinas es necesario para el desarrollo normal radicular, vascular y embrionario y para respuestas a tropismos. El transporte de auxinas es complejo y está regulado por la acción de varias proteínas. El AIA se sintetiza principalmente en el ápice de las yemas, y se transporta polarmente hacia la raíz a través de células parenquimáticas asociadas al tejido vascular (Jordan y Cassaretto, 2006).

La polaridad del transporte de auxina fue demostrada por primera vez por Fritz Went usando coleoptilos de avena (Went y Thimann, 1937). Sin embargo, evidencias adicionales sugieren que el AIA también es transportado de otros órganos hacia el ápice de tallos (Ljung *et al.*, 2002) (Figura 2.3).

El transporte polar de AIA es por medio de un mecanismo dependiente de energía. Ocurre en forma basipétala en tallos y en raíces, aunque en éstas últimas puede ocurrir en ambos sentidos, en forma acropétala en el cilindro central y basipétala en la epidermis. La mayor parte de auxinas que se produce en hojas maduras viaja al resto de la planta en forma pasiva y apolar a través del floema. Las auxinas aplicadas exógenamente sobre las hojas pueden penetrar en los elementos cribosos después de ser absorbidas, pero luego se transportan al parénquima vascular (Ljung *et al.*, 2002).

2.1.4 Biosíntesis del ácido indolacético

Existe información suficiente para demostrar que el AIA se sintetiza a partir del triptófano (Salisbury *et al.*, 1994; Taiz y Zeiger, 2006). La transformación (de triptófano a AIA) pueden llevarla a cabo microorganismos e incluso se puede producir una conversión oxidativa cuando el triptófano se encuentra en presencia de peroxidasas y radicales libres. Las vías de síntesis del AIA se basan en la evidencia obtenida a partir de la presencia de intermediarios y su actividad biológica y el aislamiento de enzimas capaces de convertir *in vivo* estos intermediarios en AIA (Figura 2.2).

La producción del AIA, estimulante del crecimiento vegetal, en el caso de las plantas superiores y microorganismos, se realiza por la vía del ácido antranílico

(AA) a partir de Triptófano (Trp), el cual es regulado por el gen de la antranilato sintasa. El Trp o sus análogos (5-metilriptófano; 4 metilriptófano; 5 fluorotriptófano; 5 metilhidroxi triptófano; 7 azatriptófano: ácido 3 beta-indoleacrilico y acido 3 metil antranilico) son capaces de inhibir el crecimiento de cultivos celulares tanto de organismos procarióticos, como de eucarióticos (Anderson *et al.*, 1999). En las plantas, el AA forma parte de la ruta de síntesis del Trp.

En las plantas verdes, el ácido Indol-3-Acético deriva del Triptófano, mediante una conversión enzimática en la que están implicados otros compuestos indólicos, como la Triptamina y el ácido Indol-3-Pirúvico, a través de diferentes procesos, entre los que se encuentran la transaminación y descarboxilación, seguidos de dos pasos posteriores de oxidación.

Existen 4 rutas de síntesis de AIA, en las cuales el aminoácido Triptófano se considera el principal precursor del AIA.

- 1) Por descarboxilación para producir triptamina (TAM),
- 2) Por oxigenación para originar indolacetamida (IAM);
- 3) Por transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico (IPA)
- 4) Por oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (IAOx).

La ruta vía IAM es una ruta sintética descrita en bacterias que también puede ocurrir en plantas. En *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae*, la enzima Trp monooxigenasa convierte el Trp a IAM y una IAM hidrolasa convierte IAM en AIA. IAM se encuentra en *Arabidopsis* a niveles similares que AIA y se sabe que la enzima aminohidrolasa (AMI1) puede convertir IAM en AIA *in vitro* (Pollmann *et al.*, 2003).

La ruta vía IPA es también importante en algunos microorganismos y puede ocurrir en plantas (Normanly, 1997).

Se ha aislado IPA en plantas, pero las enzimas que convierten Trp en IPA o IPA a AIA aún no han sido identificadas. La conversión de Trp a IAOx es catalizada por dos enzimas del tipo citocromo P450, llamadas CYP79B2 y CYP79B3 en *Arabidopsis* (Hull *et al.*, 2000).

IAOx constituye un punto común para la síntesis de AIA y de compuestos secundarios conocidos como glucosinolatos indólicos (Bak *et al.*, 2001).

2.1.4.1 Ruta de la Indolacetal Doxima

La descarboxilación oxidativa del triptófano (Trp) produce indolacetaldoxima que, por pérdida de agua, genera indolacetonitrilo.

El indol-3-acetaldoxima por medio de un intermedio: el indol 3-metil-glucosinolato, se transforma en indol-3-acetonitrilo, en esta transferencia interviene un enzima: la mirosinasa. El indol-3-acetonitrilo por acción de una nitrilasa se transforma en ácido-indol-3-acético (Figura 2.2).

2.1.4.2 Ruta del Ácido Indol Pirúvico

Está basada en una desaminación del Trp que produce ácido indol pirúvico el cual se descarboxila para dar indol-3-acetaldehído, éste es oxidado para dar AIA.

El Trp por medio del enzima Trp aminotransferasa se convierte en ácido-indol-3-pirúvico, el cual se descarboxila por la Indol-3-pirúvico-descarboxilasa dando indol-3-acetaldehído, el cual es oxidado por la indol-3-acetaldehído-oxidasa para dar ácido-indol-3-acético (Taiz y Zeiger, 2006) (Figura 2.2).

2.1.4.3 Ruta de la Triptamina (TAM)

La descarboxilación del Trp se produce dando lugar a la triptamina (TAM), la cual a través de una desaminación oxidativa, produce indol-3-acetaldehído (IAAld) que al ser oxidado por la AIA deshidrogenasa da lugar a ácido-indol-3-acético (AIA) (Taiz y Zeiger, 2006) (Figura 2.2).

2.2 Conjugación del AIA

En la conjugación, el AIA se conserva la estructura de la hormona (la estructura básica) pero la priva de actividad biológica. Los términos auxina ligada o auxina conjugada se utilizan para designar los compuestos formados por la

unión covalente del AIA con otras moléculas (González *et al.*, 1999 [www.efn.uncor.edu]).

Hernández-Mendoza *et al.*, (2008) en un estudio realizado sobre la identificación de metabolitos producidos a partir del Trp por *A. brasilense*, encontró que la síntesis de ácido antranílico (AA) es participante de la ruta de producción de AIA a partir del Trp.

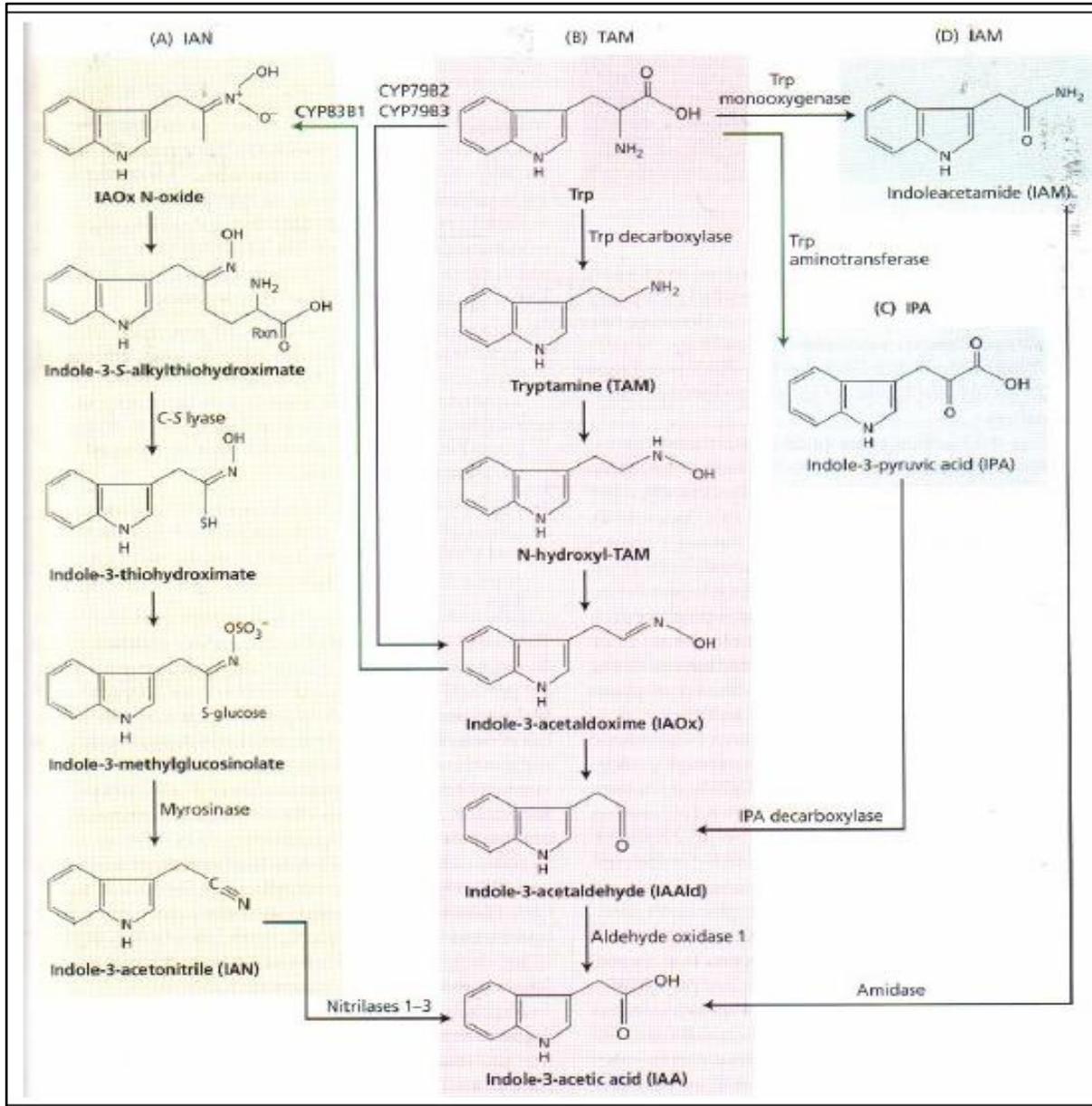


Figura 2. 2 Biosíntesis de AIA en plantas (Taiz y Zeiger, 2006)

2.3 Catabolismo del AIA

La oxidación del AIA es un proceso catalítico irreversible que implica la pérdida de la actividad biológica de la hormona. Ésta puede ser descarboxilativa o no descarboxilativa. Las 2 rutas oxidativas son irreversibles y los productos resultantes carecen de actividad biológica.

La oxidación descarboxilativa está catalizada por AIA oxidasa, una actividad que poseen las peroxidasa vegetales. El peróxido de Hidrógeno, los monofenoles y algunos iones metálicos como Mn^{+2} activan la reacción mientras que los di- y polifenoles la inhiben.

El transporte polar de auxinas lo explica la hipótesis quimiosmótica. Esta hipótesis presupone el movimiento de AIA de una célula a la inmediatamente inferior a lo largo de una columna de células transportadoras. La entrada de AIA a las células transportadoras se produciría por toda la superficie celular, bien mediante transportadores de entrada, por difusión de AIA no disociado (AIAH: con el grupo COOH sin disociar), la difusión estaría favorecida por el gradiente de pH existente a ambos lados de la membrana plasmáticas. Este gradiente de pH sería generado por bombas protónicas (ATPasas de H^+ de la membrana plasmática) que mantendrían un pH más bajo en la pared celular o apoplasto (pH 5) que en el citoplasma o simplasto (pH 7)

La membrana plasmática, permeable al AIA no disociado (AIAH) permitiría la entrada de la molécula una vez en el interior de la célula, se disociaría en AIA^- y H^+ debido al aumento de pH.

La membrana es impermeable al anión AIA^- que sólo podría salir de la célula mediante transportadores específicos (no podría salir por difusión).

La polaridad (dirección) del transporte vendría dada por la distribución asimétrica de estos transportadores de salida que estarían localizados, exclusivamente, en la base de las células transportadoras. Gracias a la distribución asimétrica de los transportadores, el transporte se encuentra polarizado.

El transporte polar desempeña una importante función en el modo de acción de las auxinas, ya que puede intervenir en procesos como el crecimiento del tallo, la dominancia apical, la diferenciación vascular o el enraizamiento de esquejes (Salisbury *et al.*, 1994) (Figura 2.3).

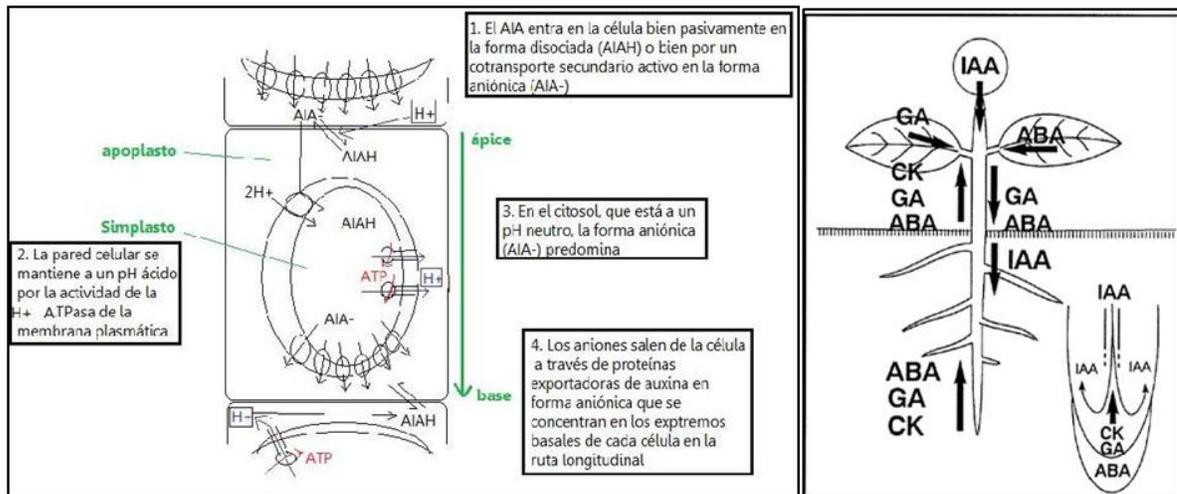


Figura 2. 3 Transporte de AIA a través de la planta (Tanimoto,2005)

2.4 Elongación celular

Las auxinas aumentan la plasticidad de la pared celular. Cuando la pared se ablanda, la célula se dilata debido a la presión de turgencia. Conforme la presión de turgencia disminuye a causa de la expansión, la célula toma más agua y de este modo continúa engrosándose hasta que la pared opone suficiente resistencia.

El ablandamiento de la pared celular se consigue mediante una compleja serie de interacciones. Uno de los primeros efectos del tratamiento con auxina implica cambios en el metabolismo celular que causan un rápido bombeo de protones a través de la membrana plasmática. La acidificación resultante de la pared celular induce mediante un mecanismo desconocido, la hidrólisis de los enlaces que dan consistencia a la pared celular y, consecuentemente, las células pueden engrosarse cediendo a la presión de turgencia. La demostración de la llamada Hipótesis del crecimiento en medio ácido ha sido un importante avance en la comprensión de la acción de la auxina. Diversos estudios evidencian esta teoría al demostrar el efecto de la auxina en la secreción de protones, el hecho de que

soluciones ácidas (pH 5,0 a 5,5) pueden causar una respuesta de elongación mimetizando la acción de la auxina, y la evidencia de que los amortiguadores de pH, que impiden la acidificación de la célula, inhiben el efecto elongador de la auxina (Hamilton *et al.*, 1992).

Investigadores han probado que las auxinas actúan en dos formas durante la elongación celular: un efecto rápido, a corto plazo, provocado por el crecimiento en medio ácido y un efecto continuo a través de la regulación de la expresión génica. De hecho, se ha demostrado que la auxina provoca la expresión de por lo menos 10 genes específicos, todos ellos presumiblemente implicados en el crecimiento. Se sabe también, que la auxina afecta concretamente la fase de transcripción. Los efectos de la auxina sobre la expresión génica en plantas parece ser similar a la que ejercen algunas hormonas en animales (Jordan y Cassaretto, 2006).

2.5 Obtención de AIA por Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

En la naturaleza los reguladores de crecimiento vegetal no solo son producidos por las plantas, sino también por otros organismos presentes en el suelo, los cuales son capaces de sintetizar estos metabolitos, y que están en contacto constante con las raíces de las plantas, lo que genera un mejor desarrollo de éstas y así una relación entre la planta y el microorganismo, estos microorganismos, ya sean hongos o bacterias, son conocidos como promotores de crecimiento vegetal o Plant Growth Promoting Microorganisms (PGPMs) que no solo son capaces de sintetizar reguladores de crecimiento vegetal sino que también ayudan a las plantas en otros procesos, evidenciando su producción por medio de bioensayos, por su especificidad y precisión (Vargas *et al.*, 2001; Gray y Smith, 2004).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, son microorganismos de vida libre que viven en la rizosfera o rizoplano, en estrecho contacto entre raíces-suelo-microorganismos. Estas realizan funciones, tales como: estimular la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento, fijar nitrógeno, solubilizar los

nutrimentos, producir sideróforos y controlar los fitopatógenos del suelo: razón por la cual en la agricultura se postulan como alternativa prometedora para reducir el uso de agroquímicos (Lemanceau *et al.*, 2008).

Las bacterias promotoras del crecimiento, una vez inoculadas a las semillas, inducen la germinación y colonizan la raíz, y transforman los exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, mediante un tipo de estimulación muy similar a las fitohormonas comerciales. En este proceso ocurre la proliferación de pelos radicales y el incremento en la absorción mineral de nutrimentos (nitrógeno, fósforo y hierro), entre otros efectos (Malik y Williams, 2008).

Algunas auxinas, como el AIA, son sintetizadas por algunos microorganismos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc. (Patten y Glick, 1996). Entre las rizobacterias identificadas como promotoras del crecimiento se encuentran los géneros de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Stenotrophomona*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Streptomyces* y *Rhizobium* (Kumar *et al.*, 2006; Dimkpa *et al.*, 2008), de los cuales el 80% de éstas son capaces de producir ácido indolacético (AIA) (Zakharova *et al.*, 1999).

Estudios recientes han demostrado que algunas rizobacterias tienen la habilidad de incrementar la proliferación de raíces durante la micropropagación de plantas del género *Eucalyptus* (Teixera *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2009).

Según Vargas *et al.*, (2001), bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* al penetrar la raíz producen giberelinas, auxinas, citocininas, ácido abscísico y fijan nitrógeno, lo que las convierte en excelentes biofertilizantes. Para el género *Pseudomonas* también se ha reportado la capacidad de producción de auxinas y giberelinas.

2.5.1 Extracción y determinación de Ácido Indolacético

El estudio de los reguladores de crecimiento vegetal producidos por microorganismos, no es fácil puesto que se producen en bajas concentraciones y pueden encontrarse mezclados con otros compuestos debido a que se generan

como metabolitos secundarios, lo que hace necesaria la purificación eficiente del compuesto.

Con el tiempo, se han establecido varios estudios de dichos reguladores de crecimiento vegetal, aplicando técnicas de análisis químicos, las cuales pueden identificar, caracterizar y cuantificar estos compuestos.

Una etapa decisiva en la producción microbiológica de fitohormonas es la determinación de su rendimiento, lo que implica el empleo de métodos de separación y cuantificación de la hormona presente en los caldos de fermentación.

Los trabajos de Thimann (1937) pusieron de manifiesto mediante su teoría directa de la auxina, que estas se encuentran en la planta en tres formas una de fácil extracción por métodos de difusión, otra más difícil de extraer que requiere el empleo de solventes orgánicos y, por último, una tercera forma de auxina cuya extracción requiere métodos enérgicos, ya sea hidrólisis con NaOH o bien, el empleo de enzimas proteolíticas.

Para el análisis de estos metabolitos, generalmente se utilizan procesos de cromatografía con sorbentes como gel de sílice, los cuales una vez purificado, su análisis se hace teniendo en cuenta las características químicas del mismo.

Debido a las distintas funciones de los reguladores de crecimiento vegetal, en este caso específicamente, las auxinas sobre las plantas, así como la gran variedad de organismos capaces de sintetizar estos metabolitos, es preciso el empleo de un método estándar para evaluar la producción de dicho compuesto por los microorganismos promotores del crecimiento vegetal para evaluación de la calidad de los bioformulados y producción de biofertilizantes, entre otros.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ha sido el método de separación más empleado en el análisis de los reguladores del crecimiento, siendo la fase reversa C18 la más usada. La mayoría de los métodos de HPLC empleados para la separación de indoles y sus derivados (como el AIA), utilizan sistemas de gradientes y mezclas de metanol, agua y ácido acético como fase móvil (Sandberg *et al.*, 1987; Guerrero *et al.*, 2001). También se han utilizado otros métodos cromatográficos como la cromatografía en placa fina (Fuentes *et al.*, 1993), cromatografía de gases

(Sandberg *et al.*, 1987) y sistemas cromatográficos acoplados a espectrometría de masas (Prinsen *et al.*, 1997, Numan y Danielson, 2002).

2.6 Las plantas ornamentales

Horticultura ornamental es la rama de la horticultura general que tienen por objeto la explotación comercial de aquellas plantas que se utilizan para el adorno de los sitios donde transcurre la vida del ser humano, ya sea por su belleza de conjunto o por el uso de alguna de sus partes (Sánchez *et al.*, 2004).

Una planta ornamental es aquella que se cultiva y comercializa con la finalidad principal de decoración de interiores. Su importancia ha incrementado con el desarrollo económico de la sociedad y el incremento de las áreas ajardinadas en las ciudades, y con el uso de plantas de exterior e interior por particulares. Actualmente existen más de 3,000 plantas consideradas ornamentales, clasificados como; árboles, arbustos, trepadoras, acuáticas, palmeras, cícadras, bulbosas, tuberosas, crasuláceas, helechos, herbáceas, céspedes, bambúes, plantas de interior y epífitas.

La producción de ornamentales en el mundo se ha incrementado notablemente en volumen y valor de producción; así como en la especialización y comercialización. Para lograr tener éxito en la producción de ornamentales es necesario: producir con calidad, tener productos homogéneos y estandarizados, cumplir con volúmenes de producción, y tener canales de distribución y comercialización (SAGARPA, 2006).

Los países líderes en la producción de flores se caracterizan por tener tecnología para producir, buena organización de productores, realizan un manejo adecuado en cosecha y pos cosecha, altos estándares de calidad y buenos canales de comercialización.

A nivel mundial, Holanda es el principal productor y comercializador de flores, seguido de Colombia, La Unión Europea, Ecuador y Kenia. Otros países como Israel, Italia y Tailandia están tomando importancia.

2.6.1. Producción de plantas ornamentales en México

En México desde tiempos prehispánicos, ya se disfrutaba de la floricultura. Los antiguos escritos, hacen referencia a jardines flotantes en chinampas, los aztecas ya cultivaban la nochebuena (cuetlaxochitl), también hay evidencias de los famosos jardines de Netzahualcoyotl, comparados con los jardines colgantes de Babilonia. La región de Xochimilco, en el Distrito Federal se ha caracterizado desde tiempos antiguos por la producción de flores, hortalizas, plantas medicinales y frutales, actualmente se produce gran cantidad de plantas en maceta.

La diversidad de climas en nuestro país, permite el desarrollo de la producción de gran variedad de plantas de ornato, lo que hace posible la disponibilidad de flores en maceta durante todo el año.

Actualmente la producción de flores ha tomado importancia económica en los últimos años, pues es una alternativa viable y rentable, debido a la demanda nacional e internacional de flores de corte en maceta, palmas y follajes, estimándose que existen 14,400 hectáreas cultivadas con flores, de las cuales el 90% se concentra en cinco estados de la república mexicana. La producción se destina al mercado local y solo un 10% a la exportación (SAGARPA, 2006).

Actualmente el país ocupa el tercer lugar a nivel mundial en superficie dedicada a esta actividad; sin embargo, no figura dentro de las más importantes a nivel mundial.

Se reporta que a nivel nacional la producción de plantas de maceta es de aproximadamente 7 mil hectáreas y se concentra en siete estados: Distrito Federal, Morelos, Michoacán, Puebla, Guerrero, Veracruz y Colima; entidades que distribuyen a nivel nacional las especies que cada estado requiere. Morelos es el primer estado productor nacional de plantas de ornato y de flor en maceta, ocupando el 32%, es decir 2,100 has las cuales son ocupadas con 2,200 viveros distribuidos en toda la entidad (Sánchez *et al.*, 2004).

En vivero se producen principalmente flores de corte como las rosas, gerbera, lillium, alstroemería, aster, anturios y alcatraz; así como plantas en maceta como nochebuena y violetas. Las principales especies producidas en México son: rosa, clavel, gladiolas, crisantemo, gerbera, nube y pompón.

En el Cuadro 2.3 se muestran las especies de plantas de mayor importancia comercial en México.

Cuadro 2 3. Plantas de mayor importancia comercial en México (Leszcyńska-Borys, 1992).

<i>Adiantum spp</i>	<i>Fuchsia spp</i>
<i>Ageratum spp</i>	<i>Geranium spp</i>
<i>Amaranthus spp</i>	<i>Helechos (Rumohra adianthiformis)</i>
<i>Araceae (Dieffembachia, Epipremnum, Monstera, Philodendron, Syngonium)</i>	<i>Helianthus annus</i>
<i>Begonias</i>	<i>Ipomea spp</i>
<i>Bouvardia longiflora</i>	<i>Mirabilis jalapa</i>
<i>Bromilaceae</i>	<i>Orquídeas</i>
<i>Cactaceae</i>	<i>Passiflora spp</i>
<i>Chamaedora spp</i>	<i>Portulaca spp</i>
<i>Crarkia elegans</i>	<i>Rhoeo spp</i>
<i>Cosmos spp</i>	<i>Salvia spp</i>
<i>Dahlia spp</i>	<i>Sprekelia formosissima</i>
<i>Escholtzia californica</i>	<i>Tagetes spp</i>
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	<i>Tigridia spp</i>
<i>Ficus spp</i>	<i>Tropeolum spp</i>
	<i>Pholianthes tuberosa</i>
	<i>Zinnia spp</i>

2.6.2. *Spathiphyllum*

Spathiphyllum spp. conocido como cuna de moisés o Lili de la paz, pertenece a la familia Araceae, que es representada por monocotiledóneas. El género *Spathiphyllum*, comprende 41 especies, la mayoría procedentes de regiones tropicales de América (Mayo *et al.*, 1997).

El *Spathiphyllum*, originario de Colombia, es una planta perenne de tallos cortos, peciolo alargados envueltos en la base por las hojas. Las hojas son lanceoladas, lisas, de color verde oscuro con peciolo largo y nervaciones prominentes en el envés. Presenta una espata blanca o verde sostenida por un peciolo, que encierra a un espádice de color blanco. El pedúnculo de la

inflorescencia es de igual o mayor longitud que el del peciolo; presenta una espata de color verde o blanco. Tiene flores masculinas en la parte media y ápice, y femeninas en la base del espádice, al madurar da lugar a una baya con varias semillas; cada flor se encuentra envuelta en un perigonio de tépalos; la flor masculina tiene seis estambres, la flor femenina presenta un ovario trilobular, cada lóculo con uno o siete óvulos. Una característica propia del género es que el espádice siempre es más corto que la espata (Nicolson, 1968).

La mayoría de las especies del género son neotropicales; sin embargo, tres especies se encuentran en el viejo mundo. En el continente Americano, las especies se encuentran en México, América Central, Perú y la tercera en parte del norte de Suramérica (Bunting, 1960). En el viejo mundo, la distribución incluye las Islas Filipinas, Molucca, Nueva Guinea, el Palau, el nuevo Britian y las islas de Solomón (Nicolson, 1968). *Spathiphyllum* se coloca en la tribu *Spathiphyllae* y la subfamilia *Monsteroideae* (Bogner y Nicolson 1991; Mayo *et al.*, 1997). Los espatifilos se cultivan en jardinería, igual que el anturio (*Anthurium* sp.) y el filodendro (*Monstera* sp.), por la calidad de sus hojas y flores. Al principio de su vida la espata es de color blanco y al final se vuelve verdosa (Figura 2.4).

La producción de plantas ornamentales en maceta bajo invernadero, es una importante actividad que requiere de atención especial a todos y cada uno de los procesos técnicos involucrados en ella.

2.6.3. *Spathiphyllum wallisi*

El *Spathiphyllum wallisii* Regel (1877) es originario de los bosques de Colombia y Venezuela, donde crece en áreas particularmente húmedas.

El nombre del género es la combinación de los términos griegos “spatha” = espata y “phillon” = hoja con referencia a la espata de la inflorescencia que tiene el aspecto de una hoja, la especie ha sido dedicada al botánico, explorador y recolector alemán Gustav Wallis (1830-1878).

Nombres comunes: “peace lily”, “spathe flower”, “white flag”, “white sail”, (inglés); “fleur de lune”, “lis de la paix”, “spathiphyllle de Wallis” (francés); “spatifillo”

(italiano); “lirio-da-paz” (portugués); “cuna de Moisés”, “bandera blanca”, “espatifilo”, “espatifilum” (español); “einblatt” (alemán).



Figura 2.4. *Spathiphyllum wallisi* var. chopin: espatata joven (izquierda); planta completa (centro) y espatata madura (derecha).

2.6.4. Características de *Spathiphyllum*

Especie herbácea siempre-verde rizomatosa, acaule, arbustiva, con hojas oblongo lanceoladas recurvas, color verde oscuro brillante, coriáceas y de bordes ondulados, largas 10-25 cm y anchas 5-10 cm sobre pecíolos de igual o mayor longitud.

Inflorescencia de larga duración sobre un pedúnculo largo hasta 45 cm constituida por una espata blanca, tendiendo al verde con el pasar del tiempo, cóncava y con ápice terminado en punta, largo 6-18 cm y ancha 4-8 cm y por un espádice blanco crema, largo 4-10 cm, las flores, ligeramente perfumadas, son hermafroditas protoginas (el estigma, la parte femenina, es receptiva antes de la maduración de los estambres, lo que impide la autofecundación), los frutos son bayas ovoides verdes larga, miden cerca de 4 mm. Se reproduce por semilla y por división, industrialmente por micropropagación.

Se cultiva al aire libre en las zonas de clima tropical y subtropical húmedo en posición sombreada sobre sustratos muy porosos y orgánicos. En otros climas se cultiva en macetas y como tal es una de las plantas de interior más difundidas

con sus variedades híbridas. Necesita sustratos muy aireados drenados y ricos en sustancias orgánicas y se debe colocar en lugares donde no haya corrientes de aires, luminosos, pero soporta también posiciones sombrías, evitando también ocasionales y breves exposiciones al sol directo que daña fácilmente las hojas. La temperatura se debe mantener superior a los 16°C, óptima alrededor de los 20-24°C, sin bruscas variaciones.

Requiere de riegos frecuentes, evitando encharcamientos que pueden provocar podredumbre, con el sustrato que no debe secarse jamás completamente y la humedad ambiental elevada, incrementada con eventuales nebulizaciones en presencia de aire seco y altas temperaturas, utilizando agua a temperatura ambiente y no calcárea para evitar manchas antiestéticas sobre las hojas.

2.7 Reproducción asexual

La propagación asexual consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de plantas y es posible porque en muchas de estas los órganos vegetativos tienen la capacidad de formar nuevas raíces y las plantas de raíz pueden generar un nuevo tallo.

La propagación vegetativa o asexual se utiliza para producir una planta que posea el mismo genotipo que la planta madre (planta donadora) y esto es posible porque todas las células de una planta poseen la información necesaria y/o suficiente para reproducir la planta entera (Hartmann *et al.*, 1992).

Las raíces adventicias son de dos tipos: raíces preformadas y raíces de herida (inducidas). Las raíces preformadas se forman durante los primeros periodos de desarrollo. Las de herida se desarrollan solo después que la estaca es cortada, por efecto de la herida producida en la preparación de la misma (Davies y Hartmann, 1988).

La propagación asexual produce clones. Esta propagación implica la división auténtica de las células, en la cual, aun una duplicación íntegra del sistema cromosómico y del citoplasma asociadas de la célula progenitora, para formar dos células hijas. Este tipo de reproducción tiene importancia especial

porque la composición genética (genotipo) de la mayoría de los cultivares de los frutales y de las plantas ornamentales más valiosas.

2.6.5. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* (término que literalmente significa en vidrio), incluye muchas técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar, entre otros recursos, material vegetal o animal en condiciones controladas y asépticas (incluyendo protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas). El cultivo *in vitro*, constituye un paso fundamental en la obtención y regeneración de plantas genéticamente modificadas o transgénicas, mediante técnicas de ingeniería genética.

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero fue hasta 1922 cuando se logró el primer experimento que consistió en la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Hoy esta técnica tiene numerosas aplicaciones como son:

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal)
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas).
- Germinación de semillas, etc.

Las células vegetales mantenidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

Organogénesis indirecta, que consiste en una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de

células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos (llamados así porque son estructuras similares a un embrión, pero que no se originaron por unión de gametos),

Organogénesis directa, consiste en una respuesta morfogénica mediante la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos).

El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explanto, por ejemplo el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas.

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales (Barceló *et al.*, 2001; Levitus *et al.*, 2004).

El éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogénica deseada es la composición del medio de cultivo.

En toda propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores del crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta (Levitus *et al.*, 2004).

Cuadro 2.4. Composición de medios de cultivo para células vegetales (adaptación de Muñoz, 2006)

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar in Vitro
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada para la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas reguladores del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citocininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales Otras: giberelinas, ácido abcísico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Ejemplos: extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Usados como soporte. Incluyen agar, azarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

Los pasos necesarios para generar plantas a partir de explantos aislados son:

- **Elección** de la planta y/o tejido donante de explantos.
- **Establecimiento**, que consiste en la desinfección de los explantos (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee.
- **Multiplicación**, para generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- **Enraizamiento**, en la que se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.

- **Aclimatación** de las plántulas obtenidas “*in vitro*” a las condiciones ambientales “*ex vitro*” (suelo o algún sustrato inerte)

El éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el genotipo y las condiciones ambientales.

2.6.6. Ventajas de la micropropagación

- Hace posible incrementar rápidamente nuevos materiales.
- Permite controlar las condiciones ambientales,
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos
- Evita el riesgo de que proliferen agentes patógenos (se realiza en medios esterilizados).
- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.
- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Facilita el transporte del material.

A partir de una planta madre, se obtienen numerosos explantos que, sujetos a condiciones y medios de cultivo adecuados, darán lugar a nuevas plantas iguales o similares a la planta original, permitiendo su multiplicación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del Ácido Indolacético por Fermentación microbiana de la cepa JR-2

Esta etapa fue realizada en el departamento de microbiología de la empresa Biorganix Mexicana S.A de C.V.

Para la ejecución de este estudio, se empleó una cepa identificada como JR2, aislada a partir de la rizósfera de la gramínea *Zea mays*, la cual se eligió por su alta capacidad de producción de ácido indolacético en presencia de Triptófano como precursor.

3.1.1 Activación de la cepa JR2

Se inocularon tubos de ensaye con medio Luria-Bertani (LB) sin triptófano (pH 7.0) mediante un inóculo de la cepa JR2 tomado con un asa bacteriológica contenidas en cajas petri con agar NFB y King B y se incubaron a 32°C por 24 horas a 150 rpm, en una incubadora con agitación (MRC-ORBITAL SHAKER).

Para conocer la concentración de biomasa al final del crecimiento, se midió la densidad óptica (D.O) a λ 540 nm empleando un espectrofotómetro (Genesys 20).

3.1.2 Obtención del Ácido indolacético por fermentación microbiana

Se inocularon 200 μ L de crecimiento microbiano obtenido después de 24 h de incubación a una concentración de 1.048 (2×10^8 cel/mL) de densidad óptica en cuatro matraces de 500 mL conteniendo caldo LB (Tryptona 10g.L⁻¹, NaCl 5.8g.L⁻¹, extracto de levadura 5.0g.L⁻¹) suplementado con triptófano (1g.L⁻¹) a pH 7.5, dando un total de 2 L de caldo. Los matraces fueron incubados a 32°C por 72 h a 150 rpm en una incubadora con agitación (MRC-ORBITAL SHAKER) para el crecimiento de las bacterias y producción de sus metabolitos (Figuras 3.1 y 3.2).



Figura 3. 1 Diagrama de la producción de AIA



Figura 3. 2 Shaker (MRC-ORBITAL).

3.1.3. Recuperación de metabolitos secundarios (fitohormonas)

Para la recuperación del sobrenadante (fase donde se encuentra el metabolito de interés) el caldo de fermentación se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 minutos, empleando una centrifuga LABNET Z-300 (Figuras 3.3 y 3.4)

El sobrenadante se filtró en membranas Whatman 0.45 μ m y posteriormente en 0.2 μ m millipore, empleando un sistema de vacío y recuperando el medio en matraz kitasato (Figura 3.3).

El medio filtrado se conservó a 4°C en condiciones estériles hasta su análisis.

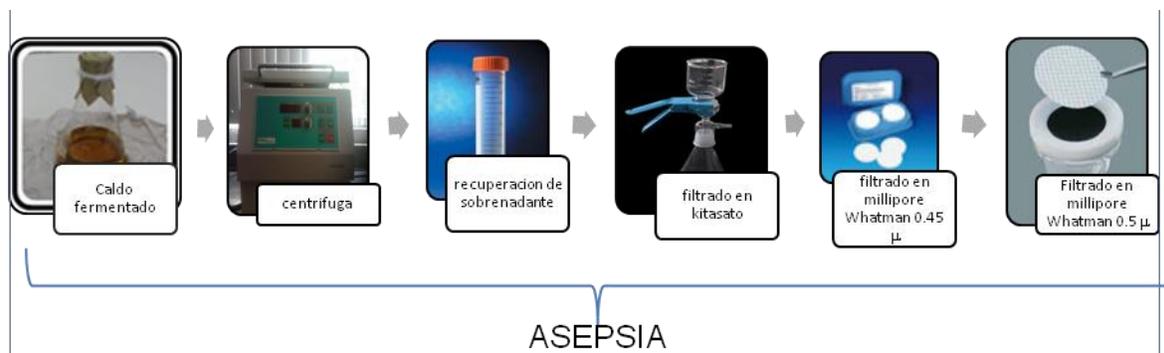


Figura 3.3. Diagrama de la recuperación de AIA



Figura 3. 4 Centrifuga Labnet (Z 300)

3.2 Análisis de la presencia de AIA en caldo por método colorimétrico

3.2.1 Preparación de la curva estándar del reactivo de Salkowski

La determinación de la concentración de AIA producido a partir de la fermentación microbiana se evaluó a través de análisis colorimétrico por espectrofotometría utilizando el reactivo de Salkowski (Glickmann y Deessaux, 1995).

Para ello, en primer lugar se construyó una curva de calibración de un estándar de AIA (Sigma®) a 100 50, 40, 30, 20, 10 y 5 ppm, empleando agua desionizada como disolvente y reactivo de Salkowski como indicador en relación 1:1. La reacción se efectuó en condiciones de oscuridad durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 530 nm empleando un espectrofotómetro (Génesys 20),

utilizando agua desionizada como blanco. Las lecturas se realizaron por triplicado (Figura 3.5).

Para la determinación de AIA en el caldo de fermentación obtenido a partir de la cepa JR2 y fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna, se aplicó el método colorimétrico, empleando el reactivo de Salkowski como indicador, por la reacción de indol-Fe, siguiendo la metodología a continuación detallada.

Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 del caldo de fermentación con agua desionizada (0.9 y 0.990 mL, respectivamente), se tomaron 0.5 mL de cada dilución y se colocaron en tubos de ensaye de 5 mL.

A cada tubo, se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Salkowski (1:1), se dejó reposar durante un periodo de 30 minutos en condiciones de obscuridad.

La lectura se realizó a λ 530nm empleando como blanco agua desionizada, haciendo uso de un espectrofotómetro (Genesys 20) (Figura 3.5)

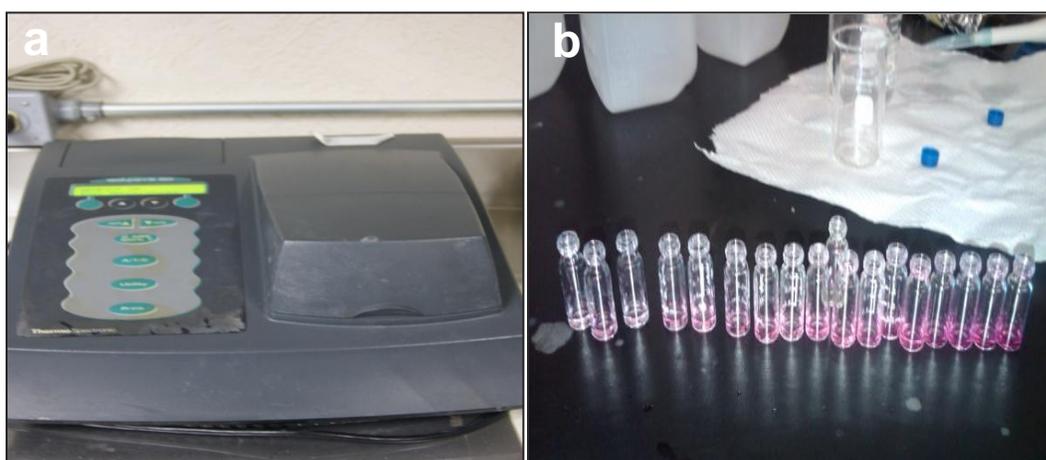


Figura 3.5. Cuantificación de AIA con el reactivo de Salkowski (b) y Espectrofotómetro (Genesys 20) (a).

3.3 Purificación del Ácido Indolacético por cromatografía en columna

Esta etapa de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Revaloración de Residuos de la Unidad Saltillo del Cinvestav.

La purificación del ácido Indolacético se realizó por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria sílica gel 60 (sigma®) previamente acondicionada con una solución de ácido fosfórico 30 mM (pH 4.0). El eluyente

estuvo compuesto por una mezcla de ácido fosfórico y acetonitrilo (74:26 %, v/v) (Sridevic *et al.*, 2008; Mann y Jaworski, 1970) (Figura 3.6).

Las muestras se eluyeron en lotes de 20 mL de caldo de fermentación previamente filtrado en membranas 0.45 μ millipore. Las fracciones se recuperaron en viales oscuros de 1.5 mL las cuales fueron posteriormente analizadas en el Cromatógrafo de líquidos (Agilent 1200) para corroborar la separación de los compuestos en las diferentes fracciones y la purificación del AIA. Las condiciones del análisis por HPLC fueron las siguientes: columna Luna C18 de 150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula. La fase móvil estuvo constituida por 74% de H₃PO₄ 30mM y 26% de acetonitrilo a un flujo isocrático a 0.8 mL/min. El volúmen de inyección fue de 10 μ L y la detección se hizo en el rango del UV a 209 nm (Kelen *et al.*, 2004).

Las fracciones con mayor cantidad de AIA, fueron almacenadas en refrigeración para posteriormente recuperar el AIA contenido en el medio.

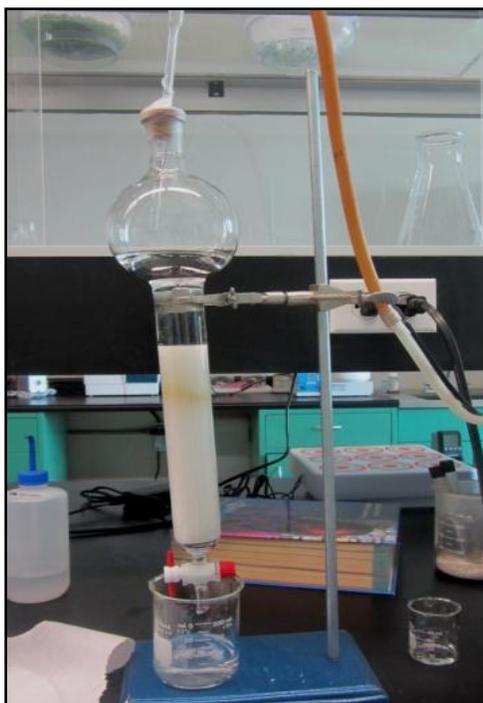


Figura 3. 6. Sistema de purificación de AIA por cromatografía en columna.

3.3.1 Recuperación del Ácido Indolacético

La recuperación del ácido indolacético se llevó a cabo de la siguiente manera: Las fracciones recuperadas en viales después de la separación por cromatografía en columna fueron colocadas en un matraz bola para posteriormente eliminar el solvente y el agua presente en el medio por evaporación bajo vacío a 80°C por 30 min, para lo cual se empleó un rotavapor (BUCHI® R-210/R-215) (Figura 3.7).



Figura 3. 7. Rotavapor (BUCHI® R-210/R-215)

3.3.2 Determinación, cuantificación y verificación de la pureza de AIA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para el análisis y cuantificación del Ácido Indolacético se empleó un Cromatógrafo de líquidos (Agilent 1200) empleando una columna Luna 5m C18 de 150 × 4.60 mm (Phenomenex) Figura 3.8).

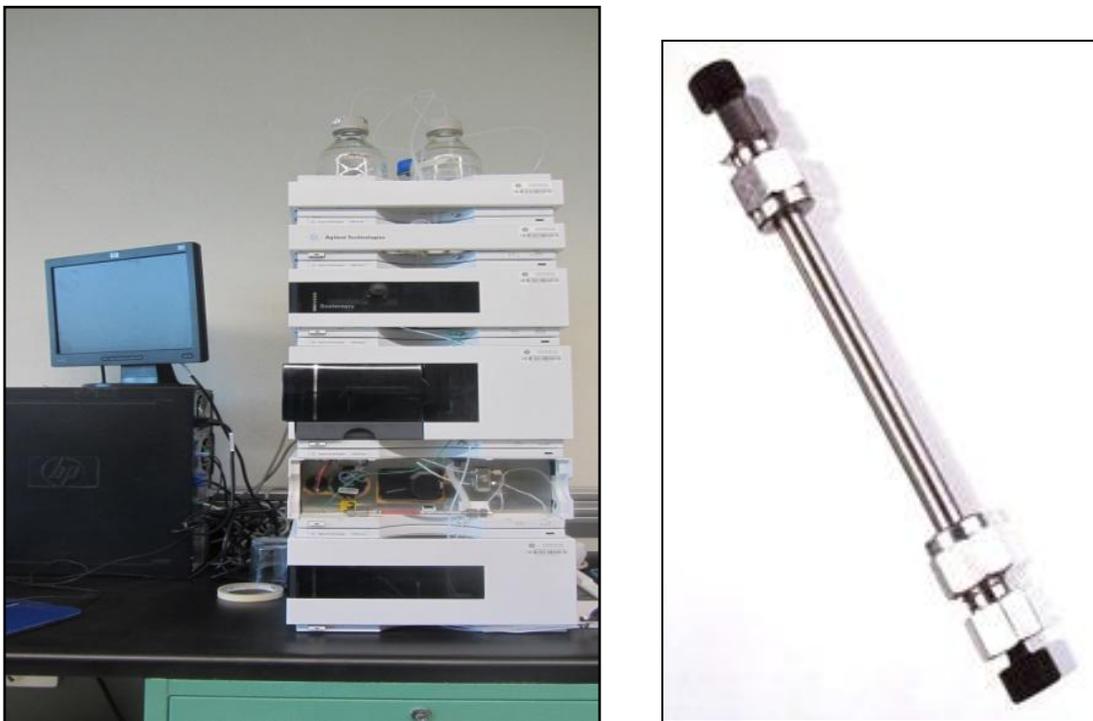


Figura 3.8. Cromatógrafo de Líquidos Agilent Technologies 1200. y columna Luna C-18 (Phenomenex)

3.3.2.1 Condiciones del método

Las condiciones del método para el análisis de fitohormonas consistió en un volumen de inyección de 10 μl , con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, λ 209 nm. Bajo estas condiciones el tiempo de análisis fue de 20 minutos.

3.3.2.2 Fase móvil

La fase móvil consistió en una mezcla de Ácido fosfórico (H_3PO_4) 30 mM ajustado a pH 4.0 con NaOH 1M y Acetonitrilo en proporción 74:26. Los solventes empleados fueron grado analítico.

La solución de Ácido fosfórico 30 mM se preparó colocando 2.05 mL de Ácido fosfórico (H_3PO_4 (Sigma®) al 85% con una densidad de 1.685) en 1 L de agua desionizada, el pH se ajustó a 4.0 empleando una solución de NaOH 1M (Jalmek®).

La fase móvil se preparó mezclando 740 mL de la solución de ácido fosfórico (previamente descrita) con 260 mL de Acetonitrilo (CH_3CN). La mezcla se

filtró al vacío a través de una membrana Whatman de tamaño de poro de 0.45µm. Posteriormente, se pasó a un baño ultrasónico (Branson 3510) durante 10 minutos para asegurar la completa remoción de aire disuelto.



Figura 3. 9 Baño ultrasónico (Branson 3510)

Para determinar la concentración final de AIA del extracto previamente purificado por cromatografía en columna, se construyó una curva de calibración de AIA estándar (Sigma®). Para ello, se prepararon soluciones de AIA a 50, 100, 200, 300 y 500 ppm, empleando para ello agua desionizada y AIA estándar de Sigma Aldrich®. Posteriormente fueron analizados por triplicado en el HPLC, obteniendo así las áreas correspondientes a las diferentes concentraciones y para su posterior cálculo del promedio de las mismas para la obtención del gráfico y la ecuación correspondiente, como se muestra en la Figura 3.10.

Así, una vez que se tuvo la curva de calibración, se procedió al análisis del extracto purificado por cromatografía en columna. De esa manera se determinó la concentración de AIA en el extracto purificado usando la ecuación obtenida de la curva de calibración ($y = 68.599x - 1471.7$).

El AIA purificado fue conservado en refrigeración hasta su uso *in vitro* en plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin.

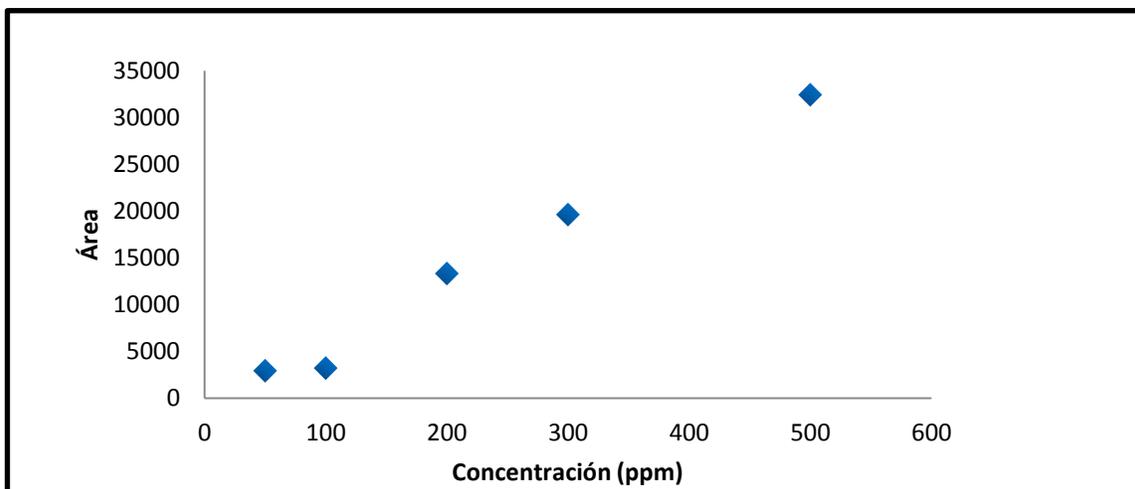


Figura 3. 10. Curva de Calibración Estándar de AIA (Sigma®)

3.4 Ensayos *in vitro* en plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin

Esta etapa de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivos vegetales del INIFAP Campo experimental Saltillo.

Para la realización de los bioensayos se emplearon 1,560 plántulas (ápices) de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin, las cuales fueron trasplantadas en recipientes contenidos con 50 mL de medio Murashige y Skoog (MS) pH 5.7 (Murashige y Skoog, 1962), adicionados con 10 mL del tratamiento bajo estudio (soluciones de AIA-STD, AIA-JR-2 y AIA-Purificado a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg.L⁻¹) (Cuadro 3.1).

3.4.1 Condiciones de los tratamientos

Se utilizaron 20 plántulas por repetición como unidad experimental, evaluando 13 tratamientos. Las condiciones de incubación fueron; 25 °C con 15:9 horas luz: oscuridad de fotoperiodo por 4 semanas (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Condiciones de los diferentes tratamientos

Código	Nombre	Concentración (ppm)	Volúmen mL*	Repeticiones	Total Plántulas
T1	AIA Purificado	0.25	10	6	120
T2	AIA Purificado	0.50	10	6	120
T3	AIA Purificado	1.00	10	6	120
T4	AIA Purificado	2.00	10	6	120
T5	AIA-STD	0.25	10	6	120
T6	AIA-STD	0.50	10	6	120
T7	AIA-STD	1.00	10	6	120
T8	AIA-STD	2.00	10	6	120
T9	AIA -JR2	0.25	10	6	120
T10	AIA -JR2	0.50	10	6	120
T11	AIA -JR2	1.00	10	6	120
T12	AIA -JR2	2.00	10	6	120
T13	Testigo	S/T	10	6	120
Total de plantas					1560

* Volumen de AIA adicionado al medio MS

**S/T: Sin Tratamiento, AIA: Ácido Indolacético, STD: Estándar (Sigma®), AIA-JR2: Ácido Indolacético proveniente directamente de la cepa JR2.

3.4.2 Preparación de los tratamientos

Los tratamientos aplicados fueron preparados como sigue:

- **Tratamiento AIA-JR2**

El caldo de fermentación microbiano obtenido después de 72 h de fermentación, fue filtrado en membranas 0.2 μ milipore empleando una bomba de vacío. A partir de la cuantificación por colorimetría se prepararon diluciones a 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm empleando como soporte agua destilada estéril.

- **AIA-Purificado**

El AIA purificado por cromatografía en columna antes mencionado, fue esterilizado por filtración mediante filtros de membrana 0.2 μ milipore empleando una bomba de vacío. Se prepararon diluciones a 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm utilizando como soporte agua destilada estéril.

- **AIA-STD**

Se preparó AIA Estándar de Sigma ® a diferentes concentraciones 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm usando como soporte agua destilada estéril, seguido de una esterilización a través de filtros de membrana 0.2 μ milipore con ayuda de una bomba de vacío.

Todos los tratamientos (soluciones) se ajustaron a un pH de 5.7 con NaOH y/o H₂SO₄.

10 mL de cada tratamiento fueron añadidos a cada frasco conteniendo 50 mL de medio MS esterilizados previamente y fueron conservados hasta su uso.

3.4.3 Explantos

Para el establecimiento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisii* var chopin; se tomaron 20 explantos según los tratamientos indicados y se les redujo el tamaño a 2 cm de longitud. Para ello se emplearon pinzas, bisturí y navajas estériles, así como, campana de flujo laminar y mecheros (en condiciones asépticas). Estos explantos fueron colocados en frascos de plástico con capacidad de 500 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo constituido por sales de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) ajustando el pH a 5.7. Los medios de cultivo fueron previamente esterilizados en autoclave a 121 °C y 1,1 kg·cm² durante 20 min. En la Figura 3.11 se presentan los pasos para el establecimiento *in vitro* de los explantos que fueron probados con los diferentes tratamientos. En la parte superior (A) se pueden observar plántulas completas de *S. wallisii* var. *chopin*. Posteriormente, se muestra cómo se realizó la extracción de la plántula para ser cortada (B), seguida de la remoción de la raíz (C). Después, en la figura del inciso (D) se observa la remoción de tallo radicular, remoción de hojas laterales y parte del tallo (E), finalmente se puede observar el cultivo de explantos por ápices en agar MS (F) e incubación a 25°C con 15 h luz (G).

Los frascos conteniendo los explantes fueron incubadas a 25 °C, 95% HR, y 15 horas luz.

Las plantas se dejaron crecer durante 8 semanas y posteriormente se efectuaron las mediciones correspondientes.

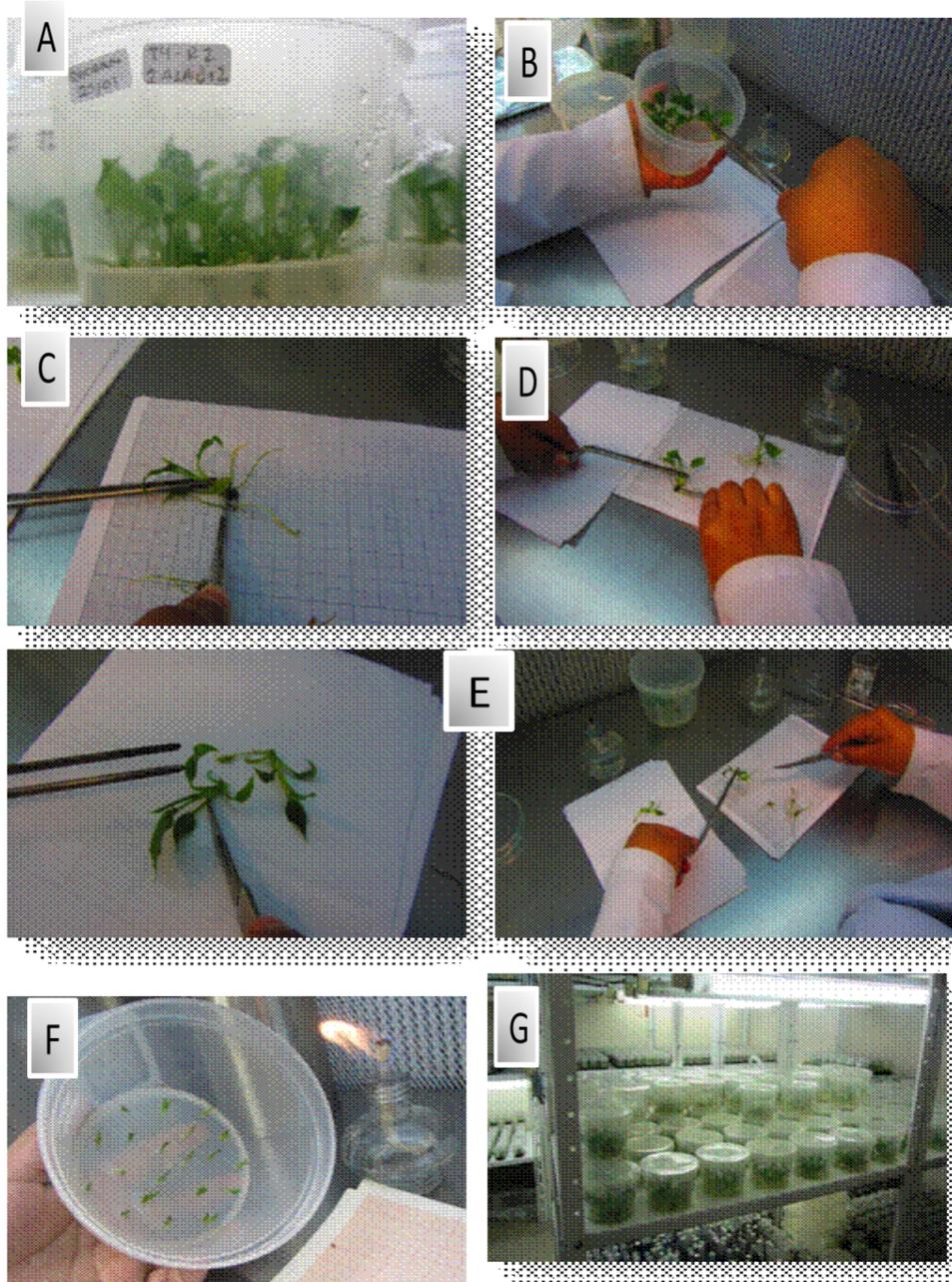


Figura 3. 11. Establecimiento *in vitro* de explantos de *S. wallisii* var. chopin para la aplicación de los tratamientos

3.4.4 Variables evaluadas

Concluido el período de incubación, se evaluó la variable longitud radicular (LR) como el principal parámetro para la determinación del efecto del AIA de acuerdo a lo establecido por Sachdev *et al.*, (2009), además de las variables; altura foliar (AF), número de hojas (NH), número de brotes (NB), número de raíces (NR), peso fresco de raíz (PFR) y peso seco de raíz (PSR) (Figura 3.12).

Donde, La altura foliar (AF) y longitud radicular (LR) se registraron en milímetros (mm) después de ser evaluados en hojas milimétricas estériles. Se registró también el número de brotes (NB) de cada planta evaluada, se contó el número de raíces y hojas producidas por planta y posterior al análisis, las raíces de cada planta fueron pesadas en una balanza analítica (Scientech, SA 802) para posteriormente secarlas durante 72 h a temperatura ambiente. Las raíces secas fueron pesadas nuevamente para el registro de PSR.

Las plántulas de *S. wallisii* var. chopin después de su evaluación, fueron subcultivadas en medio MS para su posterior uso.

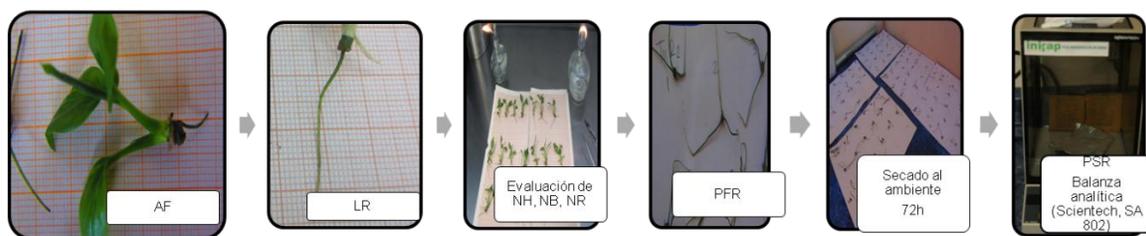


Figura 3. 12. Evaluación de plántulas de *S. wallisii* chopin después de los tratamientos.

3.5 Análisis de datos

Mediante un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 3x4 se evaluaron como factor A los diferentes tipos de AIA (AIA-JR2, AIA-P y AIA-STD) más un testigo (control), como factor B cuatro diferentes niveles de concentración por tipo de AIA utilizado (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm) considerando 6 repeticiones por tratamiento, tomando como repetición un envase con 20 unidades experimentales.

Los datos obtenidos de las variables evaluadas en los bioensayos *in vitro* de *S. wallisii chopin* se analizaron estadísticamente mediante el procedimiento GLM del Sistema de Análisis Estadístico SAS versión 9.0 (2002), empleando el análisis de varianza y los cuadrados medios del error para determinar su respectiva significancia, realizando a sí mismo una prueba de comparación de medias con Tukey ($P \leq 0.05$) para los tratamientos con diferencias significativas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA 1. Producción de AIA por fermentación microbiana usando la cepa JR2 y Cuantificación de AIA en los cultivos microbianos por colorimetría y cromatografía.

La cuantificación del ácido indolacético producido por la cepa JR-2 fue realizado mediante dos técnicas; la técnica colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski y HPLC mediante un Cromatógrafo de Líquidos Agilent 1200 del Cinvestav, unidad Saltillo.

El método colorimétrico utilizando reactivo de Salkowski requirió la construcción de una curva de calibración, a partir de la cual se determinó la concentración de AIA producido en los cultivos microbianos de JR2. La curva de calibración obtenida (Figura 4.1) presenta un coeficiente de correlación >0.97 , a partir de la cual se obtuvo la ecuación siguiente: $x = \frac{y-0.1463}{0.02}$.

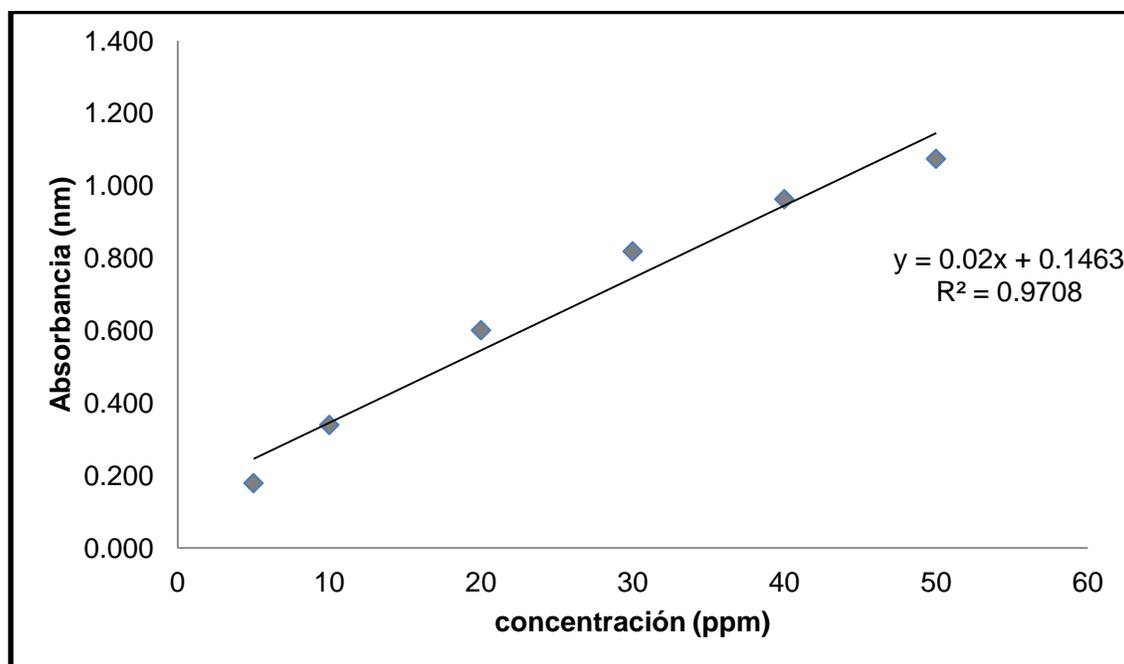


Figura 4.1. Curva de calibración de AIA determinada por método colorimétrico (usando el reactivo de Salkowski).

Cuadro 4 1. Lecturas de absorbancia de la reacción de AIA a diferentes concentraciones con el reactivo Salkowski, a 530 nm.

Concentración (ppm)	Lectura (nm)	Lectura (nm)	Lectura (nm)	Promedio (nm)
5 ppm	0.17	0.182	0.185	0.179
10 ppm	0.332	0.348	0.339	0.340
20 ppm	0.588	0.617	0.598	0.601
30 ppm	0.810	0.840	0.806	0.819
40 ppm	0.938	0.986	0.964	0.963
50 ppm	1.071	1.056	1.095	1.074

De esa manera, usando la ecuación anterior, por el método colorimétrico se determinó que a partir de la acción de la cepa JR2 se obtuvo una producción de 386 mg·L⁻¹ de AIA después de 80 h de fermentación utilizando Triptófano como precursor y una concentración de 1.048 (2x10⁸cel/mL).

Por otra parte, la concentración de AIA determinada por HPLC en base a la ecuación de la curva de calibración obtenida para tal efecto y que ha sido descrita ampliamente en la sección 3.3.2.2 de la parte experimental, la producción de AIA por la cepa JR2 después de 80 h de fermentación fue de 519.24 mgL⁻¹ ($x = \frac{y+1471.7}{68.599}$).

Al comparar ambas técnicas, se pudo observar una variabilidad amplia entre ambos métodos, por lo que, el uso de técnicas cromatográficas como el HPLC en investigación disminuye la incertidumbre al momento de determinar y cuantificar una sustancia de interés (AIA).

Castillo *et al.* (2005) obtuvo concentraciones de 29.0±1.3 mg de AIA por mL de de fermento a partir de *Rhizobium sp.*

Según Garrido *et al.*, (2002), los contenidos normales de AIA de algunos materiales vegetales son del orden de 20 ng por g de peso fresco en esquejes de clavel y 400 ng por gramo de peso fresco en hipocótilos de altramuz (Guerrero *et al.*, 2001). Por tanto, el rendimiento obtenido en los caldos de fermentación con JR2 permite disponer de disoluciones más concentradas de AIA que pueden diluirse o mezclarse con otros principios activos para su aplicación agrícola.

Ona *et al.*, (2005) citaron que el AIA se detecta durante el crecimiento del cultivo bacteriano por la activación del gen *ipdC* que se activa en presencia del triptófano. Anderson *et al.*, (1999) menciona que la producción del AIA, estimulante del crecimiento vegetal en plantas superiores y microorganismos, se realiza por la vía del ácido antranílico (AA) a partir de triptófano, el cual es regulado por el gen de la antranilato sintasa.

4.2. Purificación de AIA por cromatografía en columna (Sólido-Líquido)

De la separación de AIA por cromatografía en columna se recuperaron 14 fracciones a diferentes tiempos (Cuadro 4.2), las cuales fueron analizadas por HPLC bajo las condiciones descritas en la sección de metodología.

Así, se pudo determinar que las fracciones 4 a 8 fueron las que presentaron una mayor recuperación del metabolito AIA (Figura 4.2), obteniéndose áreas de 1960.3 hasta 7170.5 (500.029 a 1250.87 mgL⁻¹ AIA).

Cuadro 4.2. Fracciones recuperadas a diferentes tiempos de elución del caldo fermentado por JR-2) con H₃PO₄ + ACN en cromatografía en columna.

Fracción	Tiempo (min)	Área AIA	Área Triptófano
1	5	1482.1	2140.2
2	5.8	1735.8	2326
4	6.4	1960.3	2397.3
6	7.0	2384.6	2576.6
7	7.4	3205.5	2979.5
8	8.0	7170.5	358.6
9	9.0	1428.7	2140.2
14	12.0	549.9	2782.5

*Se registran solo los datos que mostraron mayor variabilidad durante la purificación en cromatografía en columna.

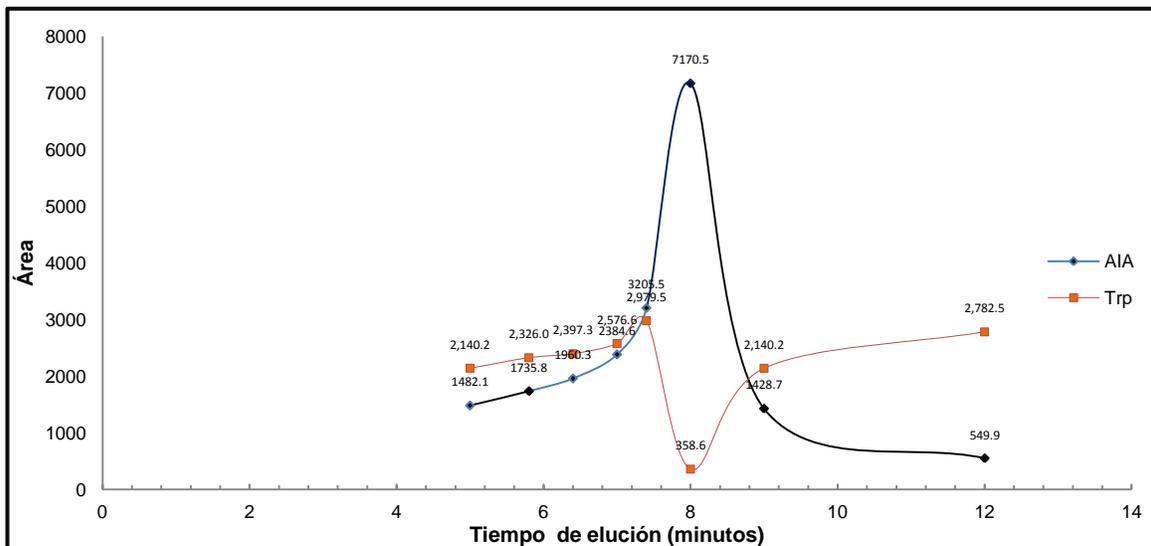


Figura 4. 2. Separación del metabolito AIA en función del tiempo en el caldo de fermentación de JR-2, por cromatografía en columna (en las distintas fracciones recuperadas).

El comportamiento de la concentración de AIA en función del tiempo de elución en cromatografía en columna empacado con sílica gel y eluido con una mezcla de H_3PO_4 y C_2H_3N (74:26%) se observa en la figura 4.2.

Donde, las concentraciones mayores de AIA producidas por JR2, se recuperaron después de 8 y hasta 9 minutos de elución, mientras que el Triptófano en ese lapso de tiempo mostró un comportamiento inverso, al detectarse la menor concentración, mismo que se elevó a partir de los 9 minutos. Este comportamiento durante la purificación se atribuye a la diferencia en pesos moleculares (PM) de los compuestos, al ser el Triptófano más pesado que el AIA (175,184 g/mol; 243.18), con un PM de 204,225 g.mol⁻¹, al ser eluido a través de una matriz de sílica gel, existe una diferencia en el tiempo de retención entre las moléculas, lo cual también está influido por la gravedad y la polaridad de los compuestos.

Hernández *et al.*, (2008) cita que la velocidad de degradación del triptófano varía de acuerdo al tiempo de fermentación. En un estudio realizado sobre la degradación del triptófano y la producción de AIA, observó que la degradación del triptófano fue mayor entre las 24 y 48 horas de incubación detectando cantidades de 190 a 161 ppm, reduciéndose después de las 48 h.

Tiempo de Retención (T_R)

Para corroborar el tiempo de retención (T_R) del AIA, se empleó un estándar de AIA de origen sintético (Sigma®), empleando las condiciones descritas el apartado de Metodología, obteniendo que el tiempo de retención se encuentra alrededor de los 9 minutos (Figura 4.3).

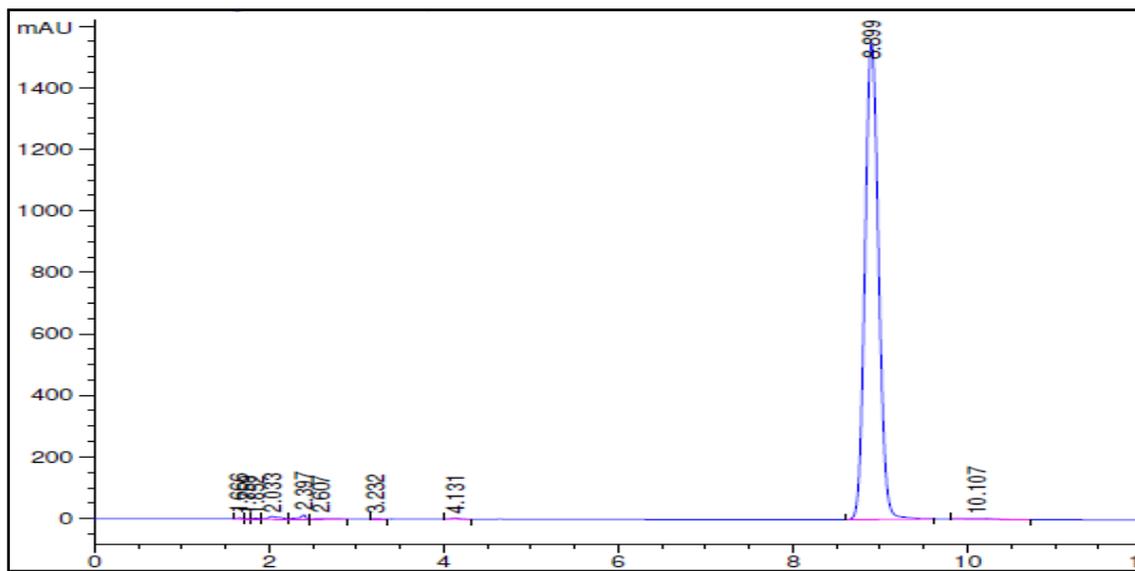


Figura 4. 3. Cromatograma del estándar de AIA (Sigma®).

El tiempo de retención para el metabolito AIA empleando el método FITOHORM-02 interno del CINVESTAV unidad saltillo, fue de entre 7 y 9 minutos, mientras que Hernández *et al.*, (2008), lo registró a 3.8 minutos empleando las mismas condiciones.

El aminoácido triptófano exhibió un tiempo de retención alrededor de los 2 minutos, bajo las mismas condiciones de análisis (Figura 4.4)

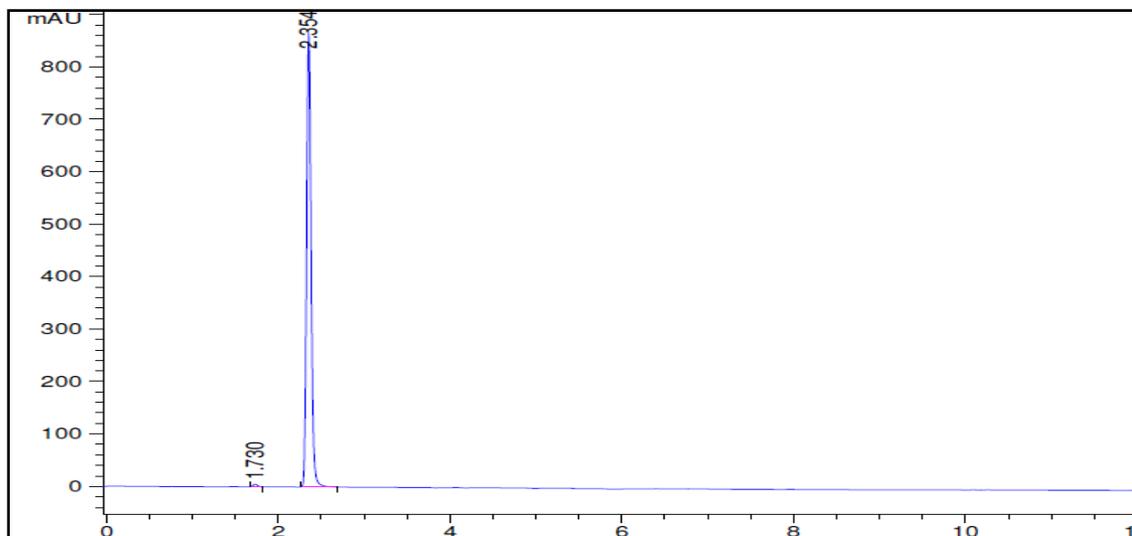


Figura 4. 4. Cromatograma de un estándar de Triptófano.

En las Figuras 4.5 a la 4.9 se observa la evolución de la purificación en función del tiempo de cromatografía en columna. Así, la Figura 4.5, correspondiente a la fracción 1 evidencia la casi inexistencia de la señal en el tiempo de retención de 9 minutos indicando que esa fracción no contiene aún AIA.

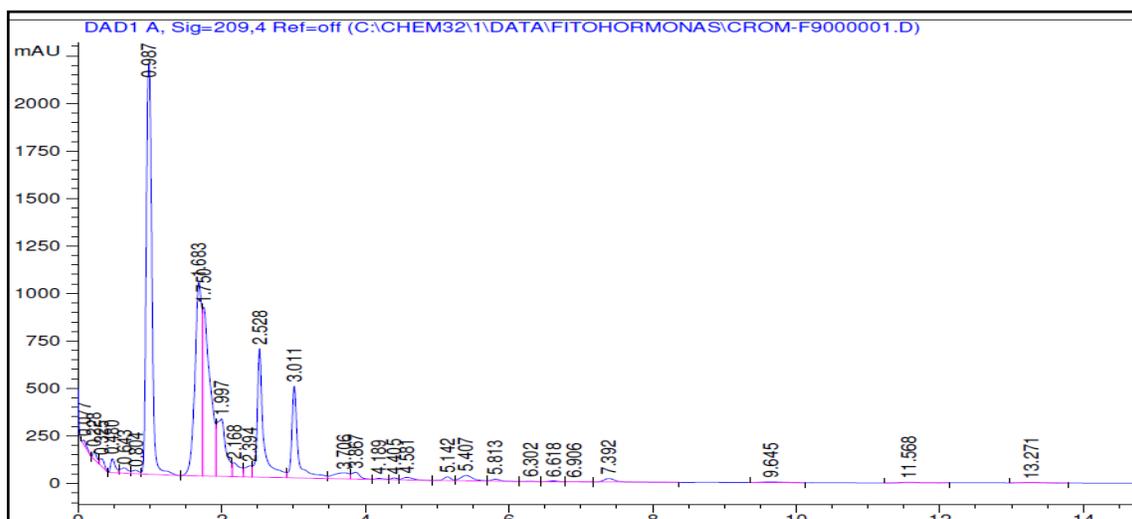


Figura 4. 5. Cromatograma de la fracción 1.

Por otro lado, las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8, correspondientes a las fracciones 4, 7 y 9, respectivamente, dejan demostrado que la recuperación de AIA fue más marcada en esas fracciones. Quedando determinado que las fracciones obtenidas

en el lapso de tiempo de elución de 6.4 a 8.0 minutos es el adecuado para la máxima recuperación de AIA.

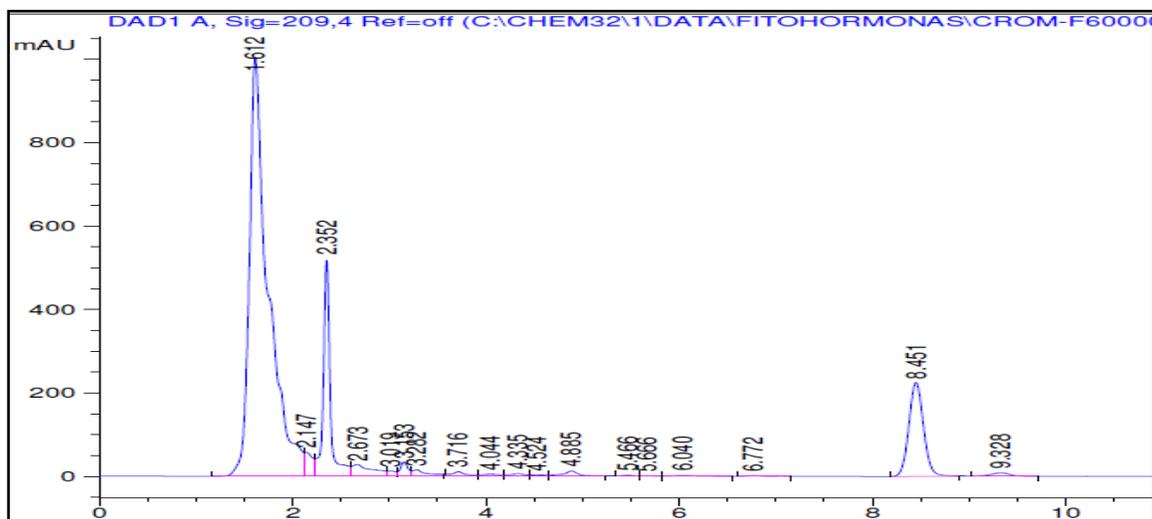


Figura 4. 6. Cromatograma de la fracción 4.

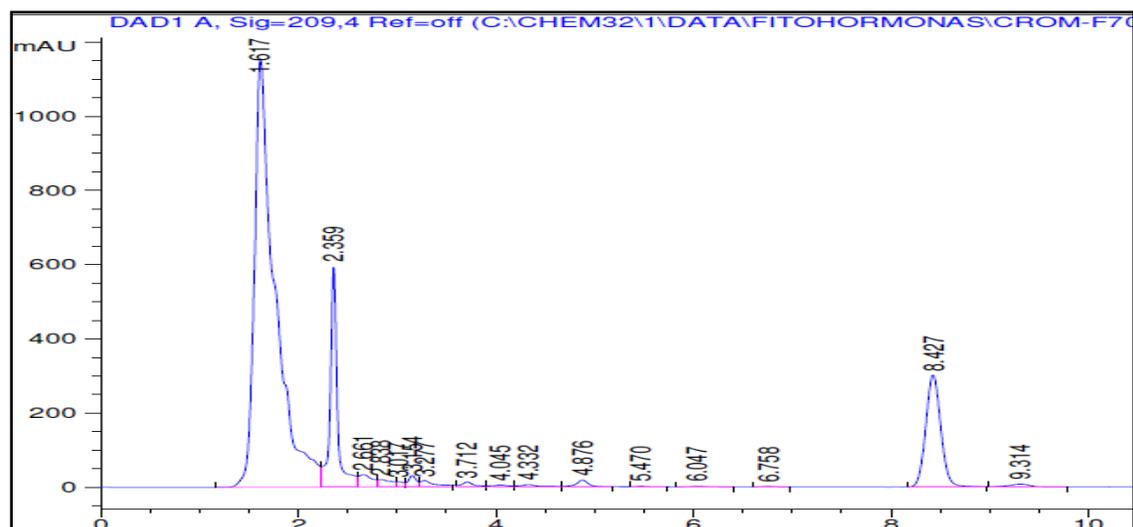


Figura 4. 7. Cromatograma de la fracción 7.

Las fracciones posteriores a la 9 ya no contenían AIA o si lo contenían, eran concentraciones mínimas, por lo que para las pruebas de actividad biológica (bioensayos) posteriores se procedió a repetir el mismo ensayo de purificación cromatográfica a fin de recuperar suficiente AIA purificado el cual sería

posteriormente empleado en las pruebas de crecimiento vegetal de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin.

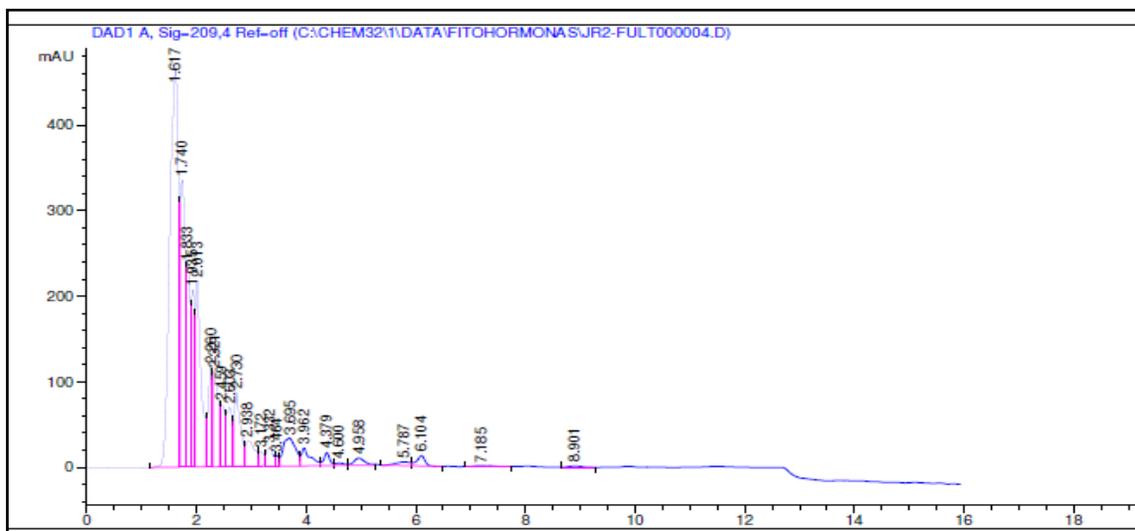


Figura 4. 8. Cromatograma de la fracción 9.

4.3. Determinación de la Pureza del AIA Purificado por Cromatografía en Columna

La determinación de la pureza del AIA recuperado de las fracciones 4 a 8 después de varias eluciones del fermento a través de la columna de cromatografía, fue de 46.7 %.

Ocupando el Triptófano un 8.62% de las áreas totales, correspondiente al pico No. 4 mostrado en la figura 4.9, con un TR de 2.349 min., pudiendo corresponder los picos 6 a 10 al mismo compuesto (por el tipo de compuesto arrojado en el reporte).

De los cuales el 42.58% de las áreas están comprendidas en los primeros tres picos correspondientes a TR de 1.636, 1.751, y 1.798, que por los TR mostrados pudiesen ser residuos de los compuestos empleados para eluir el extracto (fermento de JR2) a través de la columna durante la separación del AIA.

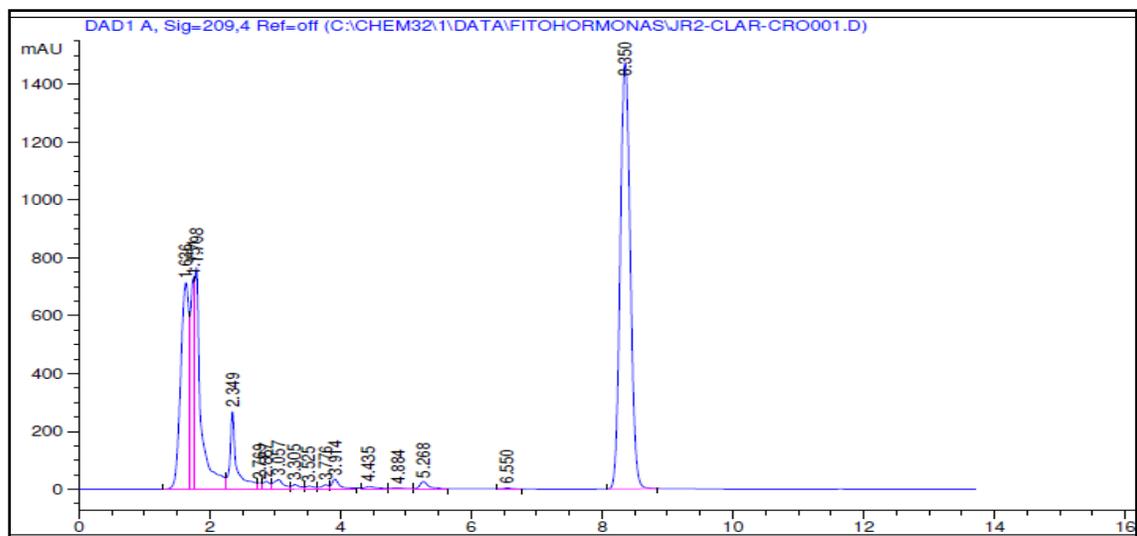


Figura 4. 9. Cromatograma del concentrado de AIA después del proceso de purificación en cromatografía en columna.

En la figura 4.9 se observa que las áreas están comprendidas en 5 picos de los cuales, los primeros 3 pudiesen corresponder a residuos de compuestos empleados durante la separación de AIA, así como aquellas sales utilizadas en el medio LB para el crecimiento de JR-2, el cuarto corresponde al triptófano y el 5 al AIA con un T_R de 8.35 minutos., si se integraran los picos, el cromatograma quedaría reducido a tres picos principales ocupando los compuestos anteriormente mencionados.

4.4. Determinación de la concentración del AIA Purificado por Cromatografía en Columna

La concentración del AIA en el extracto purificado fue de 810.032 mgL^{-1} empleando la ecuación $Y=(68.599X-1471.7)/68.599$, donde Y es el área arrojado por el cromatograma en el HPLC, correspondiente a 54095.7 mAU.

La purificación de AIA a partir del extracto fermentado de JR-2 empleando cromatografía en columna resultó en solo un 46.7%, por lo que se sugiere agregar una etapa más al proceso, en el cual se involucre la extracción del metabolito AIA separándose del resto de los componentes, ya sea mediante el empleo de una sustancia afín o bien una purificación empleando directamente HPLC para la separación del AIA.

4.5 ETAPA 3. Ensayos *in vitro* en plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin

Mediante un análisis completamente al azar con arreglo factorial se determinó que existen diferencias significativas entre los diferentes tipos y concentraciones de AIA utilizados, siendo el caldo directamente obtenido a partir de la fermentación de JR2 del que se obtuvo para la mayoría de las variables los mayores resultados en; altura foliar (AF) (T9), número de hojas (NH) (T9 y T11), número de brotes (NB) (T9 y T11), peso fresco de raíz (PFR) (T11), número de raíces (NR) (T11) y peso seco de raíz (PSR) (T10) (Figuras 4.12, 4.13). Los tratamientos con AIA purificado (AIA-P) mostraron un comportamiento similar a los obtenidos con AIA-JR2 para las variables; AF (T3) y NH (T1, T2, y T3). Mientras que los tratamientos con AIA comercial (Sigma®) registraron promedios menores en las variables referidas, siendo estadísticamente superiores solo con la variable LR (T5 T6 y T8) (Figuras 4.10 b y 4.16 a y b).

Existieron diferencias entre tipos de AIA utilizado, el obtenido directamente de la cepa JR2, registró la mejor respuesta en el desarrollo foliar *in vitro* de plantas de *S. wallisii* var. chopin para las variables AF, NH y NB, con valores de 38.78 mm, 4.98 hojas/planta y 0.66 brotes/planta, respectivamente (Figura 4.10).

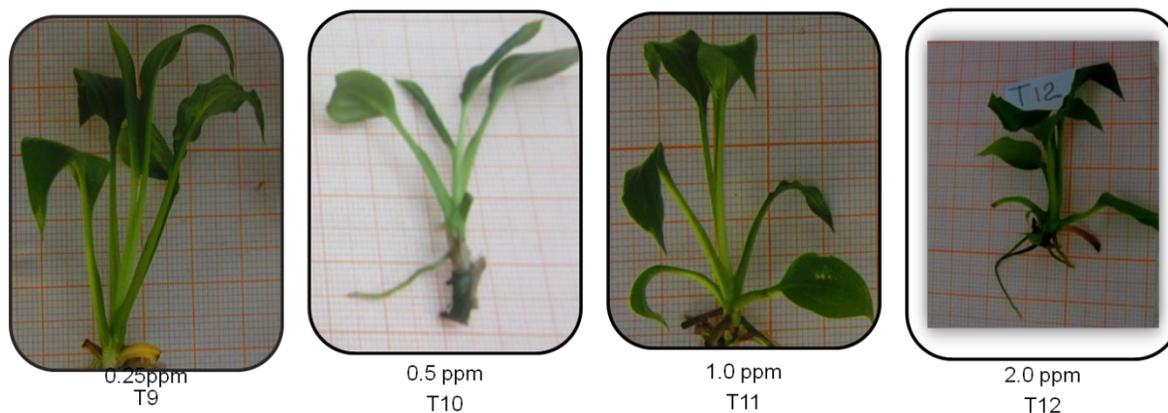


Figura 4. 10. Plántulas de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin (AF y NH) provenientes de los tratamientos adicionados con AIA-JR2.

Las mejores respuestas para las variables; NR, PFR y PSR en el desarrollo radicular fueron registradas en vitroplantas de *S. wallisii* var. chopin al adicionar AIA-JR2, registrando valores de 3.04 raíces/planta, 38.54 mg y 5.45 mg, respectivamente. Sin embargo, el mismo efecto no fue reflejado para la variable LR (Figura 4.11).

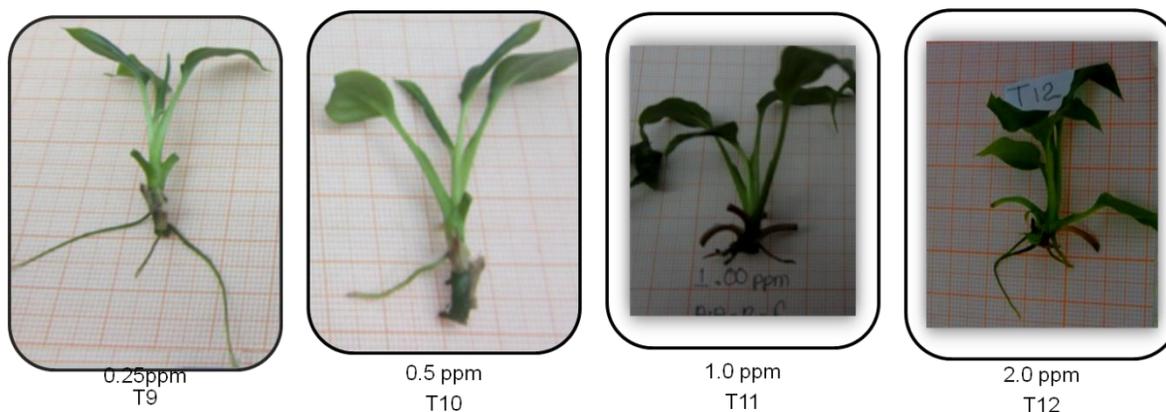


Figura 4. 11. Plántulas de *Spathiphyllum chopin* (NR) provenientes de los tratamientos adicionados con AIA-JR2.

El AIA-STD de origen sintético (Sigma®), registró las mejores respuestas para el desarrollo radicular, mediante la elongación de raíces (LR) con valores de 33.46 mm (Figura 4.12).

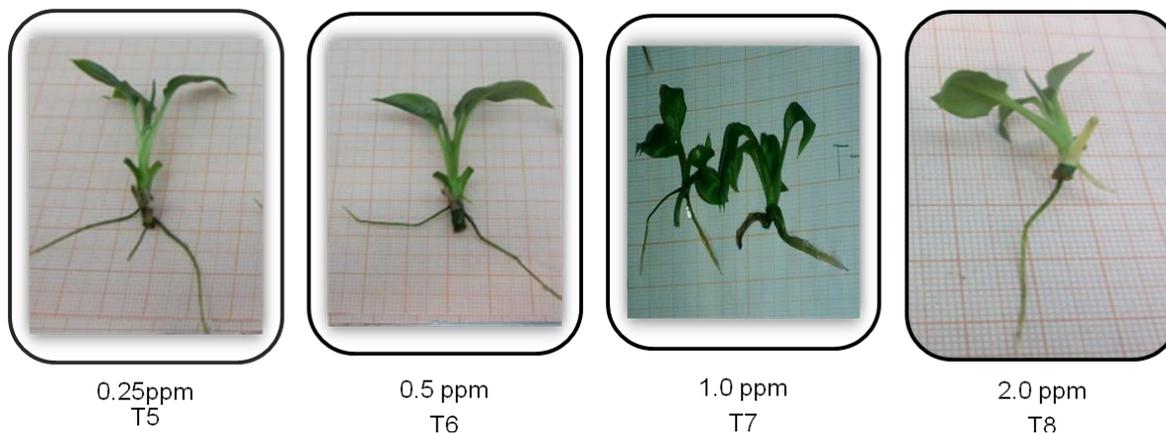


Figura 4. 12. Plántulas de *Spathiphyllum chopin* provenientes de los tratamientos adicionados con AIA-STD (Sigma®)

El AIA-P purificado parcialmente, registró respuesta positiva para el desarrollo foliar, registrando valores mayores (39.16 mm y 4.95 hojas) en las variables AF y NH. Sin embargo, registró los menores valores para el desarrollo radicular en las variables LR, NR, PFR y PSR (Figura 4.13).

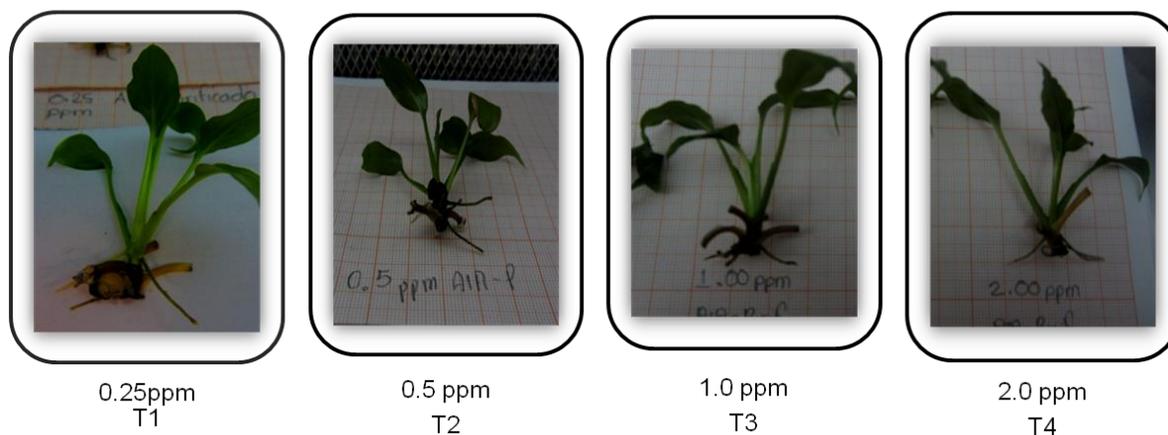


Figura 4. 13. Plántulas de *Spathiphyllum chopin* provenientes de los tratamientos adicionados con AIA-P

SECCIÓN FOLIAR

4.6 Altura foliar

Con esta variable existieron diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), siendo los tratamientos con 1.0 ppm del AIA purificado (AIA-P) (T3) y el tratamiento con 0.25 ppm del AIA proveniente de la cepa JR2 (T9) los que registraron una altura foliar (AF) de hasta 39.16 ± 1.376 mm superando al resto de los tratamientos evaluados. En orden de importancia le siguieron los tratamientos con 1.0 ppm de AIA JR2 (T11), 0.25 ppm (T1) y 0.50 ppm (T2) de AIA purificado junto con el tratamiento con 1.0 ppm del AIA proveniente de la cepa JR2 (T10), mismos que fueron estadísticamente iguales registrando una AF máxima de 37.22 mm. Los tratamientos a los que se les adicionó la misma concentración de AIA en una dosis de 2.0 ppm tanto de AIA Purificado como de AIA-Estándar de Sigma® (AIA-STD (Sigma®)) fueron estadísticamente iguales registrando una AF de hasta 35.87 mm. El resto de los tratamientos que corresponden a la dosis de 0.25 hasta 1.0 ppm de AIA-STD (Sigma®), así como las concentraciones de 0.5 y 2.0 ppm de

la cepa de JR2 fueron junto con el testigo los que registraron la menor AF con 30.29 mm, existiendo una diferencia entre estos y el tratamiento T3 del 22.65% al que se le adicionó 1.0 ppm de AIA-Purificado (Figura 4.10 a y Cuadro 4.3).

Los resultados registrados, demuestran que cantidades mínimas desde 0.25 ppm de AIA provenientes de la cepa JR2 y 1.0 ppm de AIA producido por la misma cepa después de un proceso de purificación parcial, ejercen un efecto positivo en el desarrollo foliar de la planta, mediante la elongación celular provocando el crecimiento foliar de las plantas.

Experimentos realizados con plántulas de gramíneas y otros tejidos revelan que la respuesta del crecimiento varía con la concentración de auxina, aumentando el crecimiento con la concentración de auxina hasta alcanzar un pico máximo y a continuación se ve disminuido, esto debido a que niveles elevados de auxina promueven la síntesis de etileno. Murray, (2005) menciona que la concentración óptima de auxina para la elongación celular es superior para las células del vástago que para las de la raíz y que la concentración disminuye con el transporte por la acción de una enzima denominada AIA-oxidasa, que destruye la auxina.

Arteca, (1996) menciona que la dominancia apical está relacionada con el transporte de auxinas por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto apical de la planta hacia su base y que este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo la dominancia apical.

Es importante comprender los niveles endógenos de AIA en la planta. Existe un pool, o varios, de AIA en la planta. El tamaño de estos pools depende de las “entradas” y “salidas” que en ellos se produzcan y de la velocidad de uso del AIA en los procesos promotores del crecimiento.

Las condiciones medioambientales externas determinan la velocidad con que se utiliza el AIA, ya que la velocidad de crecimiento de la planta se modifica de acuerdo a su medio ambiente particular.

4.7 Número de hojas

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que las concentraciones de 0.25 y 1.0 ppm de AIA JR2 (T9 y T11) y 0.25, 0.5 y 1.0 ppm de AIA-P (T1, T2 y T3) fueron estadísticamente iguales registrando un número de hojas (NH) máximo de 4.98 hojas/planta. Teniendo estas concentraciones el mismo efecto tanto con la cepa AIA JR2 como con el AIA-P, superando al resto de los tratamientos evaluados, mostrando que ambos productos tienen con esta variable la misma respuesta (Figuras 4.10, 4.13 y 4.14).

En orden de importancia de siguieron los tratamientos con 0.25 ppm de AIA-STD (Sigma) (T5) y el control (T13) que fueron estadísticamente iguales registrando valores de hasta 4.59 hojas/planta en promedio (Figuras 4.12 y 4.14).

Los tratamientos 1.0 y 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T7 y T8) junto con el tratamiento 2.0 ppm de AIA-P fueron estadísticamente iguales registrando vitroplantas con hasta 4.50 hojas por planta.

Los menores valores en número de hojas (NH) se registraron con los tratamientos adicionados con 0.5 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T6) junto con los tratamientos adicionados con 0.5 y 2.0 ppm de AIA proveniente de la cepa JR2 (T10 y T12). Registrando hasta 4.38 hojas/planta, mostrando una diferencia del 12.45% con respecto al tratamiento con 1.0 ppm de AIA-JR2 (T11) del que se obtuvo la mayor respuesta (Figura 4.14 b y Cuadro 4.3).

Los tratamientos que arrojaron valores máximos para NH fueron aquellos correspondientes a 0.25 hasta 1.0 ppm de AIA-P (T1-T3) así como 0.25 y 1.0 ppm de AIA JR2 (T9 y T11), siendo estos AIA de origen biológico (orgánico), con valores de hasta 4.95 ± 0.006 hojas, registrando una diferencia del 7.87% respecto al control. Los valores más bajos fueron experimentados en las plantas sometidas a los tratamientos con 2.0 ppm de AIA tanto de JR2, purificado, como del sintético, registrando valores desde 4.381 ± 0.305 hojas por planta, con una diferencia del 3.94% respecto al control y 11.51% respecto al tratamiento T11.

Salisbury *et al.*, (1994) menciona que las auxinas actúan sobre la elongación y división celular jugando un papel fundamental en el crecimiento de órganos y frutos.

4.8 Número de brotes

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que la concentración con 0.25 ppm y 1.0 ppm de AIA-JR2 (T9 y T11) mostraron los mejores resultados alcanzando valores de hasta 0.66 brotes por planta, superando al resto de los tratamientos evaluados.

En orden de importancia le siguieron los tratamientos con 0.5 y 2.0 ppm de AIA-JR2 (T10 y T12) junto con el tratamiento con 2.0 ppm AIA-P (T5) y 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T4), mismos que fueron estadísticamente iguales registrando hasta 0.33 brotes/planta. Estos resultados muestran que el AIA-JR2, el AIA-P y el AIA-STD tienen el mismo efecto en el número de brotes con la misma concentración (2.0 ppm).

Los tratamientos 0.5 y 1.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T6 y T7), así como el tratamiento con 0.1 ppm de AIA-P (T3) fueron estadísticamente iguales registrando hasta 0.28 brotes/planta, mostrando que tanto AIA-STD (Sigma®) como el AIA-P tienen el mismo efecto en la misma concentración.

El tratamiento control con 0.0 ppm (T13) registró en menor número de brotes (NB) con 0.18 brotes/planta resultando estadísticamente igual a tratamiento con 0.5 ppm de AIA-P (T2), mostrando que la concentración del AIA-P purificado tiene el mismo efecto que el control donde no se aplicó auxina, existiendo una diferencia del 83% con respecto al tratamiento con 0.25 ppm de AIA-JR2 del que se obtuvo la mayor respuesta con esta variable (Figura 4.14 c y Cuadro 4.3)

Las plantas que registraron mayor número de brotes fueron las expuestas a los tratamientos con 0.25 y 1.0 ppm de AIA-JR2 con 0.661 ± 0.133 brotes, mientras que el control así como los tratamientos con 0.25 y 0.5 ppm de AIA-P los que mostraron los valores mínimos para esta variable, con medias de hasta 0.181 ± 0.063 brotes, registrando una diferencia de 72.61% respecto al tratamiento con 0.25 ppm de AIA-JR2.

El flujo de auxinas reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo manteniendo así la dominancia apical (Arteca, 1996), esto justifica los resultados obtenidos en este estudio, en donde para todas las concentraciones

evaluadas en los diferentes tratamientos se registró un NB mínimo que no refleja un patrón definido.

En estudios realizados por Chandanie *et al.*, (2005), para ver la interacción de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) por su efecto sobre la colonización de la raíz y el crecimiento de plantas de pepino; tuvo como resultado que las plantas inoculadas con micorrizas aumentó significativamente el peso seco de los brotes y la mejora del crecimiento de las plantas.

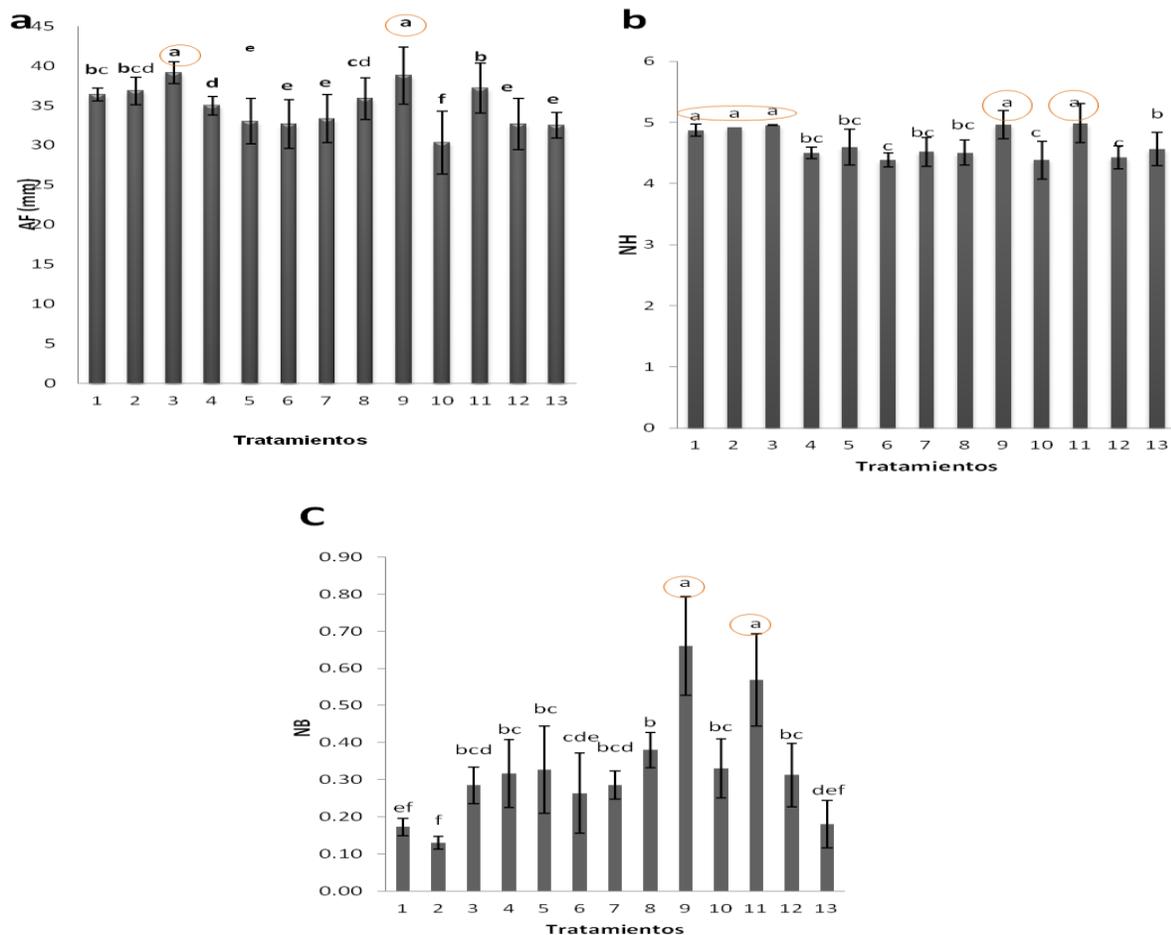


Figura 4.14. Efecto de los diferentes tipos de AIA en la zona foliar de *S. chopin in vitro*. a) Altura foliar (AF), b) Número de hojas (NH), y c) Número de Brotes (NB) de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin *in vitro* después de 4 semanas de crecimiento en agar MS a 25°C en condiciones asépticas sometidas a diferentes concentraciones de AIA provenientes de diferentes fuentes (T1=0.25 ppm AIA-P, T2=0.5 ppm AIA-P, T3=1.0 ppm AIA-P, T4=2.0 ppm AIA-P, T5=0.25 ppm AIA-STD (Sigma), T6=0.5 ppm AIA-STD (Sigma), T7=1.0 ppm AIA-STD (Sigma), T8=2.0 ppm AIA-STD (Sigma), T9=0.25 ppm AIA-JR2, T10=0.5 ppm AIA-JR2, T11=1.0 ppm AIA-JR2, T12=2.0 ppm AIA-JR2, T13=Testigo(s/t)). *Los valores de la media \pm SD, n=6 repeticiones. ** Los valores encerrados presentan los mejores resultados para las variables evaluadas y las barras que presentan diferente letra son estadísticamente diferentes con $P < 0.05$ en la prueba de Tukey.

4.9 Longitud radicular

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que la concentración con 0.25, 0.5 y 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T5, T6 y T8), mostraron los mejores resultados presentando diferencia significativa ($p < 0.05$) para esta variable, alcanzando valores de hasta 33.46 ± 3.836 mm de longitud (Figura 4.12).

En orden de importancia continuaron tanto el tratamiento con 1.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T7) así como el control (T13), mostrando éstos, valores de hasta 32.71 ± 1.963 mm de LR por planta.

Con una dosis de 0.25, 1.0 y hasta 2.0 ppm de AIA-JR2 (T9, T11 y T12) se obtuvieron valores de hasta 30.30 ± 3.528 mm de LR por planta mostrando una diferencia de solo el 10.20% respecto de los mejores tratamientos (T8, T6 y T5), siendo éstos a la vez estadísticamente iguales al control

El tratamiento con 0.5 ppm AIA-JR2 (T10), así como concentraciones desde 0.25 hasta 2.0 ppm de AIA-P (T1, T2, T3, y T4) mostraron los menores valores de LR con una diferencia del 61.8% respecto al tratamiento con 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T8) y 58.4% de diferencia respecto al control (Figura 4.15 b y Cuadro 4.3).

Salisbury *et al.*, (1994) menciona que las auxinas promueven el desarrollo radicular estimulando la iniciación de la raíz en esquejes y su diferenciación, lo cual es evidente con la aplicación exógena de auxinas, donde se ha observado que la elongación de la raíz se ve disminuida cuando se aplica en bajas concentraciones. Esto difiere totalmente de los resultados aquí obtenidos, pues al aplicar concentraciones desde 0.25 ppm de AIA-STD se registraron los mayores valores de LR, esta respuesta también depende del genotipo, en donde la variedad (*S. wallisii* var. chopin) responde a bajas concentraciones.

Jordan y Cassaretto, (2006) mencionan que el AIA se sintetiza principalmente en el ápice de las yemas apicales, y se transporta polarmente hacia la raíz a través de células parenquimáticas asociadas al tejido vascular, esto está ligado a la respuesta exhibida por el tratamiento testigo, que aun sin la adición exógena de AIA, registró valores de LR de 32.71 mm, lo cual es atribuido a

las reservas de auxinas en los ápices, debido a una acumulación de auxinas como mecanismo genotípico natural (dominancia apical). Este comportamiento también puede estar influenciado por la presencia de azúcares y la regulación hormonal de fitohormonas en las plántulas de *Spathiphyllum*.

Las auxinas intervienen básicamente en dos estados del enraizamiento: El primero, en el cual se forman los meristemos radiculares, estado inicial de su crecimiento. Este a su vez se puede dividir en un estado activo de acción de las auxinas en el cual debe haber una continua presencia de auxinas, pudiendo estas venir de los brotes terminales o laterales o de una aplicación externa, y una segunda etapa, la cual se puede denominar como de auxinas inactivas, ya que estas están presentes en la raíz cuatro días mas pero no tienen ningún efecto adverso en su formación. En la segunda etapa se da la elongación de los primordios radicales, en esta, la nueva raíz atraviesa la corteza hasta emerger de la epidermis del tallo, para esto un sistema vascular ya se formó en la nueva raíz y se ha fusionado a los tejidos vasculares del tallo, una vez llegado a éste punto ya no hay mayor respuesta a las auxinas.

4.10 Número de Raíces

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que la concentración con 1.0 ppm de AIA-JR2 (T11) mostró diferencia estadística respecto a las plantas provenientes del resto de los tratamientos, registrando un NR superior a 3.04 raíces por planta, seguidas del tratamiento con 0.25 ppm de AIA-JR2 (T9) con valores de 2.79 raíces por planta, presentando una diferencia del 8.04%. Los tratamientos con 0.25 hasta 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T5, T6, T7, y T8) presentaron valores desde 2.52 raíces por planta (Figura 4.16), le siguieron en orden de importancia los tratamientos con 0.5 y 2.0 ppm de AIA-JR2 (T10 y T12) así como el control (T13) registrando valores inferiores (2.33 raíces/por planta) mostrando una diferencia del 23.26% con respecto al tratamiento T11 (Figuras 4.11, 4.12 y 4.13).

Las plantas sometidas a los tratamientos con 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de AIA-P (T1, T2, T3 y T4), arrojaron los valores mínimos en NR con una media de

1.61 raíces/planta con una diferencia de 46.91% respecto al T11 (3.044 raíces/planta) así como un 35.35% con respecto al tratamiento control (T13) (Figuras 4.13, 4.15 d y Cuadro 4.3).

Dentro de los principales procesos orgánicos que controla las auxinas están: la iniciación de la radícula y raíces adventicias, retención de flores y frutos, paso de flor a fruto, juventud del follaje (interacción compleja) y tropismos. Las auxinas a bajas concentraciones estimulan el metabolismo y desarrollo y a concentraciones altas la deprimen por la estimulación del etileno (...)

Aguirre *et al.*, (2011) mencionan que la respuesta diferencial entre los microorganismos. *A. brasilense* indujo mayor desarrollo radical y la simbiosis doble *G. intraradices* + *A. brasilense* mejoró el desarrollo del tallo y lámina foliar en cultivo de café. Esto demuestra que al utilizar cepas solas y combinadas registran efectos distintos en el desarrollo de cultivos.

Dewir *et al.*, (2006), al aplicar concentraciones desde 4.44 a 13.32 mM de Benzyladenina (BA) en medio MS para el crecimiento de *Spathiphyllum*, observó un aumento en la proliferación de raíces. Sin embargo, al aplicar mezclas de citocininas (BA,) con auxinas (AIB, ANA), el número de raíces adventicias por explanto incrementó en comparación con los tratamientos de BA solos, registrando un NR de 9.3 por explanto al aplicar concentraciones de 13.32 mM de BA y 4.9 Mm AIB, concluyendo que existe un efecto sinergista entre las citocininas y las auxinas en el desarrollo radicular de *Spathiphyllum*.

Además menciona que la presencia de CQ es crucial para la producción de raíces en éste tipo de plantas, pues en su ausencia no se producen raíces adventicias en ningún meristemo apical y que la presencia de Auxinas por sí solas solo inducen la formación de callos. Esto difiere con los resultados aquí obtenidos, al registrarse valores de 3.04 raíces por planta al aplicar 0.25 ppm de AIA-JR2 y de 2.52 raíces al aplicar desde 0.25-2.00 ppm de AIA-STD, por lo que las auxinas por si solas también pueden inducir la formación de raíces.

Los valores registrados en este estudio pudiesen fundamentarse en que el balance hormonal en la planta en presencia de auxinas-citocininas, es necesario para un buen desarrollo tanto radicular como foliar en las plantas, además, que las

concentraciones de las fitohormonas en las diferentes partes de la planta debido a un transporte activo, ejercen un efecto ya sea positivo (promoviendo) o negativo (inhibiendo), los cuales se reflejan en el desarrollo fisiológico de la planta según Salisbury y Ross, (1994).

Dewir *et al.*, en el (2006) citaron que al aplicar concentraciones de 30 g.L⁻¹ de sacarosa junto con AIA y CQ en el medio MS se obtuvieron los mejores resultados para la estimulación de la proliferación de raíces de *Spathiphyllum in vitro*.

4.11 Peso fresco de raíz

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que la concentración con 1.0 ppm de AIA-JR2 correspondiente al tratamiento T11 mostró los valores más altos para esta variable (PFR), registrando un PFR de hasta 38.54 ±0.444 mg/planta, superando al resto de los tratamientos evaluados.

Al comparar el efecto de este tratamiento con los tratamientos de AIA de origen sintético (AIA-STD) quienes registraron en promedio un PFR de 28.95±2.323 mg/planta, se determinó una diferencia del 24.87% (Figura 4.15 a).

En orden de importancia le siguieron los tratamientos con 0.25 y 0.5 ppm tanto de AIA-JR2 (T9, T10) mostrando valores de hasta 35.87 mg por planta, seguidos del tratamiento con 0.25 y 0.5 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T5, y T6) quienes fueron estadísticamente iguales alcanzando valores de 34.77 mg, observándose que las concentraciones con 0.25 y 0.5 ppm tanto de AIA-JR2 como del AIA-STD (Sigma®) tienen el mismo comportamiento en el PFR; sin embargo, los valores más altos están representados por el AIA-JR2 (T9 y T10) .

Las plantas expuestas al tratamiento con 2.0 ppm de AIA-JR2 (T12) mostraron valores de 31.47 mg por planta, las cuales resultaron ser estadísticamente iguales al tratamiento con 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T8) existiendo una diferencia del 7.98 % entre ambos. Mientras que el tratamiento con 1.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T7) mostró valores estadísticamente iguales al tratamiento T8 con 2.0 ppm de AIA-STD (Sigma®), registrando un PFR de 28.25 mg por planta. El tratamiento control (T13) con 0.00 ppm resultó ser

estadísticamente igual al tratamiento con 1.0 ppm de AIA-STD (Sigma®) (T7), registrando un PFR de solo 25.45 mg.

Los tratamientos que mostraron los valores inferiores para la variable en estudio, fueron los correspondientes al AIA-P; siendo el tratamiento con 0.25 ppm (T1) el que mostró el menor valor para PFR, seguido del T3 con 1.0 ppm (T3), 2.0 ppm (T4), y 0.5 ppm (T2), mostrando una diferencia del 63.08% con respecto al tratamiento adicionado con 1.0 ppm de AIA-JR2 (T11) y del 44.10% con respecto al control (T13) (Figura 4.15 a y Cuadro 4.3).

Saldajeno y Hyakumachi (2011), reportaron que plántulas de pepino coinoculadas con la micorriza *Glomus mosseae* y la rizobacteria *Fusarium equiseti*, no sólo incrementaron la altura foliar y producción de biomasa seca, sino que también dieron protección contra los fitopatógenos causantes de enfermedades como antracnosis (*Colletotrichum orbiculare*) y damping-off (*Rhizoctonia solani*).

4.12 Peso seco de raíz

Al analizar los tratamientos como efectos independientes se determinó que las raíces provenientes de plantas expuestas al tratamiento con 0.5 ppm de AIA-JR2 (T10) mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) registrando un PSR de hasta 5.45 mg superando al resto de los tratamientos evaluados, seguido del tratamiento con 1.0 ppm de AIA-JR2 (T11) el cual se obtuvo una media de 4.85 mg.

Los tratamientos con 0.25 hasta 2.0 ppm de AIA-STD (T5, T6, T7 y T8) y los tratamientos con 0.25 y 2.0 ppm de AIA-JR2 (T9 y T12), fueron estadísticamente iguales junto con el control (T13), registrando un PSR menor a 4.20 mg/planta existiendo una diferencia del 22.86% con respecto al tratamiento con 0.5 ppm de AIA-JR2, (T10) del que se obtuvo la mayor respuesta con esta variable.

Los valores inferiores en PSR se obtuvieron con los tratamientos con 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de AIA-P (T1 al T4), mostrando una diferencia del 58.48% con respecto al tratamiento con 0.5 ppm de AIA-JR2 (T10) (5.45 mg) (Figura 4.15 c y Cuadro 4.3).

Las fitohormonas intervienen en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas., donde se establecen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones fisiológicas vegetales, controlando así, su desarrollo frente a condiciones ya sean normales o adversas. Las fitohormonas ejercen sus efectos mediante complejos mecanismos moleculares, que desembocan en cambios de la expresión génica, en el citoesqueleto, regulación de las vías metabólicas y cambio de flujos iónicos según Rost, (1979). De ahí que bajo diferentes concentraciones de AIA, se registren diferentes respuestas en las variables evaluadas.

A veces un mismo factor produce efectos contrarios dependiendo del tejido en donde efectúa su respuesta. Esto podría deberse a la interacción con diferentes receptores, siendo éstos los que tendrían el papel más importante en la transducción de la señal. En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas, en un tejido. Así por ejemplo, auxinas y citocininas, de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir a la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de masas celulares (Meins *et al.*, 1978; Taiz y Zeiger, 2006).

La aplicación de citocininas y auxinas en conjunto, a diferentes concentraciones favorecería un mejor desarrollo radicular y foliar de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin, dado que mientras las CQ estimulan la multiplicación celular, el AIA favorece el crecimiento celular., por lo que el uso de éstos, aprovechando ambos efectos como sinergistas, podría ser de utilidad para un buen desarrollo fisiológico de las plantas, dando como respuesta mejores características fenológicas que permitan obtener vitroplantas homogéneas que dada su calidad puedan tener fácil acceso a las cadenas comerciales. (Mansfield y Mc Ains, 1995; Azkon y Talón, 2000).

Las auxinas se encuentran a concentraciones de 10^{-6} a 10^{-8} M, y su distribución dentro de los tejidos está sujeta a los principios del transporte activo y

polar. Si la concentración del compuesto aumenta en el tejido, el efecto que tienen sobre la planta será la inhibición de la elongación de la raíz, la razón es un estímulo en la producción de etileno, mientras que a bajas concentraciones estimula la elongación de los brotes y las raíces (Salisbury, 1994).

La bacteria *Azospirillum brasilense* se ha utilizado con éxito como inoculante de gramíneas (Bashan *et al.*, 2004) y, concretamente, en la región noreste de México en el estado de Tamaulipas en cultivos de maíz y sorgo, donde se ha demostrado que incrementa los rendimientos de grano hasta un 36% respecto a plantas no inoculadas (Díaz *et al.*, 2005, García *et al.*, 2004), se le confiere además un uso en la promoción del crecimiento vegetal, biofertilizante, control biológico de enfermedades e inclusive la capacidad de la bio-remediación de cuerpos de agua contaminado (Carreño *et al.*, 2000, Bashan *et al.*, 2004, Ona *et al.*, 2005).

Los biofertilizantes son insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales, de una forma u otra, proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos. Tienen la ventaja que su uso permite una producción a bajo costo, protección del medio ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Acuña, 2003).

Cuadro 4 3. Medias de los parámetros evaluados en plantas de *S. wallisii* var. chopin *in vitro* después de 4 semanas de exposición a los diferentes tratamientos (T1-T12 y T13 (control)).

ZONA	SECCIÓN FOLIAR				SECCIÓN RADICULAR			
TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	AF (mm)	NH	NB	LR (mm)	NR	PFR (mg)	PSR (mg)
T1	0.25 ppm AIA-P	36.38 bc	4.86 a	0.17 ef	12.78 f	1.81 ef	14.23 g	2.26 f
T2	0.5 ppm AIA-P	36.15 bcd	4.93 a	0.11 f	15.35 e	1.99 e	18.58 f	3.01 e
T3	1.0 ppm AIA-P	39.16 a	4.95 a	0.28 bcd	13.22 f	1.61 f	16.70 fg	2.59 ef
T4	2.0 ppm AIA-P	34.98 d	4.50 bc	0.31 bc	14.37 ef	1.86 e	18.51 f	3.04 e
T5	0.25 ppm AIA-STD (Sigma®)	33.00 e	4.59 b	0.32 bc	32.46 a	2.59 c	34.67 b	4.72 bc
T6	0.5 ppm AIA-STD (Sigma®)	32.64 e	4.38 c	0.26 cde	32.98 a	2.52 cd	34.77 b	4.38 bcd
T7	1.0 ppm AIA-STD (Sigma®)	33.33 e	4.51 bc	0.28 bcd	32.10 ab	2.61 bc	28.25 de	4.51 bcd
T8	2.0 ppm AIA-STD (Sigma®)	35.87 cd	4.50 bc	0.38 b	33.46 a	2.63 bc	28.95 cd	4.20 d
T9	0.25 ppm AIA-JR2	38.78 a	4.96 a	0.66 a	30.21 c	2.79 b	35.74 ab	4.32 cd
T10	0.5 ppm AIA-JR2	30.29 f	4.38 c	0.33 bc	25.50 d	2.46 cd	35.87 ab	5.45 a
T11	1.0 ppm AIA-JR2	37.22 b	4.98 a	0.56 a	30.30 c	3.04 a	38.54 a	4.85 b
T12	2.0 ppm AIA-JR2	32.40 e	4.36 c	0.33 bc	30.05 c	2.33 d	31.47 c	4.25 cd
T13	Testigo(s/t)	32.48 e	4.56 b	0.18 def	30.71 bc	2.65 cd	25.45 e	4.46 bcd
RAÍZ MSE		4.802	0.627	0.445	6.596	0.896	11.86	1.937
CV		13.78	13.478	136.939	25.709	37.811	42.62	48.303
MEDIA (M)		34.82	4.656	0.325	25.658	2.369	27.83	4.009
r²		0.735	0.553	0.329	0.769	0.375	0.59	0.508
VCE		4.68	4.68	4.68	4.68	4.68	4.68	4.68
DSM			0.155	0.110	1.630	0.221	2.93	0.479

*Los valores que presentan la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) en la prueba de Tukey.

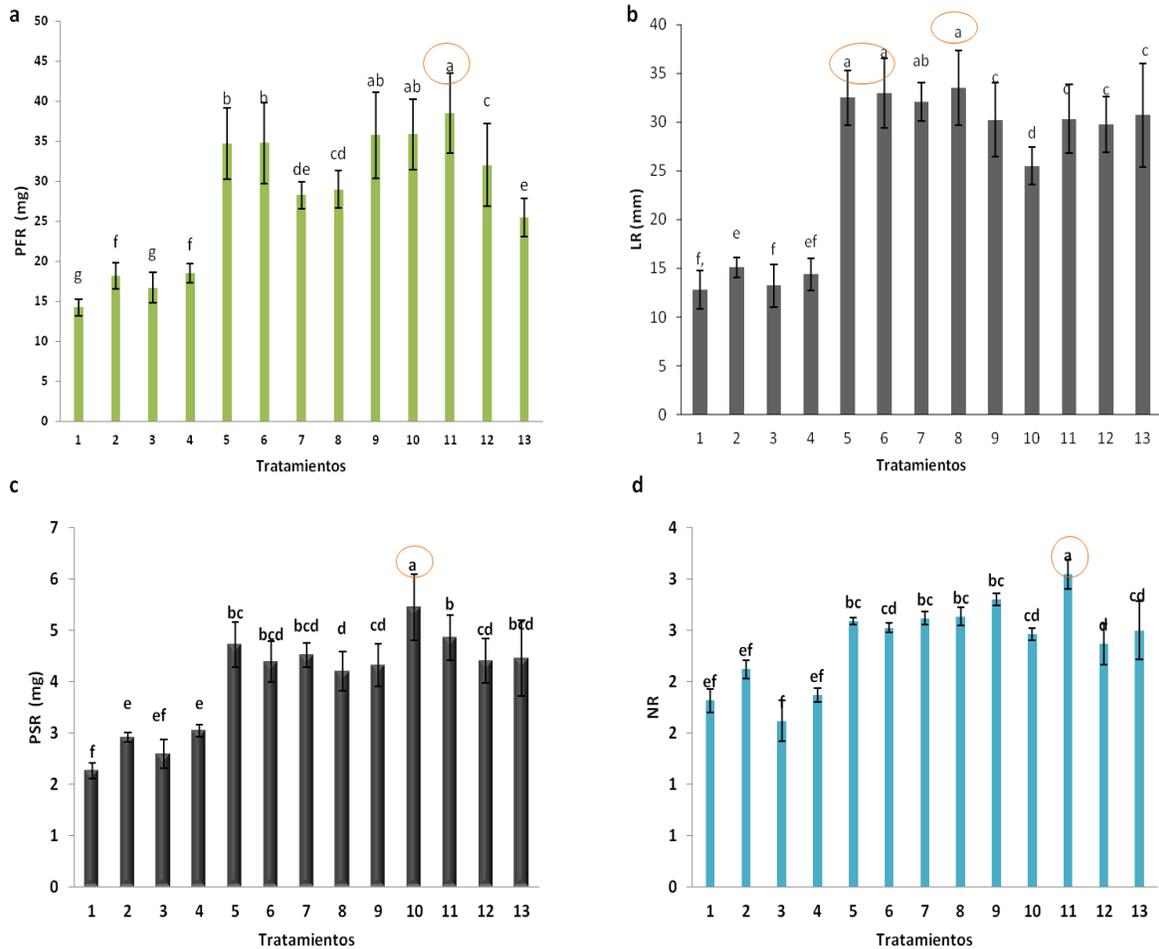


Figura 4. 15. Efecto de los diferentes tipos de AIA en la zona radical de *S. chopin in vitro*. a) Peso fresco de raíz (PFR), b) Longitud radicular (LR), c) Peso seco de raíz (PSR), y d) Número de raíces (NR) de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin *in vitro* después de 4 semanas de crecimiento en agar MS a 25°C en condiciones asépticas a diferentes concentraciones de AIA provenientes de diferentes fuentes (T1=0.25 ppm AIA-P, T2=0.5 ppm AIA-P, T3=1.0 ppm AIA-P, T4=2.0 ppm AIA-P, T5=0.25 ppm AIA-STD (Sigma®), T6=0.5 ppm AIA-STD (Sigma®), T7=1.0 ppm AIA-STD (Sigma®), T8=2.0 ppm AIA-STD (Sigma®), T9=0.25 ppm AIA-JR2, T10=0.5 ppm AIA-JR2, T11=1.0 ppm AIA-JR2, T12=2.0 ppm AIA-JR2, T13=Testigo(s/t)). Los valores de la media±SD, n=6 repeticiones con 20 plantas.

* Los valores marcados presentan los mejores resultados para las variables evaluadas y las barras que presentan diferente letra son estadísticamente diferentes con $P < 0.05$ en la prueba de Tukey.

La agricultura moderna se enfrenta a nuevos retos en los que los enfoques ecológicos y moleculares se están integrando para lograr los rendimientos más altos y reducir al mínimo los impactos negativos sobre el medio ambiente. La aplicación de biofertilizantes podría cumplir con este requisito. El biofertilizante es un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar todos los nutrientes requeridos por las plantas y ayuda a aumentar la calidad de la tierra en un entorno de simbiosis natural (Wenhao Xiang *et al.*, 2012).

Los Bioproductos (biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas) son componentes vitales de los sistemas sustentables, ya que constituyen medios económicamente atractivos y ecológicamente aceptables para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad (Chirinos *et al.*, 2006).

Los biofertilizantes en base a microorganismos se revelan como una estrategia importante para lograr una agricultura sustentable o ecológica. Su utilización permite disminuir insumos químicos y, además de reducir el impacto ambiental desfavorable, permite obtener ahorros económicos, incrementar rendimientos, mejorar la salud general de las plantas y regenerar paulatinamente las características físicas, químicas y biológicas de los suelos (Peralta-Díaz, 2007).

V. CONCLUSIONES

La cuantificación y determinación de AIA producido por JR2 mediante el método interno FITOHORM .2 del Cinvestav resultó efectivo.

La purificación de AIA producido por rizobacterias (JR2) mediante la técnica de cromatografía en columna fue parcial.

La cepa JR-2 produce Acido indolacético a partir de triptófano ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y dicho metabolito está involucrado en la capacidad promotora del crecimiento vegetal mediante el desarrollo foliar y radicular de *Spathiphyllum wallisii* var. chopin *in vitro*.

Este trabajo corroboró la síntesis de AIA a partir de triptófano por la cepa JR2 después de 80 h de incubación en medio LB a pH 7.5.

Existieron diferencias ente tipos de AIA utilizado, el obtenido directamente de la cepa JR2, registró la mejor respuesta en el desarrollo foliar en vitroplantas de *S. wallisii* var. chopin para las variables AF, NH y NB, con valores de 38.78 mm, 4.98 hojas/planta y 0.66 brotes/planta, respectivamente.

Las mejores respuestas para las variables; NR, PFR y PSR en el desarrollo radicular fueron registradas en vitroplantas de *S. chopin* al adicionar AIA-JR2, registrando valores de 3.04 raíces, 38.54 mg y 5.45 mg, respectivamente, sin mostrar un efecto significativo para la variable LR.

El AIA-STD de origen sintético (Sigma®), registró las mejores respuestas para el desarrollo radicular, mediante la elongación de raíces (LR) con valores de 33.46 mm.

El AIA-P purificado parcialmente, registró respuesta positiva para el desarrollo foliar, registrando valores mayores (39.16 mm y 4.95 hojas) las variables AF y NH. Sin embargo, registró los menores valores para el desarrollo radicular en las variables LR, NR, PFR y PSR.

La aplicación de concentraciones mínimas (0.25 ppm) del extracto bacteriano de AIA-JR2 generó una respuesta positiva en el crecimiento foliar de las vitroplantas de *S. chopin*, específicamente en altura foliar (AF), número de hojas (NH) y número de brotes (NB), y concentraciones de 1.0 ppm del mismo AIA

registraron respuestas positivas para las variables número de hojas (NH), número de brotes (NB), y peso fresco de raíz (PFR).

La aplicación de concentraciones mínimas (0.25 ppm) del extracto bacteriano de AIA-P purificado parcialmente generó una respuesta positiva en el crecimiento foliar de las vitroplantas de *S. wallisii* chopin, específicamente en altura foliar (AF) y número de hojas (NH) y negativa para en el desarrollo radicular registrando valores mínimos para NR (1.81 raíces), LR (12.78 mm), PFR (14.23 mg) y PSR (2.26 mg)

El uso de concentraciones a partir de 0.25 ppm de AIA-JR2 tuvieron mayor influencia en el crecimiento foliar y radicular en las vitroplantas de *S. chopin* que las concentraciones del AIA-STD y las de AIA-P. Éste tipo de AIA puede ser utilizado como insumo en la formulación de biofertilizantes orgánicos dirigidos a la promoción del desarrollo de plantas.

Dada la capacidad para la producción de metabolitos auxínicos (AIA), los cuales desempeñan un papel directo en la promoción del crecimiento vegetal, la cepa JR2 posee un amplio potencial para su uso en la producción agrícola orgánica, tanto en la estimulación del crecimiento foliar como radicular de vitroplantas de *S. wallisii* var. chopin.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acuña A. Oscar (2006). Uso de biofertilizantes en la Agricultura. Centro de Investigaciones Agronómicas, 2511- 3062.
2. Aguirre J., Moroyoqui D., Mendoza A., Cadena J., Avendaño C., Aguirre J., (2011). Hongo endomicorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno inoculadas a *Coffea arabica* en vivero. Agron. Mesoam vol.22 no.1 San Pedro versión ISSN 1021-7444.
3. Anderson, P.C.; Chomet, P.S.; Groffor, M.C. and Kris A.L. (1999). Anthranilate synthase gene and method of use thereof for conferring tryptophan over production. Patent USA No. 6271016.
4. Arshad M, Frankerberger WT Jr (1998) Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Adv Agro 62:45–151.
5. Arteca, R. (1996). Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall.
6. Azcón-Bieto J. & Talón M. (1996). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Edígrafos, Madrid, pp.285-299.
7. Barceló Coll, J.; Nicolás R., G.; Sabater García, B. Y Sánchez Tamés, R. (2001): Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide, Madrid.
8. Bashan Y., and Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30,1225-1228.
9. Bashan, Y.; Holguin, G. and Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. 50: 521-577.
10. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. (1951); 62:293-300.
11. Bidwell, R.G.S. (1979). Fisiología vegetal 1a edición en español. A.G.T editorial S.A. México.
12. Cabrera R., I. (1999). Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para producción de plantas en maceta. Revista Chapingo, serie horticultura. Vol 5 No 1. Universidad Autónoma Chapingo.
13. Castillo G, Altuna B., Michelena G., Sánchez J. y Acosta M. (2005). Cuantificación del contenido de Ácido Indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Revista Anales de Biología 27:137-142. La Habana, Cuba.
14. Castillo G. (2004). Desarrollo de Métodos Cromatográficos para la Determinación de Giberelinas y Auxinas para el estudio de su Biosíntesis. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad de la Habana.
15. Chandanie W.A., Kubota M., Hyakumachi M. (2005). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and plant growth promoting fungus *Phoma* sp. on their root colonization and growth promotion of cucumber. Mycoscience, 46: 201-204.
16. Chirinos J., Leal Á. y Montilla J, (2006). Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui. Revista Digital CENIAP HOY N° 11.
17. Davies, F. T., Jr., and H. T. Hartmann. (1988). The physiological basis of adventitious root formation. Acta Hort. 227:113-20.

18. Dewir ,Y. H. Chakrabarty,. J. Hahn, and k. Y. Paek. (2006). A simple method for mass propagation of spathiphyllum cannifolium using an Airlift bioreactor. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 42:291–297.
19. Díaz P., Ferrera-Cerrato R., Almaraz-Suárez J. & Alcántara G., (2001). Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. *Terra*. 19: 327- 33
20. Dimkpa C, Svatos A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W. (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere*74:19–25.
21. Espinosa F. A, Mejía M. J, Colinas L.M.T. Rodríguez E.M.A. Urbanczyk P. A.E., Beltrán B.M.A., (2009). Catálogo nacional de especies y variedades comerciales de plantas y flores producidas en México y Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 350 pp.
22. Franhenberger Jr WT & Arshad M. (1995). *Phytohormones in soils. Microbial production and function*. NewYork: Marcel Dekker, Inc.
23. García JAL, Probanza A, Ramos B, Palomino MR, Mañero FJG, (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie for Sustainable Development*, 24 (Suppl 4): 169-176.
24. García JG., Mendoza A., Mayek N., (2008). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y ciencia vol.28 no.1 Villahermosa versión impresa ISSN 0186-2979*.
25. Garrido G, Guerrero JR, Cano EA, Acosta M & Sánchez-Bravo J. (2002). Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum* 114: 303-312.
26. Glickmann, E and Y. Deessaux. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria". *Soil Biology and Biochemistry* 45:631-640.
27. González, A.M., Raisman, J.S., Aguirre, M. (1999). Auxinas conjugadas. Argentina. [en línea]. [Fecha de consulta Abril del 2013]. Publicado en: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.html>
28. Guerrero JR, García P, Sánchez-Bravo J, Acosta M & Arnao M. (2001). Quantitation of Indole-3-acetic acid by LC with electrochemical detection in etiolated hypocotyls of *Lupinus Albus*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 24 (20): 3095-3104.
29. Hartmann, H.T.; D.E. Kester and F.T. Davies. (1992). *Plant Propagation. Principles and Practices*. Fifth Edition.
30. Hernández Mendoza, J.L.: Quiroz Velásquez, J.D.; Moreno Medina, V.R. y Mayek Pérez, N. (2008). Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. *Avances en investigación agropecuaria REv. AIA*. 12(1):57-67.
31. *Horticultura Ornamental*. Universidad Autónoma del Estado de México. Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental A.C. Estado de México, México.
32. Hurtado, D. y M.E. Merino. (1994). *Cultivo de tejidos vegetales*. 3era Edicion. Editorial Trillas. S.A. de C.V. México. 232 p
33. Jordan, M y Casaretto, J. (2005). *Fisiología Vegetal; Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
34. Kelen M., Demíralay E.C., Sen S., Özkan G. (2004) Separation of abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid in 99R (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) and Rose Oil (*Rosa damascene* Mill.) by reversed phase liquid chromatography. *Turk. J. Chem.* 28. 603-610.

35. Kumar B, Kumar M, Annapurna K, Maheshwari DK (2006) Genetic diversity of plant growth promoting rhizobia isolated from a medicinal legume. *Mucuna puriens* Linn. *Curr Sci* 91(11):1524–1529.
36. Lebuhn M & Hartmann A. (1993). Method for the determination of Indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. *Journal of Chromatography* 629: 255-266.
37. Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Hiftem M. and Cooke, B.M. (2008). *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*. Springer-Verlag New York, EE.UU. 126pp.
38. Leszczyńska-Borys, H. (1992). Potencial Genético de Plantas Ornamentales Floricultura intensiva No 11. pp12-13
39. Levitus-Gabriela, Echenique-Gabriela, Rubinstein-Clara, Hopp-Esteban y Mroginski-Luis. (2004). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*, ARGENBIO - Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina.
40. Ludwig-Müller J, Cohen JD. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, (2002); 115:320-329.
41. Luria S, Burrous J. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Bacteriol.* (1957); 74:461-76.
42. Malik, M.A.B. and Williams, R.D. (2008). Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. In: Zeng, R.S., Mallik, A.U., Luo, S.M., editors *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. New York; Sronger. Pp.321-345.
43. Mann J.D., Jaworski E.G. (1970) Minimizing loss of indoleacetic acid during purification of plant extracts. *Planta (Berl.)* 92, 285-291.
44. Mansfield T.M., Mc Ainsh M.R., (1995). Hormones as regulators of water balance. En: *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. Davies P.J., ed. Kluwer Publishers, Dordrecht, pp. 411-430.
45. Meuwly P & Pilet PE. (1991). Simultaneous Gas Chromatography-Mass Spectrometry quantification of endogenous ¹²C- and ¹³C Indole-3yl-acetic acid levels in growing maize roots. *Plant Physiology* 95: 179-183.
46. Moreno-Pérez EC. Agricultura protegida para la producción de hortalizas. En: *Segunda Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal*. Guadalajara, México, 2007 [consultado 2013 junio 25]. Disponible en: http://www.rniaf.org.mx/2007/memoria/ponencias/protegida/p3_produccion.pdf
47. Muñoz de Malajovich M. A, (2006). *Composición de medios de cultivo para células vegetales*. Universidad Nacional de Quilmes, Quilmes, Argentina.
48. Murashige, T. y F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
49. Muray, K.A., (1998). “La Selección de Especies Ornamentales en Relación con las Condiciones Ambientales y la Arquitectura de Paisaje”. *Memoria Resúmenes VI Congreso Nacional de*
50. Numan A & Danielson ND. (2002). On-line photo-derivatization with flow injection and liquid chromatography atmospheric pressure electrospray mass spectrometry for the identification of indoles. *Analytica Chimica Acta* 460: 49-60.
51. Ona, O., Impe, V.J.; Pensen, E. y Vanderleyden, J. (2005). Growth and indole 3 acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp 245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol. Lett.* 246: 125-132.
52. Orellana, P. (1998). Propagación vía organogénesis. p. 151-178.7

53. Ortega-Blu, R.; Correa, M. y Olate, E. (2006). Determinación de curvas de acumulación en tres cultivares de *Lilium* spp. Para flor cortada. *Agrociencia*. 40:77-88.
54. Patten ChL. & Glick BR. (1996). Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
55. Peralta-Díaz H. (2007). *Azospirillum*, Micorrizas y *Rhizobium*. Biofertilizantes Microbianos para una Agricultura Sustentable. 118-129. En: Lira-Saldivar R. H. y Medina-Torres J G. 2007 (Editores). *Agricultura Sustentable y Biofertilizantes*. 1-217
56. Peralta-Díaz H. (2007). *Azospirillum*, Micorrizas y *Rhizobium*. Biofertilizantes Microbianos para una Agricultura Sustentable. 118-129. En: Lira-Saldivar R. H. y Medina-Torres J G. 2007 (Editores). *Agricultura Sustentable y Biofertilizantes*. 1-217.
57. Pérez J. (1994). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
58. Prinsen E, Van Dongen W, Esmans E & Van Onckelen H. (1997). HPLC Linked electrospray tandem mass spectrometry: a rapid and reliable method to analyze indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. *Journal of Mass Spectrometry* 32: 12-22.
59. Rost, Thomas L., and T. Elliot Weier. (1979). *Botánica: breve introducción a la biología vegetal*. New York: Wiley. Pages 155-170. ISBN 0-471-02114-8
60. Saldaieno M.B.B. v Hvakumachi M. (2011). The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* stimulate plant growth and reduce severity of anthracnose and damping-off diseases in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* stimulate plant growth and reduce severity of anthracnose and damping-off diseases in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings
61. Salisbury F B. y C. W. Ross. (1994). *Fisiología vegetal*. 1a edición. Virgilio González V. (traductor). Grupo editorial Iberoamericano, S.A. de C.V. México. 759 p.
62. Sandberg G, Crozier A & Ernstsén A. (1987). Indole-3-acetic acid and related compounds. In *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. London: Academic Press Inc., pp 169-301.
63. Sridevic M., Yadav N.C.S., Mallaiiah K.V. (2008) Production of indole-acetic-acid by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *Resrach Journal of Microbiology*. 3(4), 276-281.
64. Srivastava, L. M. (2002). *Crecimiento y desarrollo de las Plantas: hormonas y ambiente natural*. Amsterdam: Academic Press. Page 140.
65. Taiz L & Zeiger E (2006). *Plant Physiology*. Fifth edition. Online version. [<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=19&id=264>]
66. Teixeira DA, Alfenas AC, Gonçalves R, Ferreira EM, de Sequeira L, Maffia LA, Mounteer AH (2007) Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. *Braz J Microbiol* 38:118–123
67. Wenhao Xiang, Li Zhao, Xin Xu, Yonghua Qin, Guanghui Yu, (2012). Mutual Information Flow between Beneficial Microorganisms and the Roots of Host Plants Determined the Bio-Functions of Biofertilizers. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 1115-1120.
68. Went FW & KV Thimann. (1937). *Phytohormones*. New York: The Macmillan Company.

ANEXO 1

MEDIO DE CULTIVO LB

Composición del medio de cultivo LB.

Nutriente	Cantidad
Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g /L
NaCl	5.8 g/L
Triptófano	1.0 g/L
pH	7±0.2
Agua destilada	1.0 L

ANEXO 2

ESTADÍSTICO DE LAS TRES EVALUACIONES DE S. CHOPIN *IN-VITRO*

"ANÁLISIS FINAL (1,2,3 EVALUACIÓN) DEL ENRAIZAMIENTO CON AIA PURIFICADO, AIA JR2 (CEPA) Y AIA STD"

EVAL 3 1 2 3
TRAT 13 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
REP 6 1 2 3 4 5 6

Número de observaciones 4680

Pattern Observación dependientes

1 4680 AF LR NR PFR NB NHP

2 4679 PSR

Variable dependiente: AF

Suma de Cuadrado de

Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	284537.8710	1221.1926	52.95	<.0001
Error	4446	102533.1536	23.0619		
Total correcto	4679	387071.0246			

R-cuadrado **Coef Var** **Raiz MSE** **AF Media**
0.735105 **13.78889** **4.802279** **34.82717**

Cuadrado de					
Fuente	DF	Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	101060.8963	50530.4481	2191.08	<.0001
TRAT	12	31607.8705	2633.9892	114.21	<.0001
REP	5	2490.3450	498.0690	21.60	<.0001
EVAL*TRAT	24	98258.7660	4094.1153	177.53	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	51119.9931	269.0526	11.67	<.0001

Variable dependiente: LR

Suma de Cuadrado de					
Fuente	DF	cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	642428.4027	2757.2034	63.37	<.0001
Error	4446	193456.2347	43.5124		
Total correcto	4679	835884.6374			

R-cuadrado **Coef Var** **Raiz MSE** **LR Media**
0.768561 **25.70870** **6.596395** **25.65822**

Cuadrado de					
Fuente	DF	Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	87711.4563	43855.7282	1007.89	<.0001
TRAT	12	303728.2920	25310.6910	581.69	<.0001
REP	5	1892.6069	378.5214	8.70	<.0001
EVAL*TRAT	24	172229.0445	7176.2102	164.92	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	76867.0030	404.5632	9.30	<.0001

Variable dependiente: NR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	2141.085916	9.189210	11.45	<.0001
Error	4446	3567.831900	0.802481		
Total correcto	4679	5708.917816			

R-cuadrado **Coef Var** **Raiz MSE** **NR Media**
0.375042 **37.81118** **0.895813** **2.369175**

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	16.8799263	8.4399632	10.52	<.0001
TRAT	12	771.9681997	64.3306833	80.16	<.0001
REP	5	36.6685932	7.3337186	9.14	<.0001
EVAL*TRAT	24	510.7613737	21.2817239	26.52	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	804.8078234	4.2358306	5.28	<.0001

Variable dependiente: PFR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	898566.533	3856.509	27.41	<.0001
Error	4446	625545.850	140.699		
Total correcto	4679	1524112.383			

R-cuadrado **Coef Var** **Raiz MSE** **PFR Media**
0.589567 **42.62027** **11.86164** **27.83099**

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	164454.1993	82227.0996	584.42	<.0001
TRAT	12	302022.3037	25168.5253	178.88	<.0001
REP	5	6947.3537	1389.4707	9.88	<.0001
EVAL*TRAT	24	206533.2598	8605.5525	61.16	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	218609.4166	1150.5759	8.18	<.0001

Variable dependiente: NB

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	432.109303	1.854546	9.36	<.0001
Error	4446	880.727695	0.198094		
Total correcto	4679	1312.836998			

R-cuadrado **Coef Var** **Raiz MSE** **NB Media**
0.329142 **136.9390** **0.445078** **0.325019**

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	68.5400471	34.2700235	173.00	<.0001
TRAT	12	98.1192652	8.1766054	41.28	<.0001
REP	5	2.5448779	0.5089756	2.57	0.0250
EVAL*TRAT	24	129.9196535	5.4133189	27.33	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	132.9854596	0.6999235	3.53	<.0001

Variable dependiente: NHP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	2161.894231	9.278516	23.57	<.0001
Error	4446	1750.550000	0.393736		
Total correcto	4679	3912.444231			

R-cuadrado **Coef Var** **Raiz MSE** **NHP Media**
0.552569 **13.47755** **0.627484** **4.655769**

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	577.5166667	288.7583333	733.38	<.0001
TRAT	12	261.3414530	21.7784544	55.31	<.0001
REP	5	44.2737179	8.8547436	22.49	<.0001
EVAL*TRAT	24	653.1944444	27.2164352	69.12	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	625.5679487	3.2924629	8.36	<.0001

- Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para AF

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	23.06189
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.4031

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	41.0865	1560	1
B	33.4314	1560	3
C	29.9636	1560	2

- **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para LR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	43.51242
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.5537

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	31.7750	1560	1
B	22.8266	1560	2
B	22.3731	1560	3

- **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para NR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	0.802481
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.0752

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	2.41667	1560	1
A	2.40641	1560	3
B	2.28445	1560	2

- **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PFR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	140.6986
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.9957

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	35.8565	1560	1
B	25.9165	1560	3
C	21.7199	1560	2

- **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para NB**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	0.198094
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.0374

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	0.43910	1560	1
B	0.37846	1560	3
C	0.15749	1560	2

- **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para NHP**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	0.393736
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.0527

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	5.10641	1560	1
B	4.61154	1560	3
C	4.24936	1560	2

▪ **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para AF**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	23.06189
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	1.1864

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	39.1667	360	3
A	38.7865	360	9
B	37.2278	360	11
C B	36.3833	360	1
C B D	36.1583	360	2
C D	35.8778	360	8
D	34.9833	360	4
E	33.3333	360	7
E	33.0083	360	5
E	32.6444	360	6
E	32.4833	360	13
E	32.4056	360	12
F	30.2944	360	10

▪ **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para LR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	43.51242
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	1.6297

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	33.4694	360	8
A	32.9833	360	6
A	32.4694	360	5
B A	32.1056	360	7
B C	30.7139	360	13
C	30.3083	360	11
C	30.2103	360	9

C	30.0556	360	12
D	25.5012	360	10
E	15.3583	360	2
F E	14.3750	360	4
F	13.2204	360	3
F	12.7861	360	1

▪ **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para NR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	0.802481
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	0.2213

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	3.04444	360	11
B	2.79961	360	9
C B	2.63611	360	8
C B	2.61667	360	7
C B	2.59167	360	5
C D	2.52500	360	6
C D	2.50000	360	13
C D	2.46111	360	10
D	2.33611	360	12
E	1.99167	360	2
E	1.86667	360	4
F E	1.81389	360	1
F	1.61633	360	3

▪ **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PFR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	140.6986
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	2.9305

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	38.5490	360	11
B A	35.8788	360	10
B A	35.7475	360	9
B	34.7789	360	6
B	34.6784	360	5
C	31.4714	360	12
D C	28.9598	360	8
D E	28.2500	360	7
E	25.4592	360	13
F	18.5832	360	2
F	18.5124	360	4
G F	16.7040	360	3
G	14.2303	360	1

▪ Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para NB

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	0.198094
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	0.11

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	0.66111	360	9
A	0.56944	360	11
B	0.38056	360	8
C B	0.33889	360	12
C B	0.33056	360	10
C B	0.32778	360	5
C B	0.31667	360	4
C B D	0.28611	360	7
C B D	0.28525	360	3
C E D	0.26389	360	6
F E D	0.18056	360	13
F E	0.17333	360	1
F	0.11111	360	2

▪ Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para NHP

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4446
Error de cuadrado medio	0.393736
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	0.155

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	4.98611	360	11
A	4.96111	360	9
A	4.95556	360	3
A	4.93611	360	2
A	4.86944	360	1
B	4.59444	360	5
B	4.56389	360	13
C B	4.51667	360	7
C B	4.50556	360	8
C B	4.50278	360	4
C	4.38333	360	6
C	4.38056	360	10
C	4.36944	360	12

▪ Variable dependiente: PSR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	233	17197.74157	73.81005	19.68	<.0001
Error	4445	16671.45023	3.75061		
Total correcto	4678	33869.19180			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	PSR Media
0.507769	48.30294	1.936649	4.009380

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
EVAL	2	1782.588721	891.294360	237.64	<.0001
TRAT	12	3991.207760	332.600647	88.68	<.0001
REP	5	196.499010	39.299802	10.48	<.0001

EVAL*TRAT	24	3008.049608	125.335400	33.42	<.0001
EVAL*TRAT*REP	190	8219.222031	43.259063	11.53	<.0001

▪ **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PSR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4445
Error de cuadrado medio	3.750607
Valor crítico del rango estudentizado	3.31561
Diferencia significativa mínima	0.1626
Media armónica de tamaño de celdas	1559.667

Tukey Agrupamiento	Media	N	EVAL
A	4.81560	1560	1
B	3.89519	1560	3
C	3.31691	1559	2

▪ **Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PSR**

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	4445
Error de cuadrado medio	3.750607
Valor crítico del rango estudentizado	4.68750
Diferencia significativa mínima	0.4785
Media armónica de tamaño de celdas	359.9229

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	5.4562	360	10
B	4.8569	360	11
C B	4.7293	359	5
C B D	4.5186	360	7
C B D	4.4639	360	13
C B D	4.3853	360	6
C D	4.3242	360	9
C D	4.2597	360	12
D	4.2088	360	8
E	3.0450	360	4

	E	3.0125	360	2
F	E	2.5983	360	3
F		2.2652	360	1