

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



Optimización de la producción de ácido indolacético por bacterias promotoras de crecimiento y evaluación de su efectividad biológica en papa (*Solanum tuberosum* var. *Alpha*)

Presentado por:

ALEJANDRA PRADO BUSTILLO

Tesis

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2013.

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado en el marco de las actividades comprometidas en el proyecto **“DESARROLLO DE UN PRODUCTO ORGÁNICO A BASE DE EXTRACTOS BACTERIANOS COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y CONTROL DE FITOPATOGENOS”** con clave **175177**, elaborado en el programa de cooperación entre la empresa Biorganix Mexicana SA de CV, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, el Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico. El proyecto fue financiado por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria de **FONDO SECTORIAL DE INNOVACIÓN, SECRETARÍA DE ECONOMÍA-CONACYT-2011-03**.

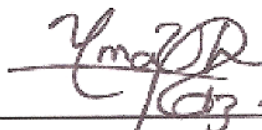
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Optimización de la producción de ácido indolacético por bacterias promotoras de crecimiento y evaluación de su efectividad biológica en papa (*Solanum tuberosum* var. *Alpha*)

Por:

ALEJANDRA PRADO BUSTILLO

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.

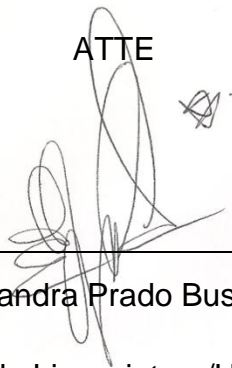
Junio del 2013.

MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA

El suscrito, Alejandra Prado Bustillo, estudiante de la carrera de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos, con matrícula 295396 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



Alejandra Prado Bustillo

Tesis de Licenciatura/UAAAN

He llegado muy lejos como para detenerme ahora. He pasado victorioso demasiadas pruebas como para regresar. Noto como el estrés está aumentando, pero ¡Así sucede cuando estoy a punto de presenciar el cumplimiento de mis sueños!

Alejandro Ariza Z.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme continuar con la vida que él me ha regalado. Gracias Dios por dejarme finalizar una etapa más, que gracias a ti estoy aquí y sigo con vida para poder culminar sin fin de proyectos que se presenten. Pero sobre todo por dejarme llegar hasta aquí con salud, familia, amigos, pareja y bendiciones que crecen día con día. Por eso y más, ¡GRACIAS!

A mi amada universidad, mi **ALMA TERRA MATER**, por toda la experiencia, conocimientos, cultura y formas de vida que conocí y adquirí durante estos años. Gracias por dejarme vivir esta experiencia y mostrarme que eres diferente a todas las universidades, porque me abriste el panorama y me diste más que sólo conocimientos.

A mi asesora de tesis **M. C. Rebeca Casique Valdés**. Gracias Rebe porque definitivamente sin ti yo no podría estar presentando este proyecto en estos momentos. Gracias por tu valiosa aportación, por tu tiempo, tu paciencia, tu cooperación, confianza y disposición. Pero sobre todo le doy gracias a Dios que te haya puesto en mi camino. Además de excelente asesora, eres una excelente persona. No puedo pedir más, gracias por llevarme siempre de la mano y apoyarme sin condiciones.

A mi asesora, la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez**. Gracias Dra. porque siempre pude contar con usted y estuvo dispuesta a apoyarme sin condiciones. Gracias porque me abrió la posibilidad de realizar este proyecto con Biorganix Mexicana; además le doy las gracias por brindarme tantos conocimientos a lo largo de mi carrera profesional. Ha sido usted una de las personas que mayor contribución ha tenido en mi crecimiento como profesionista.

A mi asesora la **M. C. E. Edith Villavicencio** investigadora del Campo Experimental Saltillo. Gracias por su ayuda, tiempo, exigencia, esfuerzo y disposición. Por pulir mi tesis y mejorarla. Por abrirme las puertas y permitirme continuar en el Laboratorio de Tejidos Vegetales del Campo Saltillo *CIRNE*

INIFAP. Le agradezco me haya hecho las debidas observaciones para así culminar mi tesis con excelencia.

A mi asesora **M. C. Areli González Cortes**. Gracias Areli por tu disposición y apoyo incondicional. Porque siempre pero siempre estuviste ahí para lo que yo necesitara. Estoy agradecida inmensamente contigo por tu ayuda, flexibilidad, paciencia, confianza, colaboración. Gracias por todos los conocimientos que me aportaste que fueron ¡muchos! Porque todo lo que me enseñaste tú lo desconocía. Fui muy afortunada en que fueras tu quién me acompañara y asesorará en gran parte de este proyecto.

A la **M. C. Argentina Orta Dávila** por permitirme ser partícipe de su equipo de trabajo en Biorganix Mexicana y gracias a eso abirme la oportunidad de realizar mi tesis con éxito. Gracias además por crear un ambiente de trabajo lleno de buena vibra, organización y generando resultados, que eso hizo sentir mi proyecto menos pesado.

A la empresa **Biorganix Mexicana S. A de C. V.** por aceptarme en su organización, permitirme adquirir experiencia y ofrecerme el proyecto de tesis. Gracias por abirme las puertas y dejarme ser parte de este proyecto, gracias por todos los conocimientos que reforcé y adquirir durante mi estancia.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias** (INIFAP) de Campo Experimental Saltillo Coahuila CIR-NORESTE, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y permitirme realizar parte de mi tesis utilizando su infraestructura, equipo y materiales necesarios para culminarla, usando las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Gracias por los conocimientos teórico-prácticos adquiridos que desconocía.

A mi pareja, a mis grandes amigos y hermanos Luis Galván y Jaime Prado, gracias por ayudarme en este proyecto, que su granito de arena significó mucho para que yo avanzara en la evaluación de mi tesis.

A mi gran amigo, Ulises Solis por apoyarme en todo momento y todo el trayecto de mi carrera profesional. Gracias por ser esa persona que estuvo ahí para resolverme cualquiera duda y dispuesto a todo. Por eso y mucho más, ¡Gracias!

DEDICATORIAS

A mi mamá, Adela Bustillo Garfias por ser la persona que en éstos 23 años ha estado al pendiente de mi día con día. Por ser tan paciente y todo una guerrera. Por tu forma de dar incondicional hacia con nosotros. Gracias por tanto amor.

A mi papá, Jaime I. Prado López por sacarme adelante hasta la fecha y darme todo lo que quiero y necesito. Por ser la persona que me ha enseñado a vivir retos y cumplir mis objetivos. Gracias por enseñarme con el ejemplo, más que con palabras.

A mi hermana Adriana Prado, por ser una persona llena de amor y alegría. Gracias por demostrarme que no hay nada más importante que eso. Gracias por tu amistad y todos los momentos que compartimos juntas.

A mi hermano Jaime Prado, por tu sentido del humor y amor. Gracias por hacerme sentir alegría, porque siempre que convivimos me sacas una sonrisa.

A mi sobrina Rebeca Moreno, por darle alegría y más sentido a mi vida. Por recordarme lo valioso que es actuar desde el ser. Con amor y sin limitaciones. Eres una bendición.

A mi novio Luis Galván, por tu apoyo, amor y amistad incondicional. Por ser esa persona que está para mí 24/7 y con quien comparto mis tristezas y alegrías. Gracias por tu inmenso amor.

A mis asesoras Rebeca Casique y Areli González por su enorme disposición y alegría particular. Gracias por su amistad y todo lo que me brindaron sin condiciones.

A la memoria de Don Antonio Narro y a su ALMA TERRA MATER porque tuve el gusto de formar parte de esta universidad que un día fue tan solo un sueño.

Contenido

RESUMEN	17
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 ANTECEDENTES.....	19
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	21
1.3 HIPÓTESIS.....	23
1.4 OBJETIVO GENERAL	23
1.4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23
2. REVISION DE LITERATURA	24
2.1 Generalidades de hormonas de crecimiento vegetal	24
2.1.1 Principales hormonas de crecimiento vegetal.....	27
2.1.2 Generalidades de Auxinas.....	30
2.1.3 La Función de Auxinas	32
2.1.4 Acido indolacético	34
2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	35
2.3 Optimización de ácido indolacético.....	38
2.4 Origen del Cultivo de papa	38
2.4.1 Producción de papa.....	39
2.4.2 Superficie Cosechada de cultivo de papa.....	40
2.5 Producción de Vitroplantas en laboratorio	41
2.5.1 La función de los reguladores de crecimiento en el cultivo <i>in vitro</i>	43
2.5.2 Reguladores de Crecimiento más Comunes Utilizados en Cultivo <i>In Vitro</i>	43
2.6 Micropropagación	44
2.6.1 Micropropagación en Papa.....	45
3. MATERIALES Y METODOS	46

3.1.1 Cuantificación, caracterización y optimización.....	46
3.1.2 Evaluación del efecto biológico de extractos bacterianos parcialmente purificado con presencia de ácido indolacético.....	46
3.2 Etapa I: Optimización de la producción de ácido indolacético evaluando parámetros de pH, temperatura y tiempos de incubación.....	47
3.2.1 Producción de promotores de crecimiento	47
3.2.2 Producción de ácido indolacético (AIA)	48
3.2.3 Cuantificación de ácido indolacético por métodos colorimétricos	48
3.1.2.1 Curva Patrón de Ácido Indolacético.....	49
3.2.4 Cinética de fermentación microbiana.....	50
3.2.5 Cuantificación y caracterización de promotores de crecimiento obtenidos en la cinética de fermentación microbiana.....	52
3.3 Optimización de parámetros cinéticos para la producción de ácido indolacético.....	53
3.3.1 Primera cinética de fermentación para obtener tiempo de incubación ..	53
3.3.2 Efecto del pH en la producción de AIA	55
3.3.3 Efecto de la Temperatura en la producción de AIA	56
Etapa II: Evaluación del efecto de la concentración de triptófano en la producción de ácido indolacético.....	57
3.3.4 Efecto de la concentración triptófano en la producción de AIA.....	57
3.3.5 Segunda Cinética de fermentación microbiana para la producción de ácido indolacético.	57
3.4 Purificación parcial del ácido indolacético.....	58
Etapa III: Evaluación de la efectividad biológica del ácido indolacético purificado parcialmente en cultivos de interés agrícola a nivel <i>in vitro</i>	59
3.5 Micropropagación <i>in vitro</i> de papa.....	59
3.5.1 Material vegetativo.....	59

3.5.2 Medio de Cultivo	59
3.5.3 Evaluación del efecto biológico de extractos obtenidos en la optimización en germinación <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones en plántulas.....	61
3.5.3.1.1 Altura foliar	63
3.5.3.1.2 Longitud de Raíz.....	64
3.5.3.1.3 Número de explantes.....	64
3.5.3.1.4 Número de raíces	65
3.5.3.1.5 Peso fresco y seco de raíces.....	65
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
5. CONCLUSIONES	85
6. LITERATURA CITADA.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Experimento efectuado por Darwin.	24
Figura 2 . Dominancia Apical, Acción coordinada auxinas/citoquininas.....	26
Figura 3. Semillas removidas por la aspersion de auxinas.	26
Figura 4. Estructura química de citoquinina,	28
Figura 5. Estructura química del Etileno.	29
Figura 6. ABA: Cierre de estomas.....	29
Figura 7. Auxinas promoviendo el crecimiento de las células en los tallos.	30
Figura 8. Auxinas y su respuesta a la luz (Fototropismo).	31
Figura 9. Enraizamiento de esquejes en Sauce llorón.	32
Figura 10. Formación de raíces adventicias Izquierda: tratamiento con AIA y testigo. Fuente: http://bmv.fcien.edu.uy	33
Figura 11. Alargamiento Celular.....	34
Figura 12. Estructura del ácido indolacético.....	35
Figura 13. Estructura química de las principales auxinas producidas por bacterias promotoras de crecimiento vegetal.	37
Figura 14. Principales Estados Productores de Papa en México.....	39
Figura 15. Superficie cosechada de Papa en México. Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP/SAGARPA.....	41
Figura 16. Ejemplo de Cultivo de tejidos vegetales.....	42
Figura 17. Cultivo de vegetales, explante.	42
Figura 18. Diagrama de flujo empleada para la obtención de AIA y su evaluación en plantas	46
Figura 19. Espectrofotómetro utilizado para la determinación colorimétrica.	48
Figura 20. Curva de calibración de reactivo Salkowski.	49
Figura 21. Muestras que se utilizaron para conocer su densidad óptica.....	51
Figura 22. Muestras Centrifugadas en Spectrafuge 16M.....	51
Figura 23. Centrifuga utilizada Spectrafuge 16M.	51

Figura 24. Muestras listas para leerse en espectrofotómetro, Genesys 20, Thermospectronic.	52
Figura 25. Celdillas de cuarzo utilizadas para la lectura en espectrofotómetro. ...	53
Figura 26. Matraces con medio LB para la producción de AIA.	54
Figura 27. Muestra primera cinética, lectura en espectrofotómetro.	54
Figura 28. Hidróxido de potasio y Ácido fosfórico utilizados para ajustar el pH de las muestras.....	55
Figura 29. Potenciómetro y solución buffer 4 y 7 utilizadas para su ajuste.	55
Figura 30. Filtros Puradisc utilizados para la filtración de AIA.....	58
Figura 31. Muestra filtrada lista para ser enviada al CINVESTAV.	58
Figura 32. Medio de Cultivo Murashige-Skoog (1962).	60
Figura 33. Fuentes de vitaminas y azúcar para el medio MS.....	61
Figura 34. Sales Inorgánicas para el medio básico Murashige-Skoog (1962).	61
Figura 35. Aplicación de los tratamientos de AIA al medio MS.	62
Figura 36. Extractos bacterianos a diferentes concentraciones. Cada uno corresponde a un tratamiento.	63
Figura 37. Midiendo altura foliar de las plántulas.	64
Figura 38. Midiendo longitud de raíz de las plántulas.	64
Figura 39. Trasplante de explantes para una posterior evaluación.....	65
Figura 40. Cortando raíz para pesar y obtener peso fresco.	66
Figura 41. Peso de raíz en balanza analítica.	66
Figura 42. Raíces expuestas a temperatura ambiente para posteriormente obtener su peso seco.	67
Figura 43. Cinética de crecimiento microbiano después de 120 horas de producción.....	68
Figura 44. Concentración de AIA producido después de 120 horas de exposición.	69
Figura 45. Concentración de AIA producido después de 96 horas de exposición.	71
Figura 46. Diferentes pH y su producción de AIA.	72
Figura 47. Temperatura en °C y su concentración de AIA.....	73
Figura 48. Cantidad de triptófano en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y su concentración de AIA $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	74

Figura 49. Cinética pH 7.5, triptófano 1000 mg·L ⁻¹ y temp 32 °C.....	75
Figura 50. .Plántulas de papa alpha en medio MS donde se puede observar su altura foliar.	77
Figura 51. Comparación de testigo y tratamiento 2 (0.25ppm).	77
Figura 52. Raíces de plántulas de papa variedad alpha.	78
Figura 53. Raíces de plántulas de papa variedad alpha.	79
Figura 54. T5-testigo, tratamiento que presentó menor número de raíces, segunda evaluación.....	81
Figura 55. Número de raíces tratamiento 1 (T1-0.25ppm), segunda evaluación. .	81
Figura 56. Número de raíces tratamiento 2 (T2-0.5ppm), segunda evaluación. ...	81
Figura 57. T3- 1ppm, tratamiento 3 que presentó mayor número de raíces, segunda evaluación.	82
Figura 58. T4- 2ppm, tratamiento 4 que presentó mayor número de raíces junto T3, segunda evaluación.	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Curva patrón de AIA y absorbancia promedio de las muestras.....	49
Cuadro 2. Compuestos del medio MS (Murashige y Skoog, 1962.....	59
Cuadro 3. Tratamientos evaluados con cuatro concentraciones de AIA en vitroplantas de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) variedad Alpha.....	62
Cuadro 4. Concentración de AIA mg·mL ⁻¹ obtenido por JR2 Y AR9 en un periodo de tiempo de 120 horas.	70
Cuadro 5. Prueba de comparación múltiple de medias a través de Tukey alfa 0.05 con datos de temperatura.	73
Cuadro 6. Prueba de comparación múltiple de medias por Tukey 0.05, con datos de cantidad de triptófano.....	74
Cuadro 7. Comparación de medias para la altura foliar (AF), longitud de raíces (LR), número de raíces (NR), número de explantes (NE), peso fresco, (PF) y peso seco de raíces, obtenidas durante la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> L. var. Alpha en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL.....	76

RESUMEN

Hoy en día la mayoría de los productos tienen interacción con sustancias químicas y hablando de la industria agroalimentaria, el uso indiscriminado de productos fertilizantes está ocasionando un desequilibrio en la microbiota nativa.

En el presente trabajo se realizó la optimización de ácido indolacético obtenido a partir de fermentación microbiana, utilizando las cepas microbianas denominadas "JR2" y "AR9". Se evaluaron los parámetros de pH, temperatura, tiempos de incubación y cantidad de triptófano. Posteriormente, se evaluó la efectividad biológica del ácido indolacético en papa a nivel *in vitro*.

Para conocer la producción de las cepas se realizó una cinética a las 0, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80, y 120 horas. Para la optimización, se evaluó mediante un diseño completamente al azar 6 pH's distintos; en cuanto a la temperatura se evaluó el efecto de 26, 28, 30 y 32° C en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4X6 utilizando el pH como factor. Para conocer la cantidad de triptófano óptima, se trabajó con las concentraciones de 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2000 mg·L⁻¹.

El rendimiento de ácido indolacético obtenido en cada parámetro se determinó mediante la técnica colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski.

De acuerdo a la optimización de producción de AIA evaluado se observó que la mayor producción en promedio de esta fitohormona fue de 0.84 g·L⁻¹ a las 72 horas de incubación, considerando un pH óptimo de 7.5, temperatura de 32 °C, sin existir diferencias significativas entre las cantidades de triptófano con 1000, 1500 y 2000 mg·L⁻¹.

Mediante un diseño experimental completamente al azar se evaluó el efecto biológico del extracto bacteriano de AIA a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm), más un testigo, considerando diez repeticiones por tratamiento, realizando la evaluación por triplicado. Las concentraciones

referidas se inyectaron al medio de cultivo MS (Murashige-Skoog, 1962) considerando 5 mL de una suspensión acuosa.

Los resultados muestran que el extracto bacteriano de AIA semipurificado puede utilizarse en vitroplantas de papa a una concentración de 1.0 ppm teniendo un efecto positivo en la altura foliar (AF) de las vitroplantas de 4.82 cm y en el número de explantes (NE) obtenidos a partir de segmentos de tallo + yema cultivados *in vitro* los que generaron 5.47 explantes/vitroplanta. Esta misma concentración también tuvo un efecto rizogénico influyendo en el número de raíces (NR) generando 7.22 raíces/vitroplanta, así como en el peso fresco (PF) y seco (PS) de las mismas, registrando 45.65 mg y 5.73 mg respectivamente.

Esto indica que es factible generar ácido indolacético (AIA) a partir de fermentación microbiana la cual puede ser determinada por colorimetría. Estos extractos bacterianos pueden utilizarse como fitohormonas orgánicas para promover el crecimiento de plantas y rizogénesis *in vitro*.

Palabras clave: *microbiota nativa, triptófano, ácido indolacético, in vitro, papa.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes que, en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal (Potrie, 2013).

El término hormona empleado correctamente se aplica exclusivamente a los productos naturales de las plantas, mientras que el término regulador de crecimiento refiere tanto a los productos sintéticos como a los naturales.

Estos productos actúan de diversas formas, modificando el tamaño y/o forma del fruto, acelerando o retardando la floración, maduración y coloración, entre otras (Potrie, 2013).

La eficacia de las 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 and Arshad 1995).

Los reguladores de crecimiento de las plantas o fitorreguladores son compuestos orgánicos de origen natural o sintético que, como ya se dijo, en pequeñas concentraciones aceleran, inhiben o modifican de alguna forma los procesos fisiológicos de las plantas. El concepto de regulador de crecimiento es más amplio e incluye al de fitohormona cuando el regulador es producido por la misma planta (Coletto, 1994).

Tras el descubrimiento del ácido indol-3-acético (AIA) se produjo una verdadera explosión de investigaciones en todo el mundo. De inmediato se desarrollaron dos líneas de investigación: una, de sentido puramente fisiológico, causada por la curiosidad de determinar los mecanismos de acción de esas sustancias en la planta e interpretar los fenómenos de crecimiento que producen: dominancia apical, fototropismo, geotropismo, abscisión, etc. La otra línea de investigación se ha enfocado principalmente a las aplicaciones agrícolas que tienen las fitohormonas (Malavolta y Camargo, 1967).

El hecho fundamental, es que modifican el metabolismo de los vegetales logrando resultados que favorecen al hombre en su búsqueda incesante de acrecentar la producción de alimentos, fibras y otros productos de origen vegetal (Potrie, 2013).

Las dos clases de hormonas más importantes son las auxinas y las citocininas, que controlan la formación de la raíz, crecimiento del tallo y callo, aunque en ocasiones también se han usado las giberelinas para inducir el alargamiento de los tallos (Hartmann y Kester, 1987).

1.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la mayoría de los productos hormonales tienen interacción con sustancias químicas para poder alcanzar los estándares establecidos en la industria agroalimentaria; el uso indiscriminado de productos fertilizantes, ha ocasionado un desequilibrio de la microbiota nativa que cumple con funciones importantes, provocando bajos rendimientos y aumento en los costos para el agricultor y el ganadero. Una alternativa para promover el crecimiento de raíces y tallos es el uso de inoculantes microbianos (biofertilizantes), que contribuyen a la recuperación de las poblaciones existentes en el suelo y con ello a mejorar la fertilidad de los mismos (Sarmiento, 2006; Vessey, 2003).

La agricultura moderna depende en gran medida del uso de sustancias químicas sintéticas. Sin los herbicidas sintetizados de forma química para controlar las malezas y hormonas vegetales sintéticas para ayudar al crecimiento y a preservar los frutos, se producirían menos alimentos y los costos de éstos podrían incrementarse de manera considerable. Al mismo tiempo, existe una preocupación cada vez mayor respecto a que el uso intensivo de sustancias químicas artificiales en la producción de alimentos pueda representar riesgos sanitarios o ambientales. Por ejemplo la dioxina, subproducto de la síntesis de un herbicida sistémico hormonal auxínico (2,4-D). Aunque el 2,4-D no parece ser tóxico para los mamíferos, la dioxina puede causar defectos de nacimiento, enfermedad hepática y leucemia en los animales de laboratorio (Campbell *et al.*, 2001).

Por lo tanto, la dioxina es un peligro grave cuando se fuga al ambiente. Asimismo, muchos consumidores están preocupados en el sentido de que los alimentos producidos con ayuda artificial, pudieran no ser tan sabrosos y nutritivos como los cultivados de manera natural. Sin embargo, en la actualidad la producción de los alimentos orgánicos resulta relativamente cara. Estos asuntos involucran aspectos tanto económicos como éticos (Campbell *et al.*, 2001). Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal 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.

La inoculación con estas bacterias generalmente implica costos más bajos que el empleo de fertilización química; además de generar un menor impacto ambiental (Bashan *et al.*, 2004; Okon *et al.*, 1995).

La utilización del Ácido indolacético obtenido a partir de fermentación microbiana es una gran alternativa para la sustitución de algunos hormonales obtenidos por síntesis química.

1.3 HIPÓTESIS

El ácido indolacético obtenido por cinética de fermentación microbiana, ayudará a mejorar la capacidad agronómica del cultivo de papa *in vitro*.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la producción de ácido indolacético bajo fermentación sumergida utilizando bacterias promotoras de crecimiento y su evaluación *in vitro* en una especie de interés agrícola.

1.4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Optimizar la producción de ácido indolacético evaluando parámetros de pH, temperatura y tiempos de incubación.
- Evaluar el efecto de la concentración de triptófano, en la producción de ácido indolacético.
- Evaluar la efectividad biológica del ácido indolacético en papa a nivel *in vitro*.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades de hormonas de crecimiento vegetal

El concepto de hormona vegetal se deriva de los resultados obtenidos en experimentos relativos al fototropismo de coleoptilos, efectuados por Darwin que evidenciaron la existencia de una señal transportadora en las plantas (Villalobos, 2006) (Figura 1).

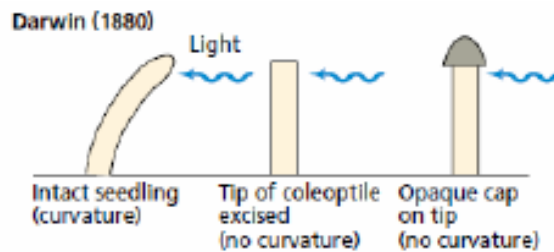


Figura 1. Experimento efectuado por Darwin.

Fuente: <http://bmv.fcien.edu.uy>

Al igual que los animales, las plantas producen hormonas en cantidades muy pequeñas, pero una pequeña cantidad de cualquiera de estas sustancias químicas puede tener efectos importantes en las células blanco (Campbell *et al.*, 2001)

Las hormonas vegetales son responsables de integrar el crecimiento, el desarrollo y la actividad metabólica de las plantas. Si bien el vocablo “hormona” significa “excitar”, sabemos que muchas hormonas también tienen efectos inhibitorios. Por esa razón, las hormonas se consideran reguladores químicos. Sin embargo, la respuesta a un “mensaje” regulador determinado, depende de numerosos factores: la estructura química de la hormona, la identidad del tejido específico sobre el que actúa y como es recibido y el efecto conjunto de otras hormonas (Curtis, 2006).

Las fitohormonas son compuestos orgánicos producidos por la misma planta, que en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de aquellas (Villalobos, 2006).

Son moléculas orgánicas sencillas que regulan la expresión de genes determinados; son sintetizadas en diferentes partes de la planta y pueden ser transportadas a otros sitios, actúan como mensajeros químicos, controlan el crecimiento y desarrollo de la planta, responden a cambios ambientales y regulan la expresión genética de la planta por lo que son capaces de desencadenar una respuesta bioquímica, fisiológica y morfológica (Aguilar *et al.*, 2008). En las plantas, como en los animales, estas vías conducen a respuestas celulares tales como la activación o desactivación de los genes, la inhibición o la activación de las enzimas, o los cambios en las membranas (Campbell *et al.*, 2001).

Tan sólo unas pocas moléculas de una hormona pueden alterar el metabolismo y el desarrollo de las células de una planta. Las hormonas hacen esto activando las vías de señal-transducción en las células blanco.

Las hormonas estimulan el crecimiento al dar la señal a las células blanco para que se dividan o se alarguen; algunas de las hormonas inhiben el crecimiento, al disminuir la división celular o el alargamiento. Los efectos de una hormona dependen de la especie de la planta, el sitio de acción de la hormona, la etapa de desarrollo de la planta, y la concentración de la hormona. En la mayor parte de las situaciones, ninguna hormona actúa sola en vez de ello, con frecuencia es el equilibrio de varias hormonas vegetales, sus concentraciones relativas, el que controla el crecimiento y desarrollo de una planta (Campbell *et al.*, 2001) (Figura 2).

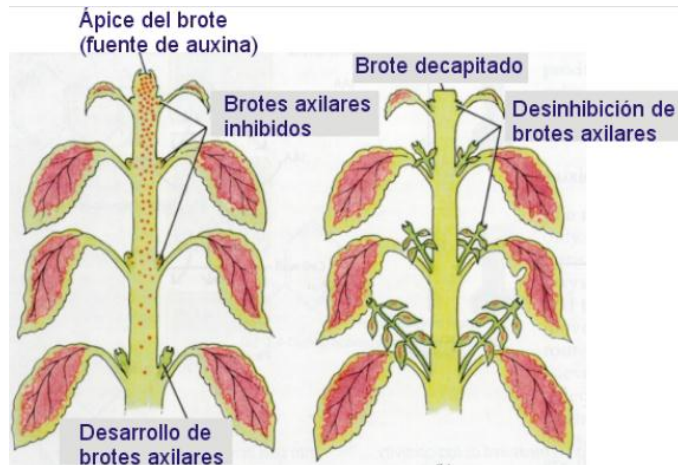


Figura 2 . Dominancia Apical, Acción coordinada auxinas/citoquininas.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular Vegetal <http://bmv.fcien.edu.uy>

Gran parte de lo que sabemos acerca de las hormonas vegetales tiene una aplicación directa en la agricultura. El control de la maduración del fruto y la producción de frutos sin semilla, son dos de los varios usos de estas sustancias químicas. Las hormonas vegetales también permiten a los granjeros controlar cuando se desprenderán los frutos. Por ejemplo, las auxinas se usan con frecuencia para prevenir que se desprendan los frutos de los naranjos y de los toronjos antes de que puedan ser recolectados (Figura 3).

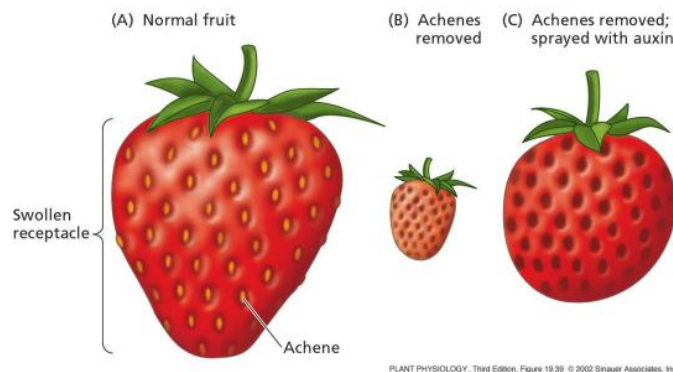


Figura 3. Semillas removidas por la aspersión de auxinas.

Fuente: www.fagro.edu.uy

La investigación sobre hormonas vegetales ha tenido otros giros. Uno de los herbicidas o controladores de maleza más utilizados es el 2,4-D, una auxina sintética que altera el equilibrio normal de las hormonas que regulan el crecimiento de la planta. Debido a que las dicotiledóneas son más sensibles a este herbicida que las monocotiledóneas, el 2,4-D puede utilizarse para retirar de manera selectiva a los dientes de león y otras malezas dicotiledóneas de hojas amplias de un prado o de terreno de cultivo (Campbell *et al.*, 2001).

2.1.1 Principales hormonas de crecimiento vegetal

2.1.1.1 Auxinas

Las auxinas promueven el desarrollo radicular al estimular la iniciación de la raíz en esquejes y su diferenciación, lo cual es evidente con la aplicación exógena de auxinas, donde la elongación de la raíz se ve disminuida cuando su concentración es baja. Son reconocidas como estimulantes de la producción de etileno en varios tejidos, incrementa el tamaño de los frutos al estimular el crecimiento de las células, ya que actúan sobre la elongación y la división celular jugando un papel fundamental en el crecimiento de órganos y frutos (Salisbury *et al.*, 1994).

2.1.1.2 Citoquininas

En 1913 Gottlieb Haberlandt descubrió un compuesto en el floema con la capacidad de estimular la división celular, trabajo que fue extendido en 1954 por Jablonski y Skoog. Fue solo hasta 1955 cuando Millar, aisló el compuesto y tomó su nombre por estimular la división celular y el proceso de citoquinesis (Davies, 1988) (Figura 4).

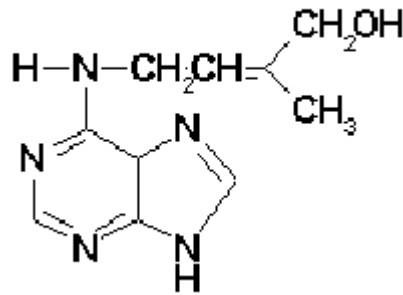


Figura 4. Estructura química de citoquinina,

Fuente: www.plant-hormone.info.

Las citoquininas estimulan la formación de brotes, promueven la división celular, ayudan a la germinación, inhiben el alargamiento del tallo, estimulan el crecimiento de los brotes laterales y retardan el envejecimiento de las hojas (Purves *et al.*, 2002; Salisbury, 1994).

2.1.1.3 Etileno

En 1935, Crocker propuso al etileno como regulador del crecimiento vegetal tras varios años de observación como regulador y como producto sintetizado por la planta (Davies, 1988).

Hoy en día es reconocido como un regulador del crecimiento vegetal de tipo gaseoso que promueve la senescencia, se produce en todas las partes de la planta y está involucrado en la maduración de los frutos al promover la senescencia lo que acelera la maduración, interviene en el mantenimiento del gancho apical en plántulas, en la diferenciación de la raíz y hojas, en la formación de raíces adventicias y estimula la maduración de los frutos (Purves *et al.*, 2002; Salisbury, 1994) (Figura 5).

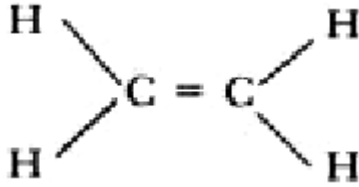


Figura 5. Estructura química del Etileno.

Fuente: www.plant-hormone.info.

2.1.1.4 Ácido Abscísico (ABA)

En 1963 fue identificado y caracterizado por Frederick Adicto, mientras estudiaba el compuesto responsable de la abscisión de la los frutos en el algodón. El ácido abscísico promueve la acumulación de las proteínas de almacenamiento en las semillas (Davies, 1988).

Inhibe el alargamiento del tallo, regula el intercambio de gas (CO₂) y vapor de agua entre las hojas y la atmósfera mediante sus efectos sobre los estomas, ya que estimula la oclusión de los estomas generalmente inhibe la función de otras enzimas como sucede con las giberelinas. (Purves *et al.*, 2002; Salisbury, 1994) (Figura 6).

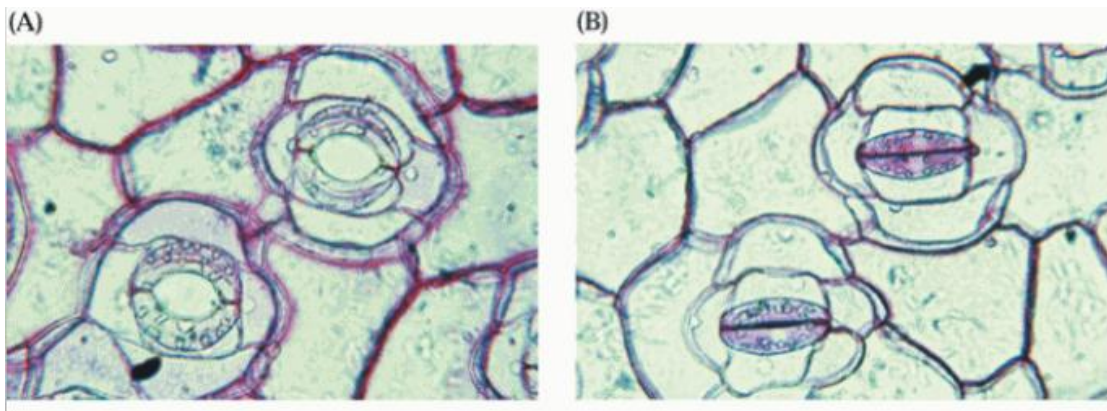


Figura 6. ABA: Cierre de estomas.

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular Vegetal <http://bmv.fcien.edu.uy>

2.1.1.5 Giberelinas (GAs)

Las GAs son determinantes en el control de la elongación del tallo, también modifican sustancialmente los procesos reproductivos de los vegetales, participando en el control de la inducción de la floración la cual se ha estudiado en *Arabidopsis thaliana* en la producción, crecimiento, y desarrollo de los frutos (Phillips, 1998). Así mismo sustituyen los requerimientos de luz o frío que precisan muchas de las semillas para germinar (Azcon and Bieto, 2000; Salisbury, 1994).

2.1.2 Generalidades de Auxinas

Desde la antigüedad, los naturalistas notaron que las plantas tienen capacidad de moverse en respuesta a la luz. Las auxinas fueron una de las primeras hormonas vegetales descubiertas (Curtis, 2006).

El término auxina se usa para describir una clase de sustancias químicas cuya función principal es promover el alargamiento de los tallos en desarrollo. Varias auxinas se encuentran de manera natural en las plantas, y muchas otras han sido sintetizadas por los químicos (Campbell *et al.*, 2001) (Figura 7).

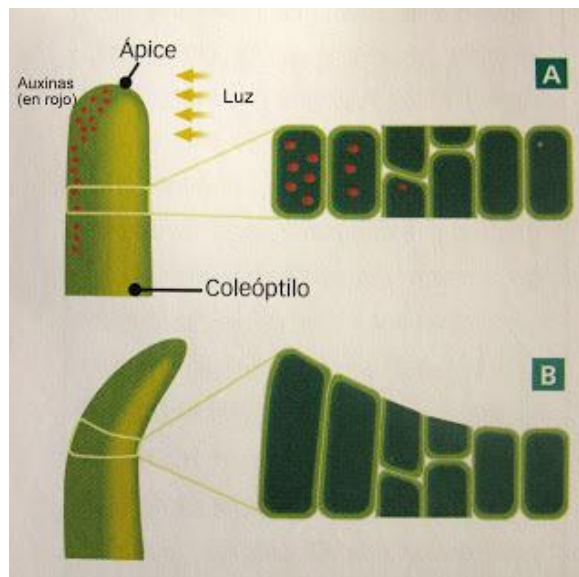


Figura 7. Auxinas promoviendo el crecimiento de las células en los tallos.

Fuente: Biología y Geología 1° BCN <http://ratonlaser.blogspot.mx/2013/02/fototropismo.html>

La curvatura hacia la luz, o fototropismo positivo, es una de las respuestas más evidentes de las plantas. El estudio del fototropismo dio lugar a numerosos experimentos que llevaron a dilucidar el papel así como la estructura de las hormonas vegetales y sus efectos (Curtis, 2006) (Figura 8).

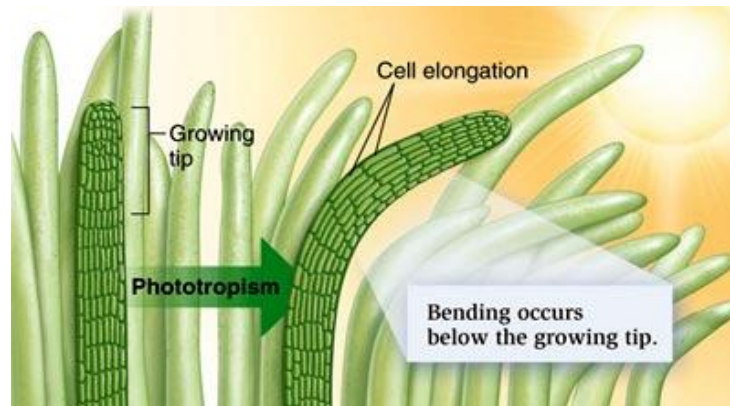


Figura 8. Auxinas y su respuesta a la luz (Fototropismo).

Fuente: Biología y Geología 1° BCN <http://ratonlaser.blogspot.mx/2013/02/fototropismo.html>

Fueron Charles Darwin y uno de sus hijos, Francis, quienes en 1880 realizaron uno de los primeros experimentos sobre fototropismo trabajando con plántulas de gramíneas, identificaron las zonas específicas de las plantas que perciben el estímulo responsable de la curvatura hacia la luz. Los Darwin concluyeron que la exposición a una luz lateral causaba alguna “influencia” que se transmitía desde la parte superior a la inferior del ápice del vástago y que, además, provocaba su curvatura.

En 1926, el fisiólogo botánico holandés Frits W. Went (1903-1990) logró coleccionar la hasta entonces intangible “influencia” en pequeños bloques de agar. A partir de una serie de ingeniosos experimentos, Went pudo concluir que el estímulo que provoca la curvatura de las plantas es químico. Lo llamó auxina, a partir de la palabra griega auxein, “incrementar”. Poco menos que una década después de los experimentos de Went, en 1934 el fisiólogo vegetal Kenneth V. Timan (1904-1997) aisló y purificó la primera auxina. La denominó ácido indolacético (AIA) (Curtis, 2006).

Durante mucho tiempo se consideró al AIA como la única auxina natural en las plantas (Villalobos, 2006).

2.1.3 La Función de Auxinas

Las auxinas desempeñan un papel decisivo en muchos procesos del desarrollo vegetal como crecimiento, tropismos, enraizamiento de esquejes, diferenciación vascular, etc. (Figura 9).



Figura 9. Enraizamiento de esquejes en Sauce llorón.

Fuente: <http://www.portalbonsai.com/historico/categoria.asp>

Teniendo en cuenta la localización de la biosíntesis de la auxina (ápice del tallo, hojas), se debe considerar que el transporte de la hormona desde los lugares de biosíntesis hasta los tejidos y órganos implicados en las respuestas puede resultar clave en estos procesos.

Las auxinas generalmente producen: alargamiento y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), además formación de raíces adventicias; inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente inducen embriogénesis en los cultivos en suspensión (Bidwell, 1979; Kyte, 1983; Pierik, 1990).

Hoy se sabe que las auxinas participan en muchas respuestas de las plantas además de la respuesta fototrópica, como la formación de raíces adventicias y la elongación de tallos y raíces. Las auxinas se sintetizan, principalmente, en los meristemos apicales de los vástagos y circulan dentro de la planta en una sola dirección, desde el ápice del tallo a la raíz o desde el ápice de la raíz hacia la base de la planta (Curtis, 2006) (Figura 10).



Figura 10. Formación de raíces adventicias Izquierda: tratamiento con AIA y testigo.
Fuente:<http://bmv.fcien.edu.uy>

Con frecuencia, se utilizan dosis grandes de auxinas de manera intencional para promover la caída prematura del fruto. Por ejemplo, se puede asperjar auxinas en los manzanos y en los olivos para entresacar los frutos en desarrollo; los frutos restantes crecerán más grandes.

En combinación con las auxinas, las giberelinas se usan para producir frutos sin semilla (Campbell *et al.*, 2001).

Bidwell (1979) resume de la siguiente manera las funciones en las que participan las auxinas (Figura 11):

- Formación de órganos (interactúa con las citocininas)
- Organización de tejidos (interactúa con otros factores)
- Estimulación de la división celular (interactúa con las citocininas)
- Alargamiento celular (estimula a través de la secreción de protones)
- Relajación de la pared celular (estimula a través de la secreción de protones)

- Síntesis del RNA y de las proteínas
- Dirección del transporte
- Efectos enzimáticos
- Producción de etileno
- Respuestas trópicas y násticas (a veces quizá debidas al etileno)
- Dominancia apical
- Prevención de la abscisión

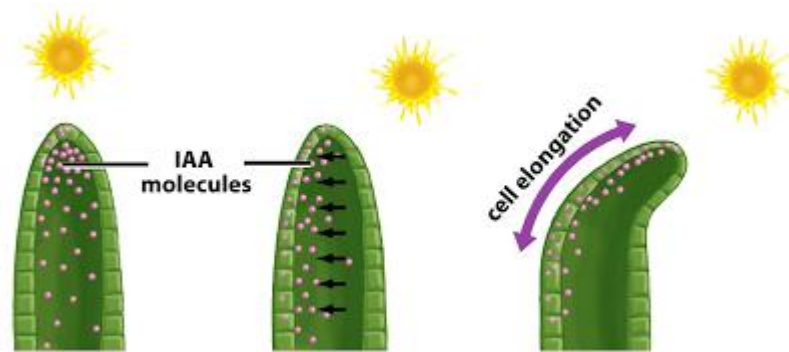
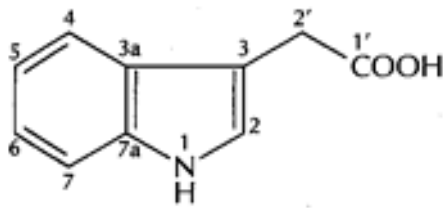


Figura 11. Alargamiento Celular.

Fuente: Biología y Geología 1° BCN <http://ratonlaser.blogspot.mx/2013/02/fototropismo.html>

2.1.4 Acido indolacético

Después de que el ácido indol-3-acético (AIA), ya conocido desde 1886, fue aislado de la orina (1934) e identificado como la auxina descubierta por Went en 1928, se produjo una verdadera explosión de investigaciones en todo el mundo, no solo por el gran interés despertado por este nuevo campo de investigaciones, sino también por la facilidad de obtención de las fitohormonas sintéticas, que comenzaron a ser producidas en condiciones comerciales (Audus, 1964; Malavolta y Camargo, 1967) (Figura 12).



Ácido-3-indolacético

Figura 12. Estructura del ácido indolacético.

Fuente: Soberón J. R., et al 2008.

El ácido indolacético (AIA) es la auxina natural más importante, aunque existen otros compuestos denominados auxinas sintéticas que producen efectos similares al AIA y se utilizan en la práctica agrícola. Algunas auxinas, como el propio AIA, son sintetizadas por algunos microorganismos como *Azospirillum sp.*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc (Patten and Glick 1996).

El AIA es sintetizado en la planta a partir del L-triptófano, que puede estar libre o formando parte de proteínas (Soberón J. R et al., 2008).

2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal han sido relacionados con el metabolismo del nitrógeno, a través de la fijación biológica en condiciones de *vida libre* o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas, pero han tenido una menor significancia agronómica respecto de lo que se esperaba inicialmente.

En contrapartida, uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal, estaría relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, tales como ácido indol acético; citocininas (Tien et al., 1979);

giberelinas (Bottini *et al.*, 1989) y etileno (Strzelczyk *et al.*, 1994), así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007) y la diamina cadaverina (CAD) (Cassán *et al.*, 2003).

En un ensayo preliminar realizado por Lara (2011) con la bacteria que mostró la mejor producción de auxina del género *Azotobacter sp.* se determinó el efecto de diferentes concentraciones de inóculo (1×10^6 ; 1×10^7 ; 1×10^8 UFC/mL) en la longitud del tallo y longitud de hojas de pastos Angleton (*Dyckanthium aristatum*).

Los resultados demostraron que el 67,66% de las plantas inoculadas con la cepa nativa, presentaron mayor promedio en altura del tallo, longitud de hojas y un notable desarrollo vegetativo de la planta.

Por otro lado la bibliografía en general considera a *Azospirillum sp.* como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola (Bashan *et al.*, 2004). Uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal en plantas inoculadas con *Azospirillum sp.*, se relaciona con su capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas (Okon and Labandera 1994). En tal sentido, sabemos que cerca del 80% de las bacterias aisladas de rizosfera son capaces de producir compuestos del tipo ácido indole-3-acético (Cheryl and Glick 1996).

Azospirillum sp. es una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre, aislada de la rizósfera y del espacio intracelular de la raíz de varias plantas. Muchos reportes han mostrado un mejoramiento del crecimiento de la planta y la producción de granos por la inoculación de *Azospirillum sp.* a la planta. La respuesta observada se ha atribuido a varios mecanismos que pudieran operar simultáneamente entre ellos: la producción por la bacteria del ácido indol-3-acético (AIA) (Bashan, 1990) (Dobbelele *et al.*, 2001).

El género *Azospirillum sp.* son bacterias Gram negativas heterotróficas, fijadores de nitrógeno de vida libre, pertenecen a la subclase α de las proteobacterias. Es considerada una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB), por el beneficio obtenido posterior a la inoculación de la bacteria, en una amplia variedad de plantas (Bashan, 1990; Dobbela *et al.*, 2001).

La inoculación con PGPB modifica el sistema radicular por un mecanismo o mecanismos aún no completamente establecidos; sin embargo, éste se atribuye al menos en parte, a la producción por la bacteria de sustancias que regulan el crecimiento vegetal, conduciendo a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz, lo que promueve la captación de agua y minerales (Bashan, 1990; Okon and Itzigsohn, 1995; Okon and Kalpunik, 1986).

La inoculación con estas bacterias generalmente implica costos más bajos que el empleo de fertilización química; además de generar un menor impacto ambiental (Bashan *et al.*, 2004; Okon *et al.*, 1995).

Azospirillum sp., un ejemplo de bacteria promotora de crecimiento vegetal, produce principalmente ácido indol-3-acético (AIA) y en menor cantidad ácido indol-3-butírico (IBA) citocininas y giberilinas (Bottini *et al.*, 1989; Hartmann *et al.*, 1983; Martínez *et al.*, 2003; De Troch *et al.*, 1997) (Figura 13).

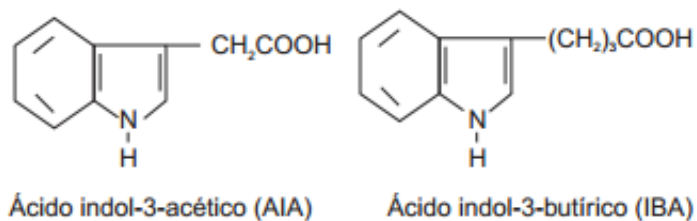


Figura 13. Estructura química de las principales auxinas producidas por bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

2.3 Optimización de ácido indolacético

Una etapa decisiva en la producción microbiológica de fitohormonas es la determinación de su rendimiento, lo que implica la puesta a punto de métodos de separación y cuantificación de la hormona presente en los caldos de fermentación (Castillo *et al.*, 2005).

La producción de AIA depende de la especie, las cepas, las condiciones de cultivo, concentración de Triptófano, pH, oxigenación y la fase de crecimiento (Crozier *et al.*, 1988; Omay *et al.*, 1993). La cepa *A. brasilense* UAP 154 aislada de maíz, produce AIA y en menor cantidad IBA. (Martínez *et al.*, 2003). La producción de AIA es óptima bajo los siguientes parámetros: Cultivo adicionado con Trp, oxigenación, pH 5.5, e inicio de la fase estacionaria (Crozier *et al.*, 1988; Ona *et al.*, 2005).

Asimismo, la adición de las vitaminas piridoxamina y ácido nicotínico, al medio de cultivo favorece la producción de AIA. La síntesis de AIA es estimulada por factores de estrés como: la limitación de fuente de carbono y condiciones de microaerofilia (Zakharova *et al.*, 2000).

2.4 Origen del Cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L), es originaria de Sudamérica, de la zona andina comprendida entre Ecuador, Perú y Bolivia. Su existencia data desde el año 2500 a. C., en la época de los egipcios. Este cultivo fue domesticado por los incas o civilizaciones preincaicas muchos miles de años antes de la llegada de los españoles en 1537 (SEP, 1983).

En México desde 1925 se registraron estadísticas de producción en este cultivo; pero fue hasta el año de 1946 con la llegada de John S. Neiderhauser, de la fundación Rockefeller, en donde se le dió mayor impulso a la papa porque se encontraron buenas condiciones climáticas para este cultivo; principalmente, en los Valles Altos de la Meseta Central de este país. Siendo la región de León,

Guanajuato, Distrito Guerrero en el Estado de Chihuahua y en Navidad, Nuevo León en donde se empezó a sembrar este cultivo en forma extensiva (Báez, 1983).

2.4.1 Producción de papa

La producción media de papa a nivel mundial en el año 2002 fue de 15.7 ton/ha, los altos rendimientos fueron mostrados por los países bajos seguidos por Estados Unidos de Norte América (USA) con 45 y 40.5 ton/ha respectivamente; México se ubicó en la posición número 37 con 23.1 ton/ha (Espinoza *et al.*, 1985).

El mejor promedio de rendimiento de papa en el año 2002 en el Continente Americano lo obtuvo USA, seguido de Argentina y Canadá con 45.0, 27.3 y 24.3 ton/ha respectivamente, México ocupó el sexto lugar con 23.1 ton/ha mientras que Bolivia y Paraguay obtuvieron bajos rendimientos con 7.0 y 6.1 ton/ha respectivamente (Espinoza *et al.*, 1985).

En México la papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las hortalizas de mayor importancia. Anualmente siembran alrededor de 63,800 hectáreas con una producción de 1,483.000 ton/año. Los principales estados productores son: Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Estado de México, Sinaloa, Sonora y Zacatecas. En la región de Coahuila y Nuevo León, se cultiva el 7 % de la superficie total nacional con un rendimiento promedio de 30-40 ton/ha (SAGARPA, 2002) (Figura 14).



Figura 14. Principales Estados Productores de Papa en México.

Fuente: Anónima, datos de la SIAP.

En Coahuila y Nuevo León siembran anualmente 6500 hectáreas de papa, registrando una producción de 30 ton/ha, rendimiento considerado alto para este cultivo en México. A pesar del alto rendimiento que se registra en la zona papera del noreste, el beneficio económico para los productores se reduce porque estos invierten entre el 25 y 35% del costo del cultivo. Este costo se debe a que la mayoría de los productores carecen de semilla sana de variedades y/o clones tolerantes a enfermedades y/o resistentes a condiciones adversas para la región (Parga *et al.*, 2007; Villavicencio, 2005).

2.4.2 Superficie Cosechada de cultivo de papa

La superficie cosechada ha seguido el mismo comportamiento que la superficie sembrada. Sinaloa es el estado que mayor superficie cosechada aporta, en promedio 12 mil hectáreas. En 2007, Chihuahua ocupó el tercer lugar y el Estado de México el cuarto. El año en que menor superficie se cosechó fue 2006, siendo ésta de 61.2 mil hectáreas, lo que representa, 1.7 miles de hectáreas menos que en 2005, aproximadamente. Los estados en los que se observó de manera importante esta disminución fueron: Sinaloa y Sonora, principalmente (SIAP/SAGARPA, 2002).

Por el contrario, en 2001 se alcanza el nivel más alto en este rubro: 68.3 miles de hectáreas, 0.3 mil hectáreas más que en el año 2000 (Figura 15).

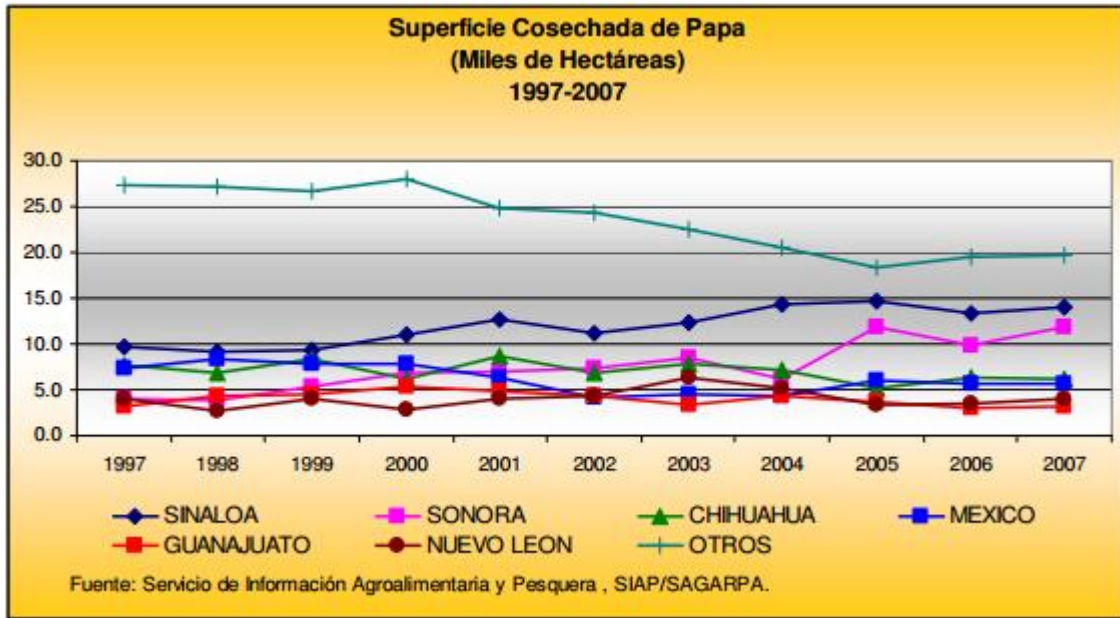


Figura 15. Superficie cosechada de Papa en México. Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP/SAGARPA.

2.5 Producción de Vitroplantas en laboratorio

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Para esto se requiere de un medio de cultivo y condiciones apropiadas para promover el crecimiento del explante. Lo anterior debe llevarse a cabo en forma aséptica, es decir el cultivo debe estar libre de contaminantes, bacterias y hongos principalmente (Morozava *et al.*, 1978) (Figuras 16 y 17).



Figura 16. Ejemplo de Cultivo de tejidos vegetales.

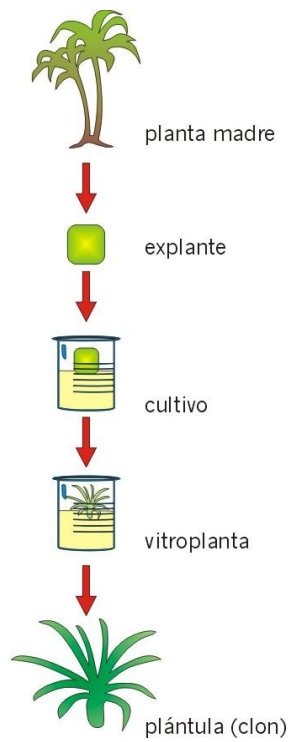


Figura 17. Cultivo de vegetales, explante.

Fuente: cultivodevegetales.blogspot.mx

2.5.1 La función de los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante puesto que actualmente se reconoce que la mayor parte (si no la totalidad) de la actividad fisiológica está mediada por éstos (Devlin, citado por Hurtado y Merino, 1991). Se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores: ya sea para conseguir el alargamiento y/o la división celular (Pierik, 1990).

De los reguladores de crecimiento conocidos, los más importantes en el cultivo de tejidos vegetales son: auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico; los cuales pueden influir en múltiples procesos (Torres, 1988).

Las diferencias en los requerimientos de reguladores de crecimiento para la multiplicación de brotes y la producción de callo depende del genotipo, tipo y concentración de los reguladores de crecimiento (Uddin *et al.*, 1988) así como de las hormonas endógenas de los explantes (Reynolds *et al.*, 1982; Gulati y Jaiwal, 1992).

2.5.2 Reguladores de Crecimiento más Comunes Utilizados en Cultivo *In Vitro*

De las auxinas "naturales", el AIA es el compuesto de mayor utilización (Torres, 1988; Scott, citado por Krikorian, 1991a). Sin embargo, existen otras auxinas también llamadas "naturales", que incluyen al indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-alcetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indolpropiónico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido indol-3-acetilaspártico (Krikorian, 1991a).

Otras sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que han sido producidas químicamente; son las llamadas "auxinas sintéticas", entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AiB se encuentran ampliamente disponibles y su utilización es muy común. En relación al AIA se les considera más activas. Existen también muchos compuestos de amplia utilización que son derivados

de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (clorosustituídos) (Pierik, 1990; Krikorian, 1991a).

En los estudios *in vitro* también han sido utilizados a bajas concentraciones el ácido 4-clorofenoxiacético o ácido p-clorofenoxiacético (4-CPA, PCPA), ácido (2,4,5,-triclorofenoxi) acético (2,4,5-T), ácido 3,6-dicloro-2-metoxi benzoico (Dicamba), y el ácido amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Torres, 1988).

Con respecto a las citocininas, Murashige (1974) y Kyte (1983) consignan a la cinetina, iso-pentil adenina (2iP, también llamada 6-(y,y-dimetilalil) aminopurina y la benciladenina (BA, o bencilaminopurina, BAP) como las más disponibles ya que son manufacturadas sintéticamente.

2.6 Micropropagación

Existen conceptos tan sencillos de micropropagación como los expresados por Villalobos y Thorpe (1991), quienes señalaron que "la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro*".

Originalmente, la micropropagación se definió como "cualquier" procedimiento aséptico que comprende la manipulación en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Krikorian, 1991b).

De igual forma, Hartmann y Kester (1987) definen la micropropagación como un proceso que consiste en producir plantas a partir de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y la nutrición.

Está demostrado que bajas concentraciones de fitohormona son capaces de estimular el desarrollo vegetal y altas concentraciones inhiben y reducen la zona de alargamiento, teniendo en cuenta que los microorganismos nativos están adaptados a condiciones y ambientes propios, sólo realizando bioensayos

“*in vitro*” se podría encontrar la dosis adecuada y comprobar el efecto ejercido sobre los cultivos a aplicar (Hernández, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005).

2.6.1 Micropropagación en Papa

Espinoza *et al.*, (1985) y López-Delgado (1999), mencionan que la producción de papa se ve limitada por la falta de semilla de calidad libre de patógenos. En la agricultura el cultivo de tejidos puede abarcar varios aspectos; propagación clonal, eliminación de virus y almacenamiento de germoplasma. El cultivo de tejidos como técnica consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

El cultivo de tejidos en papa permite:

- a) Generar un banco de germoplasma con material sobresaliente.
- b) Propagar clonalmente un gran número de plántulas libres de patógenos en corto tiempo.
- c) Realizar la micropropagación todo el año o bien programar la producción para períodos cuando exista mano de obra disponible.
- d) Conservar material en condiciones controladas.
- e) Contar con material para propagación y/o exportación permanentemente.
- f) Emplear poca mano de obra (López *et al.*, 1998; Escalante, 1989).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Descripción del área experimental

3.1.1 Cuantificación, caracterización y optimización

Esta se realizó en los laboratorios de Biología Molecular, fitoquímicos y Microbiología de la empresa Biorganix Mexicana S. A de C. V, ubicada en el municipio de Ramos Arizpe Coahuila, abarcando cuatro etapas las cuales se describen a continuación (Figura 18).



Figura 18. Diagrama de flujo empleada para la obtención de AIA y su evaluación en plantas.

3.1.2 Evaluación del efecto biológico de extractos bacterianos parcialmente purificado con presencia de ácido indolacético.

La fase de evaluación del efecto biológico de los extractos bacterianos de AIA se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Ubicada en el municipio de Saltillo, Coahuila.

3.2 Etapa I: Optimización de la producción de ácido indolacético evaluando parámetros de pH, temperatura y tiempos de incubación.

3.2.1 Producción de promotores de crecimiento

Aislamiento de promotores de crecimiento.- Las bacterias promotoras de crecimiento se aislaron a partir de plantas de gramínea (*Zea mays*) por personal de la compañía Biorganix Mexicana S. A de C. V. Se utilizó el medio de bacterias fijadoras de nitrógeno (Nfb) modificado por Weber (1999) (pH: 5.5) adicionado con: 3 g·L⁻¹ de ácido málico + 2 g·L⁻¹ glucosa + 5 mL (solución 10%) de K₂HPO₄ + 2 mL (solución 10%) de MgSO₄·7H₂O + 2 mL (solución 1%) CaCl₂·2H₂O + 2 mL verde bromocresol (0.5%) y 2 g·L⁻¹ agar. Medio JMV (pH 4.5) adicionado con: 3 g·L⁻¹ de manitol + 2 g·L⁻¹ de sacarosa + 2 mL K₂HPO₄ (solución 10%) + 15 mL KH₂PO₄ (solución 10%) + 2.2 g·L⁻¹ de agar. Estos medios se utilizaron para el aislamiento de bacterias microaerófilas que se desplazan a zonas con tensión de oxígeno.

Para aislamiento de bacterias aerobias se utilizó el medio Ashby (pH 5.8) (Becking, 2006) adicionado con: 5 g·L⁻¹ de sacarosa + 5 g·L⁻¹ de glucosa + 0.2 g·L⁻¹ de KH₂PO₄ + 0.2 g·L⁻¹ de MgSO₄, 0.2 g·L⁻¹ de NaCl + 0.2 g·L⁻¹ de CaSO₄, + 5 g·L⁻¹ de CaCO₃ + 15 g·L⁻¹ de agar. Además, se probó medio Burk y Jensen para el aislamiento de géneros *Rhizobium* y *Azotobacter sp.*

Las pruebas se realizaron por triplicado y se incubaron a 30 °C por 5 días o hasta observar crecimiento, los tubos de ensayo con velo en la parte superior y cajas petri con crecimiento de colonias, se transfirieron a medio sólido NFB para su aislamiento y purificación.

Se realizaron resiembras sucesivas para purificar las bacterias en medio NFB y en cristal violeta para continuar su purificación (Agar nutritivo, cristal violeta 1% 10 uL·mL⁻¹).

3.2.2 Producción de ácido indolacético (AIA)

Una vez teniendo las cepas purificadas se procedió a la producción de ácido indolacético (AIA) de acuerdo al método propuesto por Sachdev *et al.*, (2009) utilizando medio LB modificado por Atlas (1946) elaborado con: 10 g·L⁻¹ de triptona +, 5 g·L⁻¹ de extracto de levadura y 5.8 g·L⁻¹ de NaCl adicionado con triptófano 1 mg·mL⁻¹. A este medio se adicionaron 100 uL de bacterias promotoras de crecimiento crecidas durante 18 horas a 28°C (540 nm, densidad óptica: 0.5). Posteriormente, se transfirieron a 100 mL de medio de cultivo en matraces de 250 mL previamente esterilizados y se dejaron en agitación constante a 150 rpm durante 96 horas a 28°C para la producción del AIA.

3.2.3 Cuantificación de ácido indolacético por métodos colorimétricos

Para la cuantificación de AIA los cultivos se centrifugaron por 10 minutos a 14000 rpm para mantener el caldo libre de células y se les añadió el reactivo de Salkowski (600 mL de H₂SO₄ 18M + 4.5 g de FeCl₃ anhidro y se completó hasta 1 L con agua destilada) de acuerdo a lo proporcionado por Rives *et al.*, (2009) en una relación 1:1. Estos cultivos se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y se determinó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20, Thermospectronic) (Figura 19). Paralelamente se elaboró una curva patrón con AIA sintético (grado técnico) a concentraciones de 0.007 mg·mL⁻¹ hasta 0.25 mg·mL⁻¹.



Figura 19. Espectrofotómetro utilizado para la determinación colorimétrica.

3.1.2.1 Curva Patrón de Ácido Indolacético

Para la realización de la curva de reactivo Salkowsky, se procedió a hacer una solución madre de AIA estándar a las concentraciones indicadas en el Cuadro 1 (Figura 20).

Cuadro 1. Curva patrón de AIA y absorbancia promedio de las muestras.

mg·mL ⁻¹	ppm	Absorbancia 530 nm
0.005	5	0.185
0.01	10	0.342
0.015	15	0.495
0.02	20	0.596
0.025	25	0.689
0.03	30	0.834
0.035	35	0.934
0.04	40	1.063

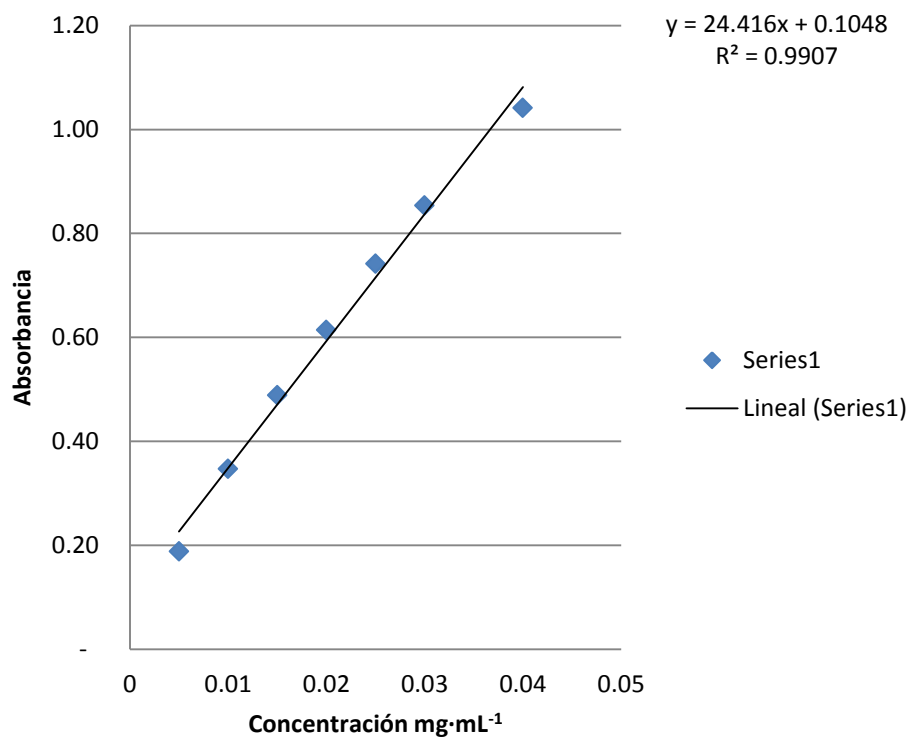


Figura 20. Curva de calibración de reactivo Salkowski.

3.2.4 Cinética de fermentación microbiana

Las bacterias se inocularon con 100 μL de la suspensión bacteriana ajustada a una densidad óptica de 0.5 a 540 nm en medio de cultivo líquido Luria Bertanii (LB), el cual se preparó con: 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de tristona + 5.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl + 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de levadura y se le adicionó triptófano a una concentración de 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a un pH de 7.0 ± 2 . Se colocaron 100 mL de esta muestra en matraces de 250 mL, las cuales se nombraron como JR y AR9. Éstas se denominaron así por el medio de cultivo utilizado JR2= Jensen de raíz dilución 2, y AR9= Ashby de raíz, dilución 9. Con tres repeticiones cada una. (JR₁, JR₂, JR₃ y AR9₁, AR9₂, AR9₃). Teniendo así 6 matraces en total.

Se tomaron muestras por triplicado ya que una se utilizó para conocer su densidad óptica en espectrofotómetro (Genesys 20, Thermospectronic) a 540 nm, otra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos (microcentrífuga, Spectrafuge 16M) y posteriormente se utilizó para determinar el crecimiento microbiano por colorimetría utilizando el reactivo de Salkowski (600 mL de H₂SO₄ 18M, + 4.5 g de FeCl₃ anhidro y se completó hasta 1 L con agua destilada) de acuerdo a lo proporcionado por Rives *et al.*, (2009) en una relación 1:1. Se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente y después se leyó en espectrofotómetro a 530 nm (Genesys 20, Thermospectronic), realizándose cada tiempo por duplicado. La tercera muestra se congeló y posteriormente se envió al CINVESTAV unidad Saltillo, departamento de Recursos Naturales para su análisis por HPLC (Figuras 21, 22, 23 y 24).

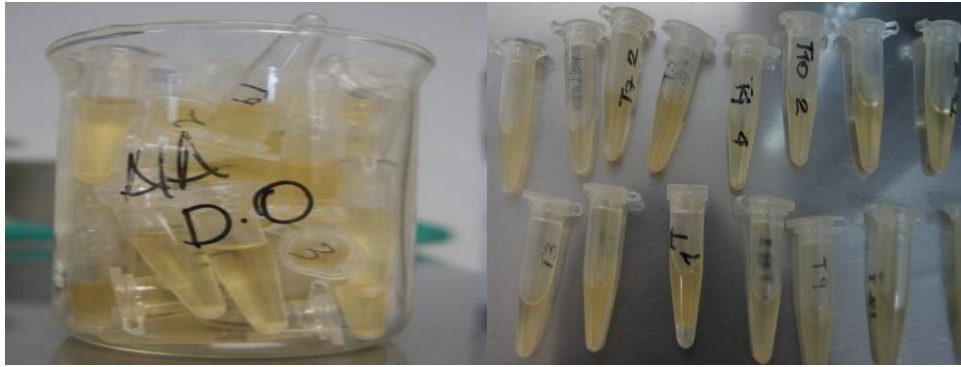


Figura 21. Muestras que se utilizaron para conocer su densidad óptica.

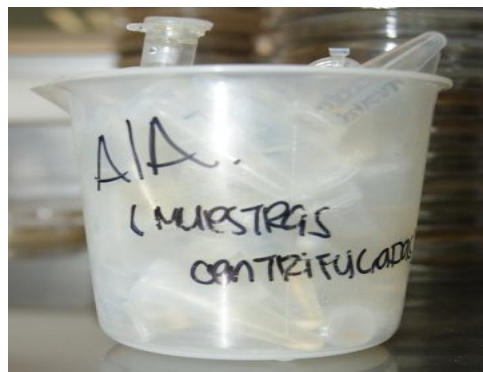


Figura 22. Muestras Centrifugadas en Spectrafuge 16M.



Figura 23. Centrifuga utilizada Spectrafuge 16M.



Figura 24. Muestras listas para leerse en espectrofotómetro, Genesys 20, Thermospectronic.

3.2.5 Cuantificación y caracterización de promotores de crecimiento obtenidos en la cinética de fermentación microbiana.

Se tomaron muestras de 1 mL de los 100 mL del caldo de cultivo microbiano que se encontraban en los matraces de 250 mL ya mencionados, a las 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 96 horas después de la inoculación. Las muestras antes descritas se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos (microcentrífuga, Spectrafuge 16M) tomando del sobrenadante una alícuota de 1 mL la cual se puso en tubos de ensaye y de éstos se tomó 500 µl y se pasaron a otros tubos de ensaye, teniendo así cada muestra por duplicado de 500 µl cada una para la determinación cuantitativa de AIA. A los cultivos libres de células se les añadió el reactivo de Salkowski (600 mL de H₂SO₄ 18M, 4.5 g de FeCl₃ anhidro y se completó hasta 1 L con agua destilada) de acuerdo a lo proporcionado por Rives *et al.*, (2009), sometiéndolos así a reacción en proporción de 1:1 del patrón de AIA. Luego se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente leer las muestras en espectrofotómetro a 540 nm en celdillas de cuarzo (Figura 25). Se leyeron 8 muestras por duplicado de JR1, JR2 y JR3, leyéndose así 48 muestras en total para la cuantificación.

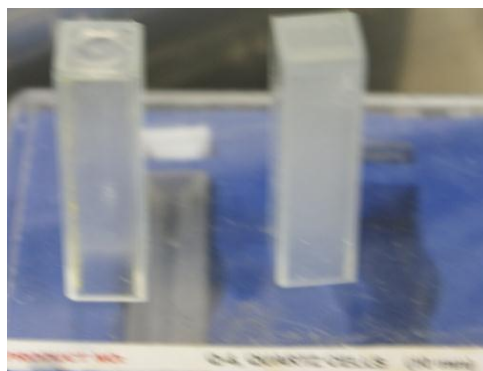


Figura 25. Celdillas de cuarzo utilizadas para la lectura en espectrofotómetro.

3.3 Optimización de parámetros cinéticos para la producción de ácido indolacético.

Para optimizar la producción de Ácido Indolacético se evaluaron parámetros cinéticos de consumo los cuales fueron: tiempo, pH, temperatura y cantidad triptófano.

3.3.1 Primera cinética de fermentación para obtener tiempo de incubación

Para conocer el tiempo óptimo de producción se realizó una cinética como se ha hecho anteriormente. Se trabajó con la bacteria JR teniendo tres repeticiones. Se usaron matraces de 250 mL con 100 mL de muestra del caldo de cultivo microbiano y se incubó (Shaker Fine PCR SV12) a 28°C con un pH de 7.5 (Figura 26). Los tiempos que se manejaron para la evaluación fueron cada 8 y 16 horas: 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 96 horas. Se tomó una muestra de cada repetición, de 1 mL cada una y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad.



Figura 26. Matrices con medio LB para la producción de AIA.

Se leyó la densidad óptica de las muestras de cada tiempo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm para observar el crecimiento microbiano presente.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de AIA de cada tiempo, para ello, las muestras se centrifugaron (microcentrífuga, Spectrafuge 16M) a 14, 000 rpm por 10 minutos y se tomó una alícuota del sobrenadante de 1 mL. Se puso en tubos de ensaye y de éstos se tomaron alícuotas de 500µl por duplicado. A estas se les agregó la misma cantidad del reactivo de Salkowski y se dejaron incubando por 30 minutos a temperatura ambiente las cuales se leyeron en espectrofotómetro a 530 nm (Figura 27).



Figura 27. Muestra primera cinética, lectura en espectrofotómetro.

3.3.2 Efecto del pH en la producción de AIA

Para la optimización del pH se evaluaron 6 variables: pH de 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 y 8.0. La cantidad de pH descrita, se ajustó usando Ácido fosfórico para disminuir el valor e Hidróxido de Potasio para aumentar el valor (Figura 28) utilizando un potenciómetro (Denver Instrument UB-10) el cual se ajustó con solución buffer de 4 y 7 al iniciar la evaluación (Figura 29).



Figura 28. Hidróxido de potasio y Ácido fosfórico utilizados para ajustar el pH de las muestras.



Figura 29. Potenciómetro y solución buffer 4 y 7 utilizadas para su ajuste.

Se utilizaron matraces de 250 mL con 100 mL de muestra del caldo de cultivo microbiano LB adicionado con triptófano con tres repeticiones de cada variable analizando cada uno por duplicado; los matraces se incubaron en un shaker a

28°C (Shaker Fine PCR SV12) tomando la lectura de las muestras al tiempo establecido en la cinética anterior de mayor producción.

De cada repetición se tomó 1 mL de cada muestra para analizar por colorimetría. Se centrifugaron a 14, 000 rpm por 10 minutos, al sobrenadante se le añadió el reactivo de Salkowski a una relación 1:1 y se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente tomar lectura de las muestras a 530nm en espectrofotómetro para la evaluación de AIA.

3.3.3 Efecto de la Temperatura en la producción de AIA

Para esta evaluación se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 4 x 6. En la evaluación se consideró como factor A la temperatura y como factor b el pH. La temperatura a evaluar fue de 26°C, 28°C, 30°C y 32°C considerando como testigo la de 28°C propuesta por Sachdev *et al.*, (2009). Cada una de estas interactuó con el pH de 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 con 3 repeticiones cada una. El pH se ajustó con Ácido fosfórico para disminuirlo e Hidróxido de Potasio para aumentarlo.

Se utilizaron matraces de 250 mL de capacidad con 100 mL de muestra cada uno, se usaron 3 matraces por interacción pH – temperatura, usando un total de 18 matraces por temperatura.

Los matraces se incubaron a las diferentes temperaturas mencionadas por el tiempo establecido en la primera cinética de fermentación. La temperatura utilizada se programó en el Shaker (Shaker Fine PCR SV12). Las alícuotas de 2 mL de cada matraz, (una para el análisis colorimétrico y otra para HPLC), se cuantificaron por la técnica del reactivo de Salkowsky antes descrito. Éstas se evaluaron por duplicado excepto la de 26°C que se hizo por triplicado teniendo así 36 evaluaciones por temperatura (la de 26°C 54 evaluaciones), que hicieron un total de 162 evaluaciones.

Etapas II: Evaluación del efecto de la concentración de triptófano en la producción de ácido indolacético.

3.3.4 Efecto de la concentración triptófano en la producción de AIA

Para conocer la cantidad de triptófano óptima, se trabajó con seis concentraciones las cuales fueron 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2000 mg·L⁻¹. Se utilizaron matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo LB a los cuales se les añadió 50µl de inóculo. Se incubaron por 80 horas a 32°C con un pH de 7.5. Se realizaron 3 repeticiones de cada concentración, obteniendo así 18 matraces en total. Se tomaron alícuotas de 1 mL por duplicado de cada matraz para analizarlos por la técnica colorimétrica antes descrita.

3.3.5 Segunda Cinética de fermentación microbiana para la producción de ácido indolacético.

Ya evaluados los parámetros de pH, temperatura, cantidad de triptófano y tiempos de incubación, se realizó una cinética cada ocho horas y los últimos dos tiempos cada 4 horas, siendo así la toma de las muestras a las 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 76, y 80 horas. Se tomaron cuatro muestras de 1 mL cada tiempo, colocándolas en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad.

Se usaron matraces de 250 mL con 100 mL de muestra del caldo LB con la concentración de triptófano óptima y se incubaron en un shaker (Shaker Fine PCR SV12) a la temperatura óptima y pH óptimo. Se leyó la densidad óptica de las cuatro muestras de cada tiempo, y se analizó la producción de AIA por colorimetría.

3.4 Purificación parcial del ácido indolacético

Para la purificación parcial de la fitohormona obtenida, primeramente se centrifugaron las muestras de 1mL de AIA a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante, se filtró utilizando filtros Puradisc de 0.45 μm con jeringas de 3 y 5 mL y posteriormente utilizando un sistema de filtración milipore® por 0.2 μm para obtener un caldo de fermentación libre de células. Las muestras ya filtradas se enviaron al CINVESTAV, Unidad Saltillo, al departamento de Recursos Naturales para el análisis por cromatografía de líquidos de alta presión, HPLC para obtener la cantidad exacta de AIA en la muestra y su evaluación en plántulas (Figuras 30 y 31).



Figura 30. Filtros Puradisc utilizados para la filtración de AIA.



Figura 31. Muestra filtrada lista para ser enviada al CINVESTAV.

Etapa III: Evaluación de la efectividad biológica del ácido indolacético purificado parcialmente en cultivos de interés agrícola a nivel *in vitro*.

3.5 Micropropagación *in vitro* de papa

3.5.1 Material vegetativo

Del banco de germoplasma de papa del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL se seleccionó la variedad Alpha, del cual se tomaron segmentos de tallo + yema axilar como explantes. Los explantes fueron establecidos en frascos tipo Gerber® en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

3.5.2 Medio de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fueron las sales inorgánicas del medio Murashige-Skoog (1962) con la adición de mio-inositol; glicina, piridoxina, ac. nicotínico y tiamina como fuentes de vitaminas y aminoácidos, así como sacarosa como fuente de carbono (Cuadro 2, Figuras 32 al 34). Este se esterilizó en una autoclave eléctrica a una presión de 1 kg/cm² y a una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Cuadro 2. Compuestos del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

MACROELEMENTOS	PESO MOLECULAR (g)
NH₄NO₃	80.4
KNO₃	101.11
MgSO₄·7H₂O	246.48
KH₂PO₄	136.09
Ca(NO₃)₂	236.15
MICROELEMENTOS	
IK	166.01
H₃BO₃	61.83
MnSO₄·4H₂O	228.0
ZnSO₂·7H₂O	287.54

Na₂MoO₄·2H₂O	241.95
CuSO₄·5H₂O	249.68
CoCl₂·6H₂O	239.93
QUELATOS	
Na₂EDTA	372.24
FeSO₄·7H₂O	278.28
VITAMINAS	
Acido Nicotínico	0.50
Piridoxina	0.50
Tiamina	0.1
Myoinositol	100.0
AMINOACIDOS	
Glicina	2.0
Sacarosa	30.0 g/L
Agar	6.0 g/L
Ph	5.7



Figura 32. Medio de Cultivo Murashige-Skoog (1962).



Figura 33. Fuentes de vitaminas y azúcar para el medio MS.



Figura 34. Sales Inorgánicas para el medio básico Murashige-Skoog (1962).

3.5.3 Evaluación del efecto biológico de extractos obtenidos en la optimización en germinación *in vitro* a diferentes concentraciones en plántulas.

Para evaluar el efecto del AIA en explantes de papa se utilizó un diseño experimental completamente al azar evaluando la exposición del extracto bacteriano a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm), más un testigo. Las concentraciones referidas se inyectaron al medio de cultivo considerando 5 mL de una suspensión acuosa de los siguientes tratamientos (Cuadro 3, Figuras 35 y 36).

Cuadro 3. Tratamientos evaluados con cuatro concentraciones de AIA en vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Alpha.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION AIA (ppm)
1 (testigo)	0.0
2	0.25
3	0.5
4	1.0
5	2.0

Cada evaluación constó de 5 tratamientos (mencionados en el cuadro 3), con tres repeticiones cada uno y cada repetición con 6 plántulas. Teniendo así 18 plantas por tratamiento, 90 por evaluación. Este experimento se realizó por duplicado (Figura 36).

Las condiciones de incubación fueron de 16:8 horas luz, oscuridad con temperatura de 25 °C.



Figura 35. Aplicación de los tratamientos de AIA al medio MS.



Figura 36. Extractos bacterianos a diferentes concentraciones. Cada uno corresponde a un tratamiento.

Cada evaluación constó de 5 tratamientos, con diez repeticiones cada uno, considerando como repetición un envase con 6 vitroplantas, teniendo así 60 plantas por tratamiento, haciendo un total de 300 vitroplantas por evaluación. Este experimento se realizó por triplicado. Las condiciones de incubación fueron de 16/8 horas luz, a una temperatura de 25 °C.

3.5.3.1 Variables evaluadas:

Concluido el período de incubación, se tomó registro de la 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 explantes (NE), número de raíces (NR), peso fresco de raíz (PF) y peso seco de raíz (PS).

3.5.3.1.1 Altura foliar

Para la altura foliar (AF) se midió en centímetros (cm) con una hoja milimétrica, registrando la altura del follaje de cada planta (Figura 37).

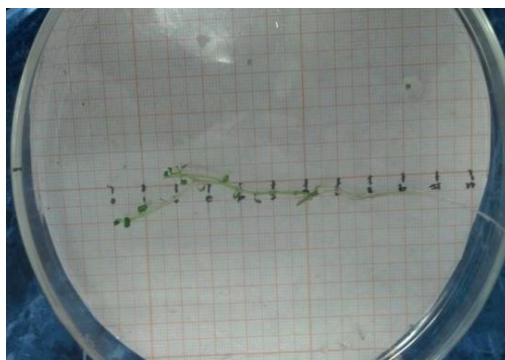


Figura 37. Midiendo altura foliar de las plántulas.

3.5.3.1.2 Longitud de Raíz

Para conocer la longitud de raíz (LR) de cada vitropianta se midió en centímetros (cm) con una hoja milimétrica (Figura 38).

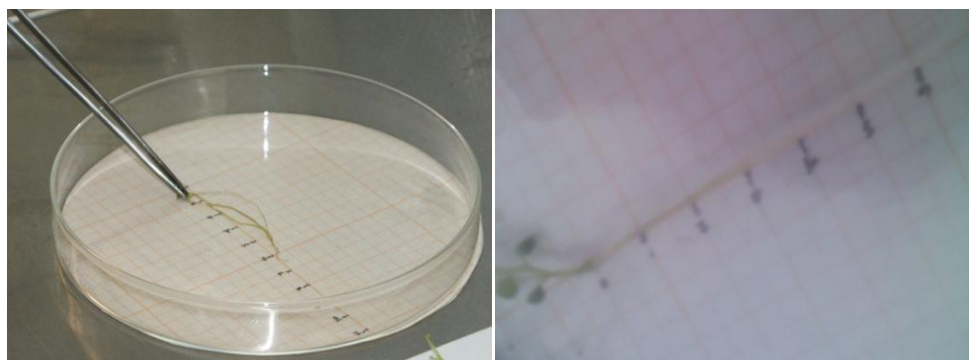


Figura 38. Midiendo longitud de raíz de las plántulas.

3.5.3.1.3 Número de explantes

El conteo de explantes (NE) se hizo de manera visual utilizando de referencia la yema axilar, estos explantes se subcultivaron en medio fresco para seguir la fase de multiplicación (Figura 39).

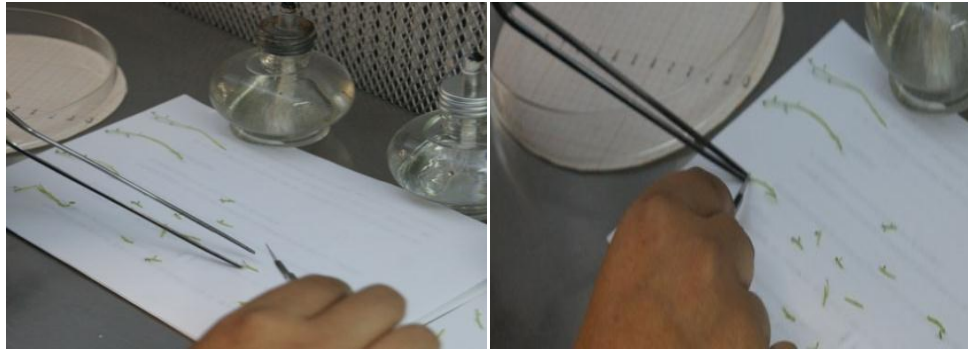


Figura 39. Trasplante de explantes para una posterior evaluación.

3.5.3.1.4 Número de raíces

El conteo del número de raíces (NR) se realizó de manera visual con ayuda de pinzas, sacando cada vitroplanta de los frascos, a las que se les quito el agar sobrante y posteriormente se hizo el conteo para así anotar los datos en la bitácora.

3.5.3.1.5 Peso fresco y seco de raíces

Para obtener el peso fresco (PF) se cortaron las raíces de las vitroplantas y se les quitó el exceso de agar, el sistema radicular se pesó en una balanza analítica (Scientech, SA 802) en miligramos (mg). Después se dejaron secar a temperatura ambiente entre 3 a 5 días para así obtener el peso seco (PS) de la misma manera (Figuras 40, 41 y 42).



Figura 40. Cortando raíz para pesar y obtener peso fresco.



Figura 41. Peso de raíz en balanza analítica.



Figura 42. Raíces expuestas a temperatura ambiente para posteriormente obtener su peso seco.

3.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos tanto en la cinética para pH, temperatura y cantidad de triptófano se analizaron en el programa estadístico R versión 12.4.2 mediante análisis de varianza y estratificación de medias por la prueba de Tukey y DMS con un alfa de 0.05.

Los datos obtenidos de las variables evaluadas en el ensayo de multiplicación *in vitro* de papa se analizaron estadísticamente mediante el procedimiento GLM del Sistema de Análisis Estadístico SAS versión 6.0 (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.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cinética de fermentación microbiana

De las muestras de 1mL obtenidas de los matraces con 100 mL de caldo LB inoculado con la cepa JR2 y AR9, a las 0, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80, y 120 horas, se observó que el mayor crecimiento microbiano obtenido por densidad óptica, se encontró a las 60 horas para ambas cepas, estabilizándose en las horas posteriores (Figura 43).

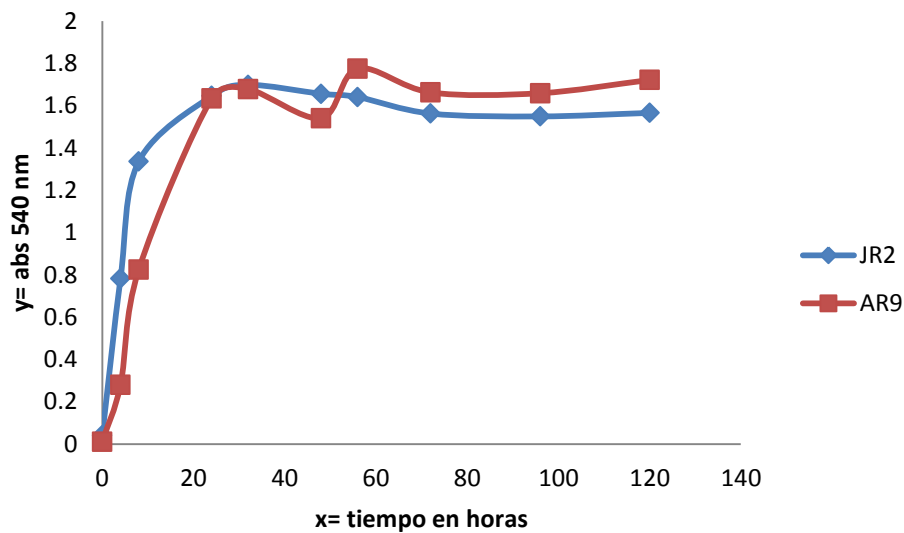


Figura 43. Cinética de crecimiento microbiano después de 120 horas de producción.

Los resultados mostraron que ambas bacterias tienen alta producción de AIA (Figura 43), con lo que se confirma lo dicho por Sarmiento, 2006; Halda A., 2003 y Pedraza, 2004 donde los géneros NFB han demostrado que además de fijar nitrógeno en forma asimbiótica, también segregan sustancias promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas, citoquininas).

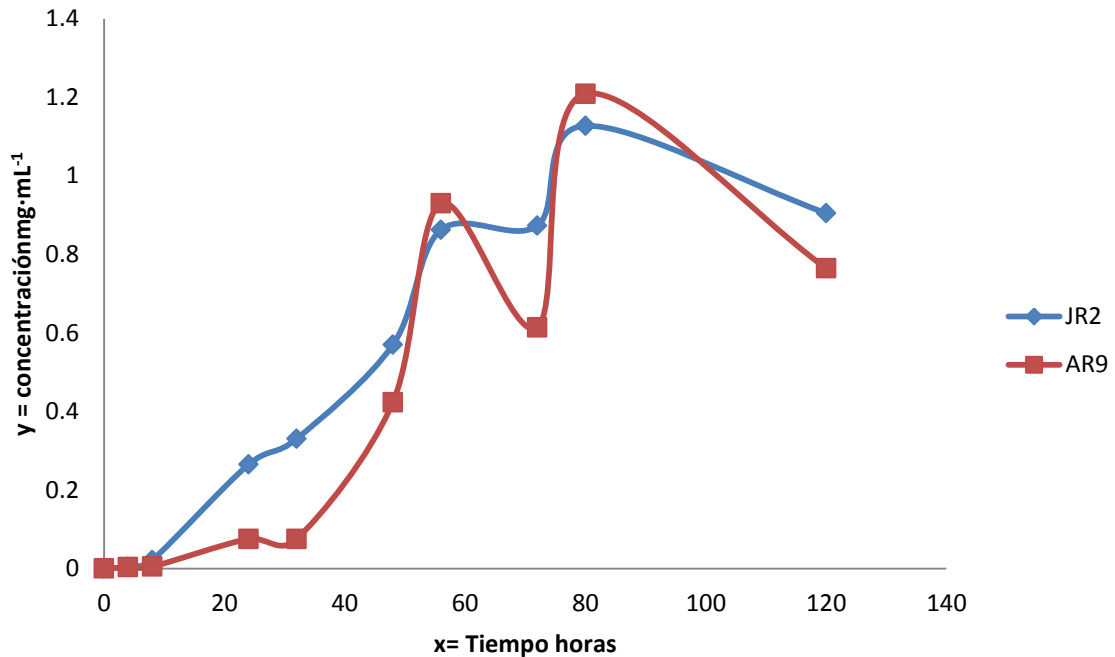


Figura 44. Concentración de AIA producido después de 120 horas de exposición.

Las cepas JR2 y AR9 mostraron la mayor producción a las 80 horas, lo que difiere por lo encontrado por Sachdev *et al.*, (2009) en donde cepas de *Klebsiella* produjeron la concentración más elevada a 72 horas de incubación con valores máximos de 22.7 ppm. El Cuadro 4, muestra la concentración obtenida de AIA expresada en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de las cepas evaluadas JR2 y AR9.

Cuadro 4. Concentración de AIA mg·mL⁻¹ obtenido por JR2 Y AR9 en un periodo de tiempo de 120 horas.

	JR2	AR9
Tiempo	Concentración AIA mg·mL ⁻¹	Concentración AIA mg·mL ⁻¹
0	0	0.00
4	0.00	0.00
8	0.02	0.00
24	0.26	0.07
32	0.33	0.07
48	0.56	0.42
56	0.86	0.92
72	0.87	0.61
80	1.12	1.20
120	0.90	0.76

Los resultados encontrados en este trabajo sobre la producción del AIA difieren con los obtenidos por Lara (2011) donde evaluó la producción de AIA por fermentación bacteriana obteniendo un rango de producción de auxina de 3,00 a 45,00 ppm (mg·L⁻¹) de aislados de los géneros *Azotobacter sp.* y *Azospirillum sp.* frente a 1120 y 1200 mg·L⁻¹ de la cepa JR2 y AR9 a las 80 horas respectivamente; es decir, las cepas de microorganismos utilizadas en el presente trabajo, se extienden en un mayor rango de producción de AIA que los comparados anteriormente.

4.2 Optimización de parámetros cinéticos para la producción de ácido indolacético.

4.2.1 Cinética de fermentación para obtener tiempo de incubación.

La figura 45, muestra la cinética de crecimiento microbiano que se realizó con la cepa JR2 y AR9 después de 96 horas de exposición; se observa que antes de las 80 horas llegan a su crecimiento máximo con una producción de $1.34 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AIA.

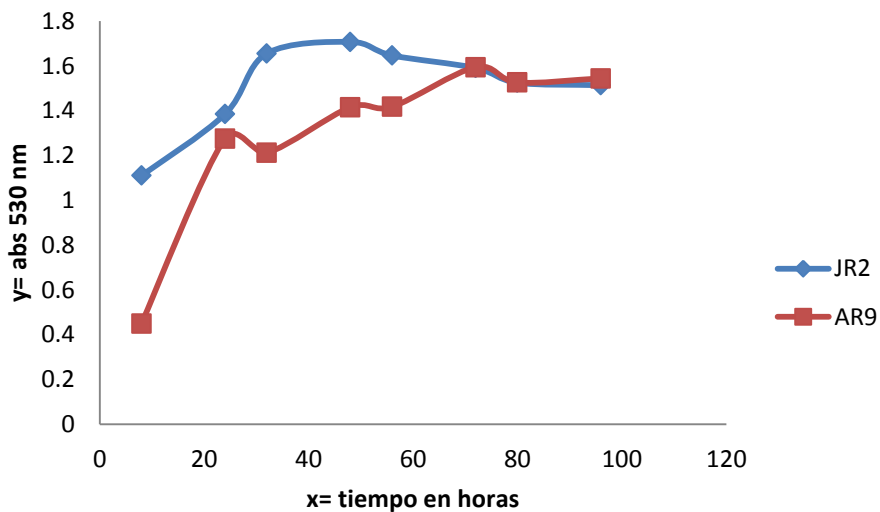


Figura 45. Concentración de AIA producido después de 96 horas de exposición.

De acuerdo a lo reportado por Celis B. (2008), encontró una producción de AIA de $60 \text{ ug}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio BT y $72 \text{ ug}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio TSB, en el sexto día de cultivo, en comparación a los $1340 \text{ ug}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtenidos con la cepa JR2 al tercer día de cultivo utilizando medio LB adicionado con triptófano como precursor.

4.2.2 Efecto del pH en la producción de AIA

La figura 46 muestra que el pH óptimo para la producción de AIA fue el pH de 7 y 7.5 los cuales no muestran diferencias significativas entre sí con valores de producción de 0.75 y 0.85 mg·mL⁻¹ respectivamente; esto concuerda con lo reportado por Hernández M. *et al.*, (2008) donde utilizaron medio de cultivo Luria-Bertani (LB) con un pH de 7 y lo reportado por Lara (2011) donde para la producción de AIA el pH fue ajustado a un valor de 6.8 al medio líquido Burk's.

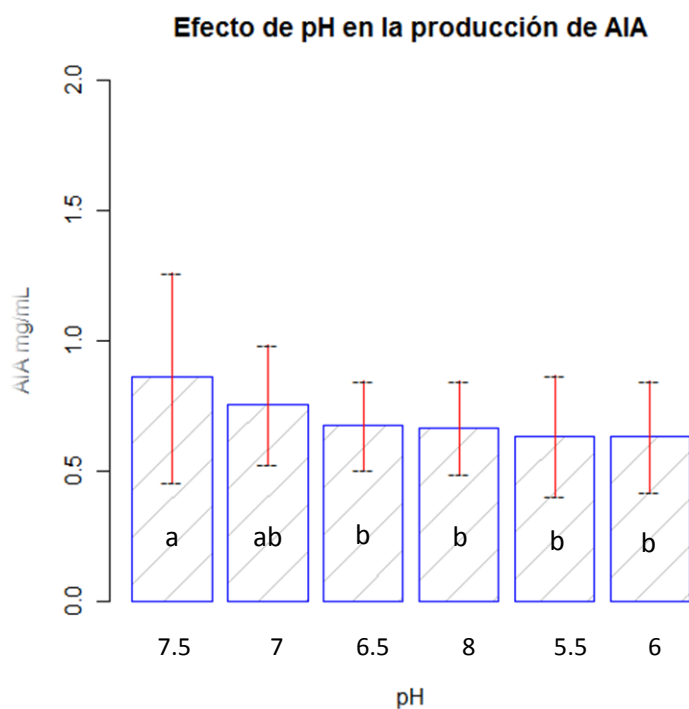


Figura 46. Diferentes pH y su producción de AIA.

4.2.3 Efecto de la Temperatura en la producción de AIA

La figura 47 muestra el efecto de la temperatura en la producción de AIA en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acuerdo a las 4 temperaturas evaluadas.

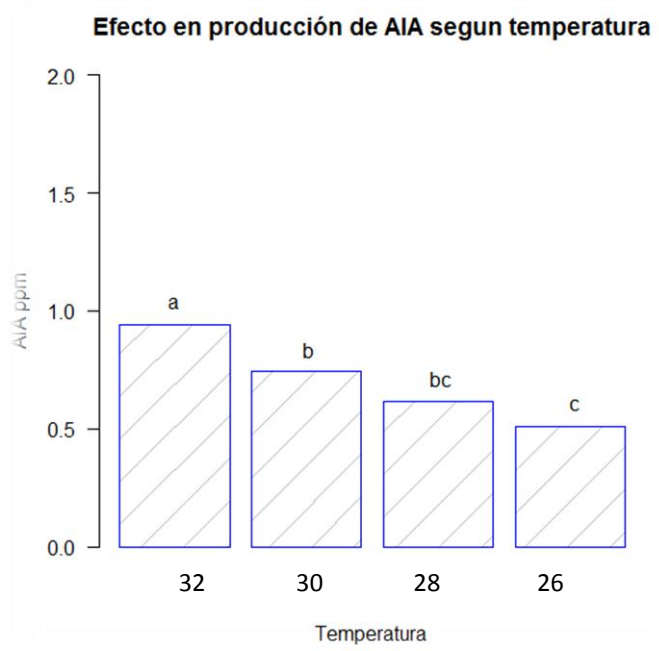


Figura 47. Temperatura en °C y su concentración de AIA

Se encontró que la temperatura óptima de producción fue 32 °C con un valor de producción de $0.94 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 5) ya que existe diferencia altamente significativa entre las demás variables ($p=4.376\text{e-}07$ ***), lo que difiere con lo publicado por Castellanos (2009) y Lara (2011); donde emplearon una temperatura de 28 °C y 30 °C respectivamente, para su producción.

Cuadro 5. Prueba de comparación múltiple de medias a través de Tukey alfa 0.05 con datos de temperatura.

Tratamiento	AIA $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Grupo
26°C	0.510	c
28°C	0.617	bc
30°C	0.741	b
32°C	0.940	a

6.2.1 Concentración triptófano

La figura 48 muestra la cantidad de triptófano en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en relación con su producción de AIA $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

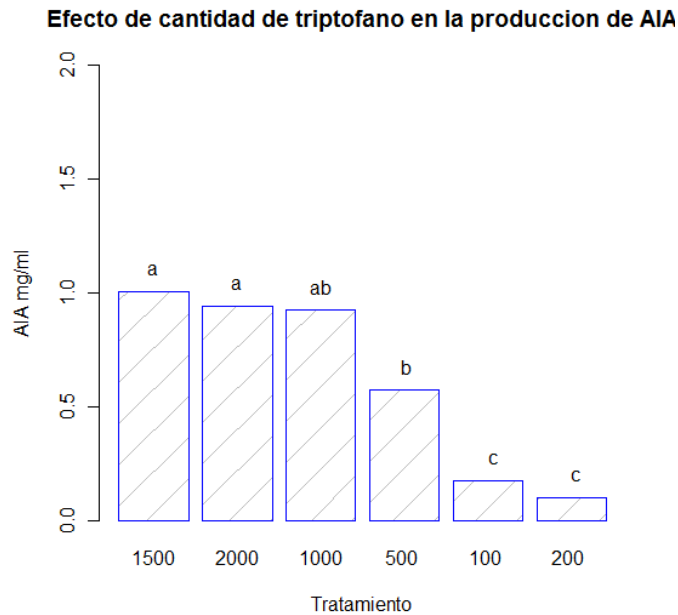


Figura 48. Cantidad de triptófano en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y su concentración de AIA $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

De acuerdo a la figura 48, se puede observar que no existen diferencias significativas entre las cantidades de triptófano con 1000, 1500 y 2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptófano con valores de AIA de 0.92, 1.00, 0.94 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente (Cuadro 6). Con lo que concuerda con lo reportado por Hernández M. *et al.*, (2008) donde enriquecieron su medio LB con 1,000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptófano.

Cuadro 6. Prueba de comparación múltiple de medias por Tukey 0.05, con datos de cantidad de triptófano.

Tratamiento $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AIA $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Grupo
1,500	1.00	a
2,000	0.94	a
1,000	0.92	a
500	0.57	ab
100	0.17	b
200	0.09	b

6.3 Cinética de fermentación microbiana para la producción de ácido indolacético con los parámetros cinéticos evaluados.

Para corroborar los parámetros evaluados anteriormente, se corrió una cinética con un pH de 7.5, triptófano de 1000 mg·L⁻¹ y una temperatura de 32 °C, obteniendo una producción promedio de 0.84 mg·mL⁻¹ a las 72 horas.

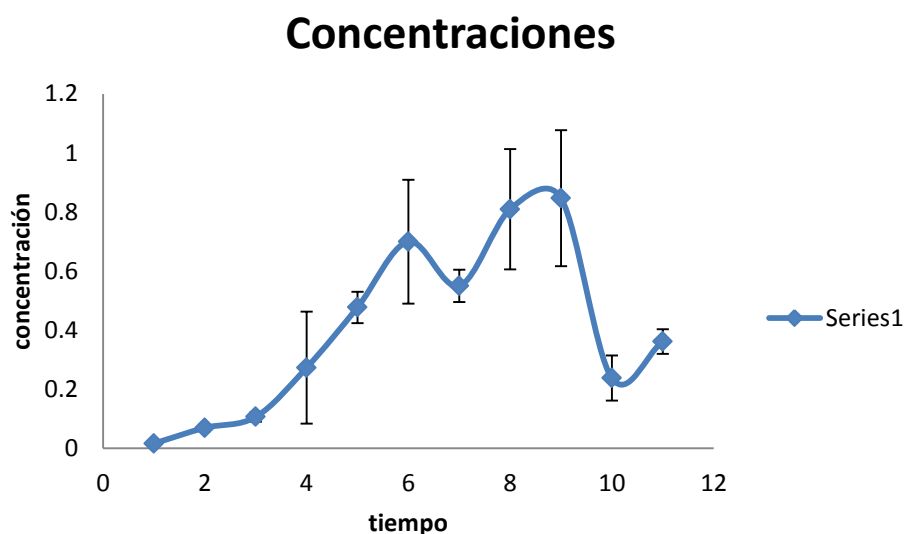


Figura 49. Cinética pH 7.5, triptófano 1,000 mg·L⁻¹ y temp 32°C.

6.4 Evaluación del efecto biológico de extractos bacterianos parcialmente purificado con presencia de ácido indolacético.

6.4.1 Micropropagación *in vitro* de papa

Los resultados del análisis de varianza muestran diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) entre las concentraciones de AIA aplicadas al medio de cultivo para las seis variables evaluadas, registrando una altura foliar (AF) promedio de 4.45 cm, longitud de raíces (LR) de 5.06 cm, número de raíces (NR) de 5.51, raíces/vitroplanta, número de explantes (NE) de 5.2

explantes/vitroplanta, peso fresco de raíces (PF) de 31.81 mg y peso seco de raíces (PS) de 3.88 mg por vitroplanta (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de medias para la altura foliar (AF), longitud de raíces (LR), número de raíces (NR), número de explantes (NE), peso fresco, (PF) y peso seco de raíces, obtenidas durante la multiplicación *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Alpha en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL.

Tratamiento	AIA (ppm)	AF (cm)	LR (cm)	NR	NE	PF (mg)	PS (mg)
1. Testigo	0.0	3.58 b	6.93 a	3.58 c	4.69 b	14.65 c	2.28 c
2.	0.25	4.83 a	5.98 b	4.44 bc	5.47 a	40.04 ab	3.83 b
3.	0.5	4.37 a	5.18 c	5.11 b	5.11 ab	25.15 bc	4.16 b
4	1.0	4.82 a	4.40 d	7.22 a	5.47 a	45.65 a	5.73 a
5	2.0	4.63 a	2.80 e	7.22 a	5.25 ab	33.54 ab	3.39 bc
Pr (>F)			2.2e-16	2.2e-16		1.175e-05	1.119e-12
Media		4.56	5.06	5.51	5.20	31.81	3.88
r²		0.38	0.73	0.45	0.11	0.39	0.32
CV		20.20	18.19	33.53	22.73	72.83	45.53

ppm = Partes por millón; AIA = ácido indolacético; LR = Longitud de raíz; NR= Número de raíces; PF= Peso fresco; PS= Peso seco

6.4.1.1 Altura foliar

Al analizar los tratamientos como efectos independientes encontramos que los tratamientos con 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de AIA fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$) registrando la mayor altura foliar (AF) con el tratamiento en bajas concentraciones de AIA (T2 = 0.25 ppm) y con la concentración de 1.0 ppm, registrando en promedio una AF de 4.83 cm; mientras que el testigo (0.0 ppm) registró la menor AF con 3.58 cm existiendo una diferencia del 25.87% entre estos tratamientos. Esto muestra que el extracto bacteriano de AIA influye

tanto en bajas como altas concentraciones en la altura foliar (AF) de las vitroplantas de papa y que el efecto auxínico se refleja en el crecimiento de altura foliar (AF), efecto que también se ha reportado en vitroplantas de otras especies como *Spathiphyllum* var. Chopin con el mismo extracto bacteriano y en caña de azúcar pero con otro extracto bacteriano obtenido de la cepa *Rhizobium* sp., a una concentración menor de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Jiménez *et al.*, 2006) (Cuadro 7, Figuras 50 y 51).



Figura 50. Plántulas de papa alpha en medio MS donde se puede observar su altura foliar.



Figura 51. Comparación de testigo y tratamiento 2 (0.25ppm).

6.4.1.3 Longitud de raíces

Al analizar los tratamientos como efectos independientes encontramos que todos los tratamientos evaluados fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) determinando que el testigo generó mayor longitud de raíces (LR) registrando en promedio 6.93 cm. En orden de importancia le siguieron los tratamientos con bajas concentraciones de AIA (0.25 y 0.5 ppm) quienes registraron una LR de hasta 5.98 cm. Los resultados muestran que en concentraciones mayores de 1.0 ppm de AIA la LR disminuye, registrando un LR de 2.80 cm, existiendo una diferencia entre el tratamiento con AIA y sin AIA (testigo) del 60 % (Cuadro 7, Figura 52).



Figura 52. Raíces de plántulas de papa variedad alpha.

Estos resultados muestran que la LR se disminuye conforme aumenta la concentración de AIA en el medio de cultivo.

Esto difiere con lo reportado por Patten y Glick, 2002, quienes mencionan que la raíz de las plantas es uno de los órganos más sensibles a las fluctuaciones de AIA y cuando se aplica en una dosis óptima se observa un alargamiento de la raíz primaria y un aumento de la producción de raíces adventicias. En el caso de las vitroplantas de papa la dosis óptima para promover la longitud radicular, se obtiene con dosis bajas de AIA (0.25 ppm), lo que muestra que en ciertas especies no es necesario aplicar altas concentraciones de auxinas para estimular la producción y el desarrollo de raíces como lo refieren Taiz y Seiger, (2002).

6.4.1.2 Número de Explantes

Al analizar los tratamientos como efectos independientes encontramos que los tratamientos con 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 ppm de AIA fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$). El mayor número de explantes (NE) se registró con los tratamientos de AIA en las concentraciones de 0.25 y 1.0 ppm, obtenido en promedio un NE de 5.47 explantes/vitroplantula; seguidos de los tratamientos de AIA en las concentraciones de 0.5 y 2.0 ppm donde el NE fue menor, registrando 5.2 explantes/vitroplantula. Los resultados muestran que existe una diferencia entre el mejor tratamiento con AIA (0.25 ppm) y el testigo (0 ppm) del 15%, donde se presentó el menor número de brotes, registrando en promedio 4.69 explantes/vitroplantula (Cuadro 7, Figura 52).



Figura 53. Raíces de plántulas de papa variedad alpha.

Los resultados no muestran una tendencia entre las dosis de AIA aplicadas, como se ha reportado en otras evaluaciones realizadas por Kartha *et al.*, (1977) en donde se obtuvo una alta frecuencia en la inducción y diferenciación de brotes con la combinación de benciladenina (BA) y zeatina (Zea), adicionadas con ácido indolacético (AIA). La interacción de ambas fitohormonas promovió en tomate var. Starfire; la inducción de brotes a partir de meristemas apicales generando de 15 hasta 20 brotes/explante.

Con el tomate híbrido Blazer, Zárate *et al.*, (1988) también se logró obtener la inducción de brotes *in vitro* a partir de explantes axilares encontrando diferencias con la aplicación de diferentes combinaciones de reguladores de

crecimiento, registrando en promedio de 3.03 y 4.2 brotes/explante. Aunque estos valores son menores a los obtenidos en este trabajo.

Cabe mencionar que los resultados anteriores son producto de la combinación de AIA con otras fitohormonas, para el caso de la evaluación del efecto del extracto bacteriano de AIA en vitroplantas de papa no se hizo una interacción entre esta auxina con ninguna otra fitohormona como las cinetinas sintéticas, debido a que el extracto bacteriano de AIA utilizado estaba parcialmente purificado caracterizado por presentar ácido giberélico, triptófano y otras reguladores de crecimiento.

El efecto reportado para las vitroplantas de papa es similar al reportado para explantes de *Heliconia psittacorum* (planta ornamental), en donde se obtuvo un mayor número de brotes (NB) cuando el medio fue suplementado con AIA a una concentración de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Talukdar *et al.*, 2002).

6.4.1.4 Número de raíces

Al analizar los tratamientos como efectos independientes encontramos diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados determinando que los tratamientos 1.0 y 2.0 ppm fueron estadísticamente iguales generando el mayor número de raíces (NR) con 7.22 raíces/vitroplantula. En orden de importancia le siguieron los tratamientos con menor concentración de AIA (0.25 y 0.5 ppm) quienes registraron una NR de hasta 5.11 raíces/vitroplantula. Los resultados muestran que el NR aumenta conforme aumenta la concentración de AIA en el medio de cultivo, existiendo una diferencia entre el mejor tratamiento con AIA (2.0 ppm) y sin AIA (testigo) del 51 % del que se registró el menor NR con 3.58 raíces/vitroplanta en promedio (Cuadro 7, Figuras 54-58).



Figura 54. T5-testigo, tratamiento que presentó menor número de raíces, segunda evaluación.



Figura 55. Número de raíces tratamiento 1 (T1-0.25ppm), segunda evaluación.

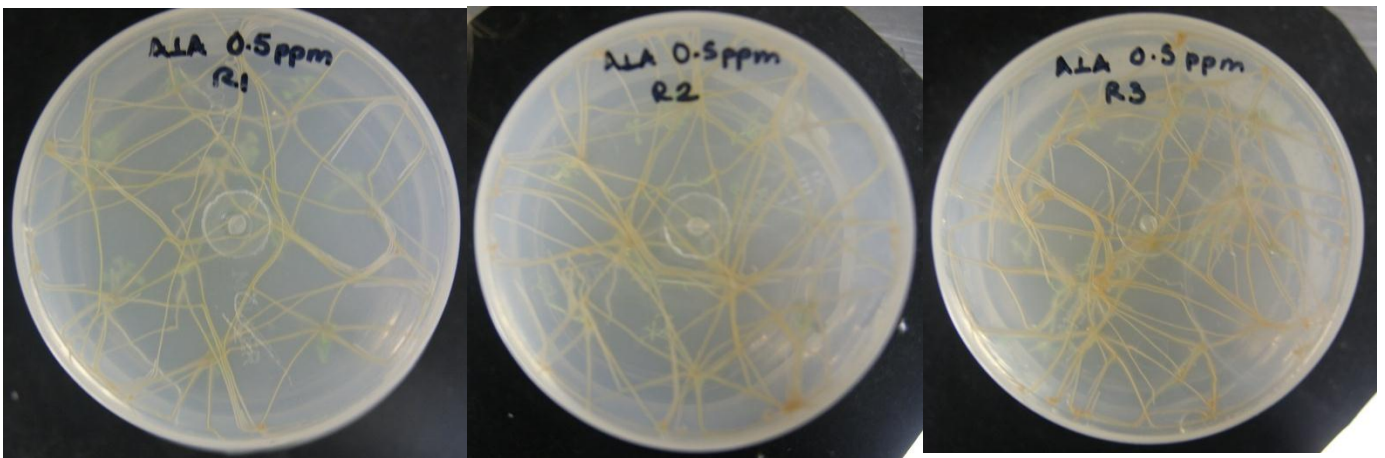


Figura 56. Número de raíces tratamiento 2 (T2-0.5ppm), segunda evaluación.

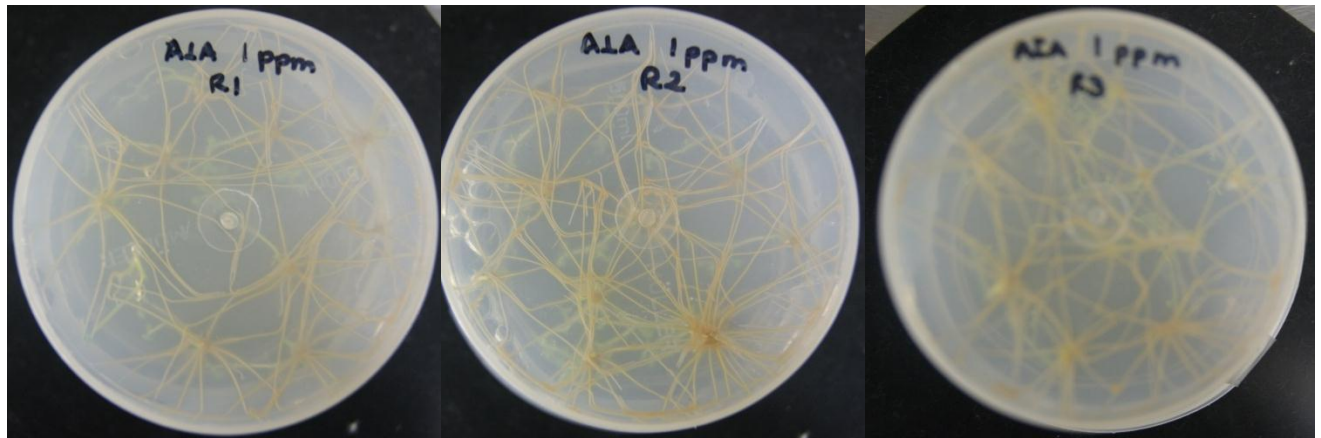


Figura 57. T3- 1ppm, tratamiento 3 que presentó mayor número de raíces, segunda evaluación.

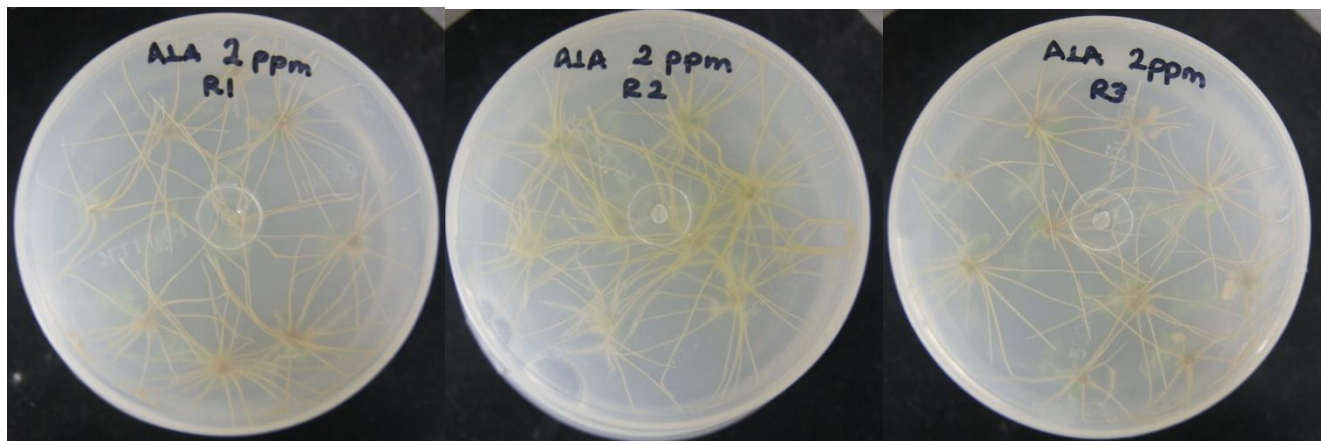


Figura 58. T4- 2ppm, tratamiento 4 que presentó mayor número de raíces junto T3, segunda evaluación.

Estos resultados muestran que el extracto de AIA a una mayor concentración promueve la inducción de raíces en las vitroplantas de papa comprobándose el efecto auxínico del extracto bacteriano utilizado.

6.4.1.5 Peso fresco radicular

Al analizar los tratamientos como efectos independientes encontramos diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados, determinando que el tratamiento con 1.0 ppm de AIA fue del que se obtuvo el mayor peso fresco (PF) radicular por vitroplanta, registrando en promedio 45.65 mg. En orden de importancia le siguieron los tratamientos con una concentración de AIA de 0.25 y 2.0 ppm quienes fueron estadísticamente iguales registrando un PF radicular de hasta 40 mg. El tratamiento con 0.5 ppm de AIA registró el menor PF radicular con 25.15 mg. Los resultados muestran una diferencia entre el mejor tratamiento con AIA (1.0 ppm) y el tratamiento sin AIA (testigo) del 68 %, registrando con este último el menor PF radicular con 14.65 mg en promedio (Cuadro 7).

6.4.1.5 Peso seco radicular

Al analizar los tratamientos como efectos independientes encontramos diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados, determinando que el tratamiento con 1.0 ppm de AIA fue del que se obtuvo el mayor peso seco (PS) radicular por vitroplanta registrando en promedio 5.73 mg. En orden de importancia le siguieron los tratamientos con una concentración de AIA de 0.25 y 0.5 ppm quienes fueron estadísticamente iguales registrando un PS radicular de hasta 4.16 mg. El tratamiento con 2.0 ppm de AIA registró el menor PS radicular con 3.39 mg. Los resultados muestran una diferencia entre el mejor tratamiento con AIA (1.0 ppm) y el tratamiento sin AIA (testigo) del 60 %, registrando con este último el menor PS radicular con 2.28 mg en promedio. Los resultados muestran que el PS radicular aumenta conforme aumenta la concentración de AIA en el medio de cultivo, siendo la concentración de 1.0 ppm donde se obtiene el peso mayor (5.73 mg) (Cuadro 7).

Al analizar el efecto auxínico del extracto bacteriano de AIA parcialmente purificado encontramos, que el tratamiento de 1.0 ppm de esta fitohormona orgánica influye positivamente en la altura foliar (AF) y en el número de explantes (NE) obtenidos de segmentos de tallo + yema de papa cultivados *in vitro*. Asimismo los resultados muestran que el efecto rizogénico puede inducirse en laboratorio con esta misma concentración influyendo en el número de raíces (NR), así como en el peso fresco (PF) y seco (PS) radicular. Con la concentración de 2.0 ppm también se pueden obtener resultados semejantes al obtenido con la concentración de 1 ppm de AIA en la altura foliar (AF), número de explantes (NE) y número de raíces NR; sin embargo, puede existir un menor tamaño en la longitud radicular (LR) y disminución en el peso fresco (PF) y seco (PS) radicular de las vitroplantas.

5. CONCLUSIONES

Se encontró que para la producción más elevada de AIA para la cepa JR2 y AR9 fue a las 80 horas con valores de 1.12 y 1.20 mg·mL⁻¹ de AIA respectivamente.

De acuerdo a la optimización de producción de AIA evaluando tiempo de incubación, pH, temperatura y cantidad de triptófano, se observó que la mayor producción en promedio de la fitohormona fue de 0.84 g·L⁻¹ a las 72 horas con un pH de 7 siendo estadísticamente igual a 7.5, la temperatura óptima fue de 32 °C y no existen diferencias significativas entre las cantidades de triptófano con 1000, 1500 y 2000 mg·L⁻¹.

La aplicación de pequeñas cantidades (0.25 ppm) del extracto bacteriano AIA semipurificado generaron una respuesta positiva en el crecimiento de la parte aérea de las vitroplantas de papa, específicamente en altura foliar (AF) sin mostrar un patrón definido en la longitud radicular (LR).

El efecto biológico del extracto bacteriano de AIA semipurificado puede utilizarse en vitroplantas de papa a una concentración de 1.0 ppm teniendo un efecto positivo en la altura foliar (AF) y en el número de explantes (NE) obtenidos de segmentos de tallo + yema de papa cultivados *in vitro*. Esta misma concentración también tiene un efecto rizogénico influyendo en el número de raíces (NR) y peso fresco (PF) y seco (PS) radicular.

Esto indica que es factible generar fitohormonas a partir de fermentaciones microbianas, ya que es una gran alternativa para promover el crecimiento de raíces y tallos; además se está contribuyendo a la reducción del uso de hormonales sintéticos por lo que se reduce el efecto adverso que éstos generan en el medio ambiente.

6. LITERATURA CITADA

- Aguilar, P. J. J., M. L. Vásquez X., S. García G., B. Baca E., 2008, Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*, Rev Latinoam Microbiol; 50 (1-2): 29-37.
- Ambriz G. J. 1995. Micropropagación de brotes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Tesis de Maestría. Agronomía, U.A.N.L. Marín, Nuevo León. 91p.
- Audus L. J. 1964. The physiology and biochemistry of herbicides. London, New York, ed. Academic Press. 41p.
- Azcon B. J., M. Talón. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana. España. 522p.
- Báez P. M. 1983. “La papa (*Solanum tuberosum* L.)”. Monografía UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila; México. 17p.
- Bashan Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. Canadia Journal of Microbiology 36 (6):419-425
- Bashan Y. and G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships:environmental and physiological advances (1990-1996). Can.J. Microbiol 43:103- 121.
- Bashan Y., G. Holguin and L.E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol., 50(8): 521-577
- Bidwell R. G. 1979. Fisiología Vegetal, 1ra. Ed. en Español. AGT. México, D.F. 496-497, 624 pp.
- Bottini R., M. Fulchieri, D. Pearce, W. and R. P. Pharis. 1989. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47
- Campbell N. A., Mitchell L. G. and Reece J. B. 2001. Biología conceptos y relaciones. Ed. Pearson Educación. México. 662p.
- Cassán F., Piccoli, P. and Bottini R. 2003. Promoción del crecimiento vegetal por *Azospirillum sp.* a través de la producción de giberelinas. ¿Un

modelo alternativo para incrementar la producción agrícola?.
Microbiología Agrícola: Un aporte de la Investigación Argentina para la
Sociedad; Universidad Nacional de Santiago del Estero. 16p.

- Castillo A., Ruzmetov N., Harvey K. A., Stillwell W., Zaloga G. P. and Siddiqui R. A. 2005. Docosaehexaenoic acid inhibits protein kinase C translocation/activation and cardiac hypertrophy in rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 1(1): 18-25
- Cheryl P. and Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Coletto M. J. M. 1995, Crecimiento y Desarrollo de las Especies Frutales, Agroguías Mundi Prensa. Segunda edición. Madrid, España. 168p.
- Cortés V. G. y G. Saavedra del Real. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. Vol. 25 (3): 47-58
- Crozier A. P., Arruda P., Jasmim J. M., Monteiro, A. M. and G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2833-2837.
- Curtis H., 2006, Invitación a la Biología, ISBN 950-06-0447-7, 598-600 p.
- Davies P.J. 1988. Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development. Segunda Edición. Editorial Kluwer Academic Publishers. New York. 681 pp.
- De Troch P., F. Dosselaere, V. Keijers, P. De Wilde and J. Vanderleyden. 1997. "Isolation and characterization of the *Azospirillum Brasilense* trp E(G) gene, encoding anthranilate synthase" *Current Microbiology*, 34:27-32.
- Dobbelaere S., A. Croonenboghs, A. Thys, D. Ptacek and J. Vanderleyden *et al.*, 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28: 871-879.

- Dobbelaere S., J. Vanderleyden and Y. Okon. 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews Plant Sciences*, 22(2):107-149.
- E. Malavolta and P.N Camargo. 1967. *Las Ciencias agrícolas en América Latina: progreso y futuro*, CapítuloVI “La fisiología Vegetal”, 152p.
- Escalante Z. B. 1989. Cultivo *in vitro* de papa, Principios y metodología. Vol. I: Erradicación de patógenos y micropropagación clonal. 1° Edición. CONCYTEC. 107 p.
- Espinoza N. E., P. Tovar, J. Bryan and J. Dodds H. 1985. Cultivo de Tejidos, Micropropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de papa. Documento de Tecnología Especializada 1. Centro Internacional de la Papa (CIP). 17p.
- Frankenberger JRWT, Arshad M. 1995. *Phytohormones in soils. Microbial Production and Function*, Marcel Dekker, Inc. New York. 5-40pp.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109- 117.
- González M. C., 1997, Informe de nuevas variedades INCA 9-1, Nueva variedad de tomate para diferentes épocas de siembra, *Cultivos Tropicales* 18(1);82.
- González C. A. 2008. Evaluación de Semilla Prebásica de Papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de Vitroplantas con Tres Densidades de Población; Bajo Condiciones de Invernadero. 96p.
- Gulati, A. and P.K Jaiwal. 1992. In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 29:199-205.
- Hartmann, A., M. Singh & W. Klingmüller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
- Hartmann H. T. y Kester D.E. 1987. *Propagación de plantas, principios y prácticas*. Continental. México. 760p.

- Hernández A. 2002. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.). Tesis de doctorado. Universidad de La Habana. 165p.
- Hernández M. J. L., Quiroz V. J. D., Moreno M. V. R. y M. Pérez N. 2008. Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. Revista de investigación y difusión científica agropecuaria. 12: 57-67
- Hurtado D.V. y M.A. Merino. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México. 232 pp.
- Jiménez V. M., Occeguera A. Z., Bernal A., Montes de Oca J., Rivera O., Estévez Y., Machado P., Reyes E. C., Hernández N., Cortes M., Banguela I., Alejo M., Ojeda D., Hernández S. y Pascual E. 2006. Efecto de un bioestimulante en el enraizamiento *in vitro* de dos variedades de caña de azúcar (*saccharum spp.*). Biotecnología vegetal. Vol. 6, No. 4. 232pp.
- Kartha K.K., S. Champoux, O.L. Gamborg and K. Pahl. 1977. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(3):346-349.
- Krikorian A.D. 1991a. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca y L.A. Mroginski (Ed). CIAT. Colombia. 41-78pp.
- Krikorian, A.D. 1991b. Propagación clonal *in vitro*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca y L.A. Mroginski (Ed). CIAT. Colombia. 95-125pp.
- Kyte, L. 1983. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press. U.S.A. 46-47, 73-74pp.
- Laboratorio de Biotecnología Experimental. Centro de Biotecnología Genómica- Instituto Politécnico Nacional.

- Lara M. C., L. E. Oviedo Z. y C. A. Betancur H. 2011. Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos, *Zootecnia Trop.* v.29 n.2 ISSN 0798-7269. 187-194pp.
- Celis B. L. X. y I. R. Gallardo. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 82pp.
- López y Delgado H. 1999. Micropropagación en Papa en taller de Micropropagación de Cultivos Hortícolas. VIII Congreso de Horticultura 12 -15pp.
- López D. T. y Zavala Q. 1998. I Curso de Multiplicacion Acelerada de papa *in vitro* en Invernadero. PRECODEPA. 21p.
- Martínez M. L.J., L. Soto U., BE. Baca y JA. Sánchez A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild-type *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol.Lett.* 228:170-173.
- Morozova S. E. and G. Melik-Sarkisov S. 1978. Propagation of virus-free potato plants by means of tubers obtained *in vitro*. *Soviet Plant Physiology.* 25:295-299.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Okon Y. and Y. Kalpunik. 1986. Development and function of *Azospirillum* –inoculated roots. *Plant Soil.* 90:3-16.
- Okon Y. and Labandera G. C. A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Okon Y. and Itzigsohn R. 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculants for improving crop yields. *Biotech. Adv* 13:415-424.
- Okon, Y. and J. Vanderleyden. 1997. Root associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM New* 63:366-370.

- Omay S., Schmidt W., Martin P. and Bangerth F. 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under in vitro conditions. *Can. J. Microbiol.* 39: 187-192.
- Ona O., JV. Impe, E. Prinse and J. Vanderleyden. 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmental controlled. *FEMS Microbiol. Let.* 246:125-132.
- Parga T. V. M. 2007. Mejoramiento genético de la papa. Órgano Oficial de Información de la Fundación Produce-Coahuila A. C. Año 1 No. 2 1-2pp.
- Patten ChL. and Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Patten C. and Glick B. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and environmental microbiology*, Whashington, v. 68, n. 8. 3795 – 3801pp.
- Perrig D., Boiero L., Masciarelli O., Penna, C., Cassán F. and Luna V. 2007. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2007). 75: 1143-1150.
- Pierik R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. España. 71-73, 76-78, 181-182pp.
- Potrie G. 2013. Productos químicos para la agricultura del futuro, Reguladores del crecimiento o fitohormonas. 239p.
- Purves W., Sadova D., Orians G., Heller C. 2002. Vida La Ciencia De La Vida. 6ª Ed. Editorial Medica Panamericana. New York. 1133p.
- Phillips A. L. 1998. Gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiology Biochemistry* 36(1-2), 115-124.
- Reynolds J.F., N.E. Bieber y E.L. Sun. 1982. Environmental, genotype and pretreatment influences on regeneration of tomato *in vitro*. *In Vitro*. 18(3) Part II. 180 Abstr. 318p.

- Rodríguez M. M. D., N. Rodríguez., C. Rodríguez. 2004. *Metabolismo y Modo de Acción de Fitohormonas*, ISBN: 84-7800-614-1 41p.
- Rodríguez A., I. D. Trujillo, Y. F. Bringas, B. Rojas, J. Manzano. y M. Heydrich. 2005. Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología* 7 (1) 66-75.
- Rives N., Acebo Y., Almaguer M., García J.C. y Hernández A. 2009. Actividad antagónica frente a *Pyricularia Grisea* (Sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *pseudomonas Putida* (Trev.). *Rev. Protección Veg.* Vol.24, N.2. 106-116pp.
- Salisbury F. 1994. *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana. Mexico. 759pp.
- Santiago J., M. Mendoza, F. Borrego. 1998. Evaluación de Tomate (*Lycopersicon Esculentum*, MILL) en invernadero. Criterios fenológicos y fisiológicos, *Agronomía Mesoamericana* 9(1): 59-65
- Sarmiento G. 2006. Biocultivos. Curso internacional. "Producción de Biofertilizantes desde el laboratorio al campo". Universidad Nacional de Colombia, COLCIENCIAS-CABBIOBIOCULTIVOS, Instituto de Biotecnología (IBUN), Santa fé de Bogotá, Junio 19-25. Memorias.
- Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2002. Anuario estadístico de información agropecuaria. SIACON. México, DF.
- SEP. 1983. "Papas". Manuales para la educación agropecuaria. 1ra. Edición, Editorial Trillas, S.A. de C. V. México, DF.
- Soberón J. R., Quiroga E. N., Sampietro A. R., Vattuone M. A. 2008. "Auxinas", Cátedra de Fotoquímica, Instituto de Estudios Vegetales. Universidad Nacional de Tucumán. 1p.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. *Plant physiology*. 3a ed. Sunderland: Sinauer Associates. 556p.

- Talukdar M. C., C. Lalrinawmi, S. Singh. 2002. *In vitro* propagation of *Heliconia*. J. Ornam. Hortic. (New Series) 5(1):45-46
- Tien T. M., M. H. Gaskins, and D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 37:1016-1024.
- Torres K. 1988. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold. New York. 31-34, 53-60, 66-68pp.
- Uddin M., Rafique S., Z. Berry and A.D. Bisges. 1988. An improved shoot regeneration system for somaclone production in tomatoes. Hort Science 23(6): 1062-1064.
- Vessey J.K. 2003. Plant grown promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.
- Villalobos R. E. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. 1 ed. Vol. 4 ISBN 9977-67-996-7. 57p.
- Villalobos V.M. y T.A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: W. M. Roca y L.A. Mroginski (Ed). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia. 127-141pp.
- Villavicencio G. E. E. 2005. Producción de semilla prebásica de "Ramona" nueva variedad de papa del INIFAP: 2da. Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. Guadalajara Jal. México.
- Zakharova EA., AD. Iosipenko and VV. Ignatov. 2000. Effect of water soluble vitamins on the production of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Microbial Res. 155:572-576.