



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

CBS

**"EVALUACION DE LA PRESENCIA DE
SUSTANCIAS PROBABLES REGULADORES DEL
CRECIMIENTO VEGETAL EN UNA COMPOSTA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

IGNACIO GARCIA-MARTINEZ



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

COMITE TUTORIAL:

**Dr. Francisco Cruz Sosa
Dr. Alfonso Larqué-Saavedra
M. en C. Alejandro Azaola Espinoza**

222259

El presente trabajo se desarrolló en las siguientes Instituciones:

Laboratorio de Tratamiento de Residuos Sólidos Orgánicos y Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Bajo la dirección del Dr. Francisco Cruz Sosa

Laboratorio de Botánica, Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados.

Bajo la dirección del Dr. Alfonso Larqué-Saavedra.

AGRADECIMIENTOS:

A ese ser, cuyo nombre tan inmenso no puedo recordar, pero que significa tanto, gracias por todo.

A mi padres, por brindarme la gracia de la audacia y el poder de superarme día a día.

A mi familia, por enseñarme a trabajar en equipo y saber que cada uno representa un eslabón en la cadena de todo lo que se realiza.

A Pily, "María del Pilar Rizo Almenara", el amor de mi vida y sostén del presente trabajo, gracias por ser parte de mi vida, por todo tu amor y palabras de aliento, siempre estarás en mi corazón.

A Mónica, Samantha y Víctor mis queridos hijos, sean libres y elijan su camino como lo hice yo.

A mis niñas del laboratorio, Rosa I., Consuelo, Elsa, Paloma, Martha A., y demás que no por no mencionarlas, no las aprecio.

A Mario Gutiérrez del Colegio de Postgraduados, gracias por todo tu apoyo en el establecimiento de las técnicas y por tus enseñanzas.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal; Angel, Juan, Salvador, Junior y Juan Carlos. Gracias por su amistad y compañerismo en todo momento.

A mis colegas, amigos, compañeros y hermanos de la H. 6ª. Generación de la Maestría en Biotecnología.

A Nani, por permitirme ser parte de su vida y mostrarme la realidad de esta.

A Poncho y Herminio, por brindarme su amistad y compadrazgo.

Al Dr. Francisco Cruz Sosa, gracias por su orientación y amistad.

Al Dr. Alfonso Larqué-Saavedra, gracias por ser un ejemplo en mi vida de investigador.

Al M. en C. Alejandro Azaola Espinosa, gracias por su atención y dirección.

Finalmente a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta me brindaron su apoyo y comprensión para la realización del presente trabajo.

A Pily esa increíble mujer

INDICE

TITULO.....	1
JUSTIFICACION.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	7
COMPOSTA.....	7
REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	9
ACIDO ABSCISICO.....	10
AUXINAS.....	11
CITOCININAS.....	13
GIBERELINAS.....	15
ETILENO.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
METODOLOGIA.....	21
CARACTERIZACION DEL MATERIAL.....	21
PROCESO DE COMPOSTEO.....	21
DETERMINACIONES ANALITICAS.....	22
ANALISIS FISICO.....	22
ANALISIS QUIMICO.....	22
ANALISIS FISICO-QUIMICO.....	23
ANALISIS DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	23
EXTRACCION.....	24
PURIFICACION E IDENTIFICACION.....	25
PARTICION.....	25
PRIMERA ETAPA.....	26
SEGUNDA ETAPA (TLC).....	26
ANALISIS.....	27
ABSCISINAS Y AUXINAS.....	27
CITOCININAS.....	29
GIBERELINAS.....	32
IDENTIFICACION (TLC).....	35

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	35
ABSCISINAS.....	36
AUXINAS.....	40
CITOCININAS.....	44
GIBERELINAS.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
ANÁLISIS DE LA COMPOSTA.....	49
EXTRACCIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL...	54
IDENTIFICACIÓN (TLC).....	57
BIOENSAYOS.....	62
TLC-BIOENSAYOS.....	65
ANÁLISIS INDIRECTO.....	66
FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO.....	70
EN GENERAL.....	72
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	81

Evaluación de la presencia de probables sustancias Reguladores del Crecimiento Vegetal en una composta

JUSTIFICACION

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

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

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

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

La aplicación de compostas para el mejoramiento de cultivos y sus demostradas ventajas en cuanto a sus características estructurales de suelos mejorados y su incrementada disponibilidad de nutrientes, hace de su uso una alternativa viable, pero existen fenómenos que hasta el momento no tienen explicación alguna, como son la disminución en el tiempo de floración, fructificación, etc., el aumento en el tamaño de los frutos, entre otros (Weaver, 1972; Giusquiani *et al.*, 1995; Smith, 1992; 1989; Hue *et al.*, 1994; Iglesias-Jiménez y Alvarez, 1993; y Levi-Minzi *et al.*, 1990), lo cual permite suponer la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal en dicho material, ya que estos han sido empleados en la

agricultura produciendo una amplia gama de respuestas fisiológicas (Larqué y Reyes, 1988)

Finalmente, el medio ambiente ha sido uno de los principales aspectos para la negociación de los Acuerdos Paralelos del Tratado de Libre Comercio y su concretización y vigilancia asegurarán un impacto positivo en la materia. Algunos de los beneficios de los acuerdos paralelos pudieran ser significativos en materia ambiental. Sin embargo, también emanan obligaciones tales como: "Las naciones están obligadas a reportar la situación de su medio ambiente, a promover la educación e investigación científica y tecnológica en materia ambiental" (Dean, 1993).

INTRODUCCION

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

destinar a la producción de composta que tiene un valor agregado (Trejo, 1994; y SEDUE/INE, 1991-1992).

El composteo es una oxidación biológica exotérmica de la materia orgánica, llevada a cabo por una sucesión dinámica y rápida de poblaciones microbianas aerobias. La materia orgánica heterogénea inicial, es transformada, después de un período de composteo conveniente, el cual incluye fases biooxidativas y de maduración, en un producto final estabilizado a través de su mineralización y humidificación (Bidlestone y Gray, 1991; y Crawford, 1983).

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

Las características físicas, químicas, fisicoquímicas y microbiológicas de las

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

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

Además, el desarrollo puede ser afectado o controlado por hormonas, compuestos que se sintetizan en un lugar del organismo y se transportan a otro, donde actúan regulando el crecimiento, desarrollo y metabolismo de modos específicos y a muy bajas concentraciones. Generalmente el efecto de las hormonas es indirecto y son activas en pequeñísimas cantidades; por lo tanto, el efecto de los metabolitos, nutrientes y compuestos análogos, ya sea directamente sobre el metabolismo o indirectamente como inductores o corepresores, no constituye una acción hormonal. En realidad es muy difícil definir el término hormona vegetal con precisión. Muchas sustancias de tipo hormonal pueden actuar en su lugar de síntesis, actuar al parecer de modo no específico o actuar (como lo hacen algunos metabolitos) a nivel genético como inductores o represores. A menudo se prefiere el término fitorregulador refiriéndose a compuestos naturales o sintéticos que inducen respuestas en el crecimiento, el desarrollo o el metabolismo. En general estas sustancias no son metabolitos en el sentido de que no son intermediarios ni productos en las vías de transformación que controlan, y son activas a muy bajas concentraciones. Aunado a esto el empleo de hormonas vegetales en la agricultura ha estado ligado a algunas respuestas fisiológicas por parte de los cultivos como enraizamiento, floración, maduración del fruto, abscisión, inhibición de brotes, supresión del crecimiento y defoliación (Bidwell, 1979 y Larqué y Reyes, 1988).

ANTECEDENTES

COMPOSTA

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

La utilización de los procesos de fermentación en medio sólido han servido para aprovechar diferentes residuos de origen agrícola, agroindustrial y municipal. Se han estudiado residuos como son: pajas, rastrojos, bagazos y pulpas, así como también la fracción biodegradable de los residuos sólidos urbanos (basura); para la producción de antibióticos, enzimas, alimento destoxificado para ganado, biofertilizantes y sustrato para el cultivo de hongos comestibles. En todos los casos empleando las técnicas de fermentación sólida como una alternativa tecnológica eficiente (Tchbanoglous *et al.*, 1993; Staff of Biocycle, 1991; Melino *et al.*, 1982; Kuhlman, 1990; e Iglesias-Jiménez y Pérez-García, 1992).

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

producto estable denominado composta.

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

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

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

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

REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

El término de Regulador de Crecimiento Vegetal (RCV), puede emplearse para cualquier sustancia que, en muy pequeñas concentraciones, provoca un efecto fisiológico en las plantas, ya sea inhibición o estímulo de alguna función (Weaver, 1972; y Salisbury y Ross, 1992). Durante la pasada década, los métodos fisicoquímicos de análisis tales, reportan una nueva nomenclatura, denominando ahora a tales compuestos como sustancias del crecimiento vegetal (Brenner, 1981; y Trewavas, 1979). Sin embargo esta nomenclatura no interferirá en los objetivos del presente trabajo siendo no tomada como un criterio de clasificación.

En la actualidad son generalmente reconocidos cinco grupos de reguladores del crecimiento vegetal, aunque es casi seguro que se descubrirán más. Los cinco grupos incluyen: ácido abscísico, cuatro auxinas, algunas citocininas, una gran variedad de giberelinas (aproximadamente 84) y etileno (Hubick y Reid, 1984; Bidwel, 1979; y Salisbury y Ross, 1992)

Acido abscísico (ABA)

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

El ABA es un sesquiterpenoide de 15 carbonos sintetizado una parte en los cloroplastos y otra en plástidos por la ruta del ácido mevalónico. Las primeras reacciones de la síntesis del ABA son idénticas a las de isoprenoides tales como las giberelinas, esteroides y carotenoides. La biosíntesis del ABA, en la mayoría de las plantas, ocurre indirectamente por la degradación de ciertos carotenoides (de 40 carbonos) presentes en plástidos. Se encuentra en todas las plantas vasculares; también está presente en algunos musgos, algunas algas verdes y algunos hongos, pero no en bacterias. La estructura del ABA se muestra a continuación.

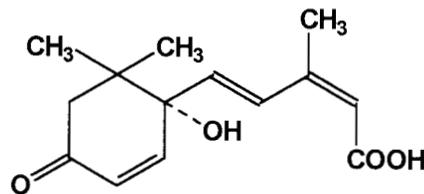


Figura 1. Acido abscísico

El ABA es un regulador del crecimiento vegetal que da, a los órganos de una planta, la señal de que indica que están sometidos a estrés fisiológico (sequía, suelos salinos, altas temperaturas y frío). Generalmente causa respuestas que

ayudan a la planta a protegerse contra estas situaciones. Este también ayuda a que se lleve a cabo normalmente la embriogénesis y a la formación de proteínas de almacenamiento en las semillas, además previene la germinación o crecimiento prematuros en muchas semillas.

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

El transporte del ABA ocurre a través del xilema y el floema y también en las células del parénquima unidas a la superficie vascular. El movimiento de este regulador en las plantas es similar a de las giberelinas (Milborrow, 1989; Bonner y Varner, 1976; Weaver, 1972; y Salisbury y Ross, 1992).

Auxinas (AIA)

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

sobre hormonas vegetales en todo el mundo desde la antigüedad (Bandurski *et al.*, 1993).

Este es un grupo de compuestos que se caracterizan por su capacidad para inducir la elongación de las células de brotes y la diferenciación celular en las plantas. Las antiauxinas son compuestos que inhiben la acción de las auxinas, generalmente porque compiten con éstas por los mismos puntos de acción sobre una sustancia o sustancias receptoras.

La actividad de las auxinas se definió utilizando sistemas biológicos para ensayar efectos como el crecimiento y la curvatura del tallo. Estos bioensayos condujeron a la determinación de la estructura química del ácido indol-3-acético (AIA), siendo este el representante de este grupo, así dentro de las auxinas el ácido indolacético (AIA) ha sido identificado como un constituyente endógeno de un gran número de plantas superiores, es el compuesto del tipo de las auxinas más conocido, sin embargo las plantas contienen otros tres compuestos estructuralmente similares al AIA, (ácido 4-cloroindolacético, ácido fenilacético (APA) y ácido indolbutírico (IBA)) que provocan algunos efectos similares a éste. (Bandurski *et al.*, 1993 y Salisbury y Ross, 1992). La estructura del AIA es la siguiente:

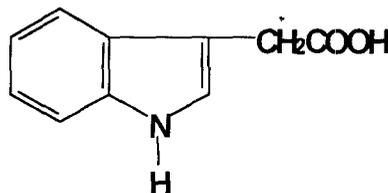


Figura 2. Acido indolacético

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

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

Citocininas (CIT)

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

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

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

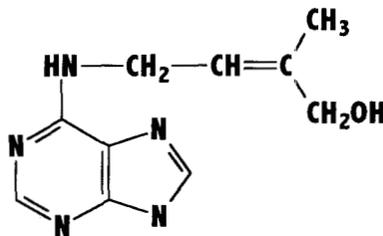


Figura 3. Kinetina (6-benzil furfurilaminopurina)

La biosíntesis de citocininas es a través de una modificación química de la adenina. Los tejidos vegetales contienen una enzima llamada isopentenil AMP sintetasa, la cual forma el isopentenil AMP a partir del AMP, de esta manera el isopentenil AMP es convertido a isopentenil adenosina por hidrólisis del grupo fosfato y ésta es convertida a isopentenil adenina por la hidrólisis del grupo

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

Giberelinas (GAs)

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

Las giberelinas son compuestos isoprenoídeos, que tienen un esqueleto de giberelano y que estimulan la división o la elongación celular, o ambas. Todas las giberelinas son acídicas y contienen 19 o 20 átomos de carbono agrupados en cuatro o cinco sistemas de anillos, tienen un grupo carboxilo unido al carbono 7 y algunas en el carbono 4, así todas son llamadas ácidos giberélicos, pero con un diferente subíndice para distinguirlas entre ellas. La GA₃, la primer giberelina

descubierta, la más activa y desde hace mucho tiempo disponible comercialmente, históricamente se conoce como ácido giberélico. En general, las giberelinas que contienen 19 átomos de carbono son más activas que las que contienen 20, la estructura general de las giberelinas es como se muestra a continuación.

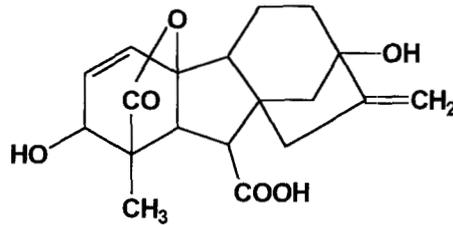


Figura 4. Acido Giberélico (GA₃)

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

La aplicación exógena de GAs produce una amplia variedad de respuestas en los vegetales. La mayoría de estos estudios se han realizado con GA₃, que es un compuesto disponible comercialmente. Las GAs son moléculas extremadamente activas, y en general, unos pocos μg o incluso nanogramos (ng) son suficientes para inducir distintos efectos fisiológicos. Las GAs inducen elongación del tallo y floración en variedades genéticamente enanas y en plantas de día largo. En general su aplicación inhibe la floración en las angiospermas leñosas y en los frutales. También se observa una tendencia a producir flores masculinas en

aquellas plantas que poseen flores con sexos separados. Las GAs también sustituyen los requerimientos de luz o frío que precisan muchas semillas para germinar (Bidwel, 1979; Russell y MacMillan, 1989; Salisbury y Ross, 1992; y Talón, 1993).

Etileno

El gas etileno es sintetizado a partir de la metionina en muchos tejidos vegetales como respuesta al estrés. En investigaciones recientes se ha descubierto que el etileno es derivado a partir de los carbonos 3 y 4 de la metionina. Es un compuesto no esencial para el crecimiento vegetativo normal. En particular, éste es sintetizado en tejidos sometidos a senescencia o maduración. Esencialmente todas las partes de las semillas producen este gas.

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

Por ser un gas, el etileno se mueve por difusión desde su sitio de síntesis. Un intermediario crucial en su producción es un compuesto inusual del tipo de los aminoácidos: el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), éste puede ser transportado y puede ser el responsable de que el etileno cause efectos a cierta distancia del estímulo causal (Bidwel, 1979; Salisbury y Ross, 1992; y Beyer *et al.*,

1989). La fórmula estructural del etileno es:

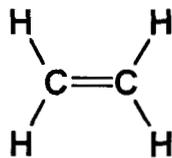


Figura 5. Etileno

OBJETIVO GENERAL

Evaluación la presencia y actividad biológica de probables sustancias reguladores del crecimiento vegetal en una composta.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- i. Caracterización del material a analizar.

- ii. Establecimiento de las técnicas analíticas de extracción y purificación de sustancias probables reguladores del crecimiento vegetal.

- iii. Extracción con disolventes orgánico-acuosos y purificación parcial de extractos mediante técnicas de cromatografía en columna y capa fina.

- iv. Purificación e identificación de los extractos mediante técnicas de cromatografía en columna y capa fina.

- v. Establecimiento de las técnicas para precisar la actividad biológica (bioensayos).

- vi. Determinación de la actividad biológica de los extractos purificados mediante ensayos *in vitro* (bioensayos).

- vii. Establecimiento de los factores externos que pueden afectar el proceso.

METODOLOGIA

CARACTERIZACION DEL MATERIAL

Los materiales a usar consistieron en muestras de compostas, obtenidas a partir de los procesos establecido por García-Martínez *et al.* (1995) en la UAM-Iztapalapa, las cuales fueron analizadas de acuerdo a su composición química, física y fisicoquímica según Arozarena *et al.* (1995).

Proceso de Composteo

El proceso de composteo comienza, con una colección y selección heterogénea de materia orgánica, la cual es pasada por un molino para reducir el tamaño de partícula. Una vez molida la materia se adiciona un inóculo (estiércol de vaca) como fuente de microorganismos, en una proporción de 10%. Posteriormente se adiciona fibra (pasto residual) en una proporción del 10% con el objeto de proporcionar una mejor porosidad y poder abastecer una estructura abierta para asegurar la adecuada aireación para un composteo efectivo.

Ya preparado el material se apila en el patio de composteo, para iniciar el proceso de descomposición por parte de las diversas poblaciones microbianas (bacterias, hongos y actinomicetos). Estos microorganismos se desarrollan bajo ciertas condiciones favorables de humedad, aireación y temperatura. Esta actividad microbiana producirá un aumento en la temperatura a consecuencia de las oxidaciones biológicas exotérmicas, y dado que la materia orgánica posee muy mala conductividad térmica, ésta actúa como aislante térmico, provocando que la

mayor parte del calor producido permanezca dentro de la pila. Se depura el producto final y se deposita en otro patio de composteo para su maduración, en el cual la fermentación continúa lentamente hasta alcanzar el punto requerido, obteniéndose así la composta. Para asegurar un buen proceso de composteo, las pilas son volteadas periódicamente (aireación) y la humedad ajustada a un porcentaje del 60-70%, durante todo el desarrollo de éste (García-Martínez *et al.*, 1995).

.Determinaciones analíticas

Preparación de la muestra: En cada caso se tomaron muestras representativas del material a procesar que se secaron al aire, homogeneizaron y molieron de acuerdo al tipo de análisis; éste se hizo por quintuplicado y la información obtenida se procesó estadísticamente de acuerdo a Little y Jackson, (1981).

Análisis Físico: Incluye la determinación en porcentaje de la densidad, humedad y obtención de cenizas de cada muestra según técnicas convencionales (Chapman y Pratt, 1981).

Análisis Químico: Comprende la extracción mediante agua de nitrógeno, potasio, fósforo, calcio, magnesio y cinc así como la determinación en el extracto acuoso de los contenidos totales, inorgánico y orgánico de carbono. Igualmente, la extracción mediante EDTA disódico 0.5 N de cobre y fierro. También las muestras fueron incineradas y las cenizas obtenidas tratadas con ácido clorhídrico 2 N para precisar su contenido total de los anteriores elementos. Las técnicas analíticas

empleadas, fueron las comúnmente establecidas para este tipo de determinaciones, a saber: titulación, espectrofotometría, flamometría, espectrofotometría de absorción atómica y análisis térmico diferencial.

Análisis Físico-químico: Se determinaron en agua desionizada, a una relación 1:2, el pH y la conductividad eléctrica considerando 10 minutos como tiempo de interacción para el análisis (García-Martínez *et al.*, 1995 y Arozarena *et al.*, 1995).

ANALISIS DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Un problema que actualmente ha tornado la visión en el análisis de los RCV es la adecuada selección de la muestra a analizar, para ello se han empleado técnicas de muestreo, las cuales disminuyen la probabilidad de una muestra errónea y un análisis más confiable.

El análisis de los RCV es a menudo realizado a partir de tejidos vegetales, los cuales son extraídos mediante solventes apropiados. Estos solventes orgánicos extraen los RCV de las muestras analizadas y, muy a menudo el metanol es el solvente de preferencia. Otros solventes y mezclas organico-acuosas también son usadas.

En general la muestra es usualmente homogeneizada con el solvente apropiado a una temperatura baja (de 2 a 4°C). Posteriormente se mezcla y se procede de acuerdo a la técnica empleada, sin embargo al realizarla, hay que tomar en cuenta

que al extraer los RCV, estos no sufran algún cambio en su estructura química ya que también se requiere de evaporaciones de los solventes a temperaturas relativamente altas. Posterior a la extracción se homogeniza y se filtra y ocasionalmente se centrifugan las muestras (Hubick y Reid, 1984; Larqué y Rodríguez, 1993; Brenner, 1981 y Hedden, 1993). A continuación se describen las técnicas empleadas.

Tabla 1. Solventes empleados para la extracción de RCV

SOLVENTE	ABA	AIA	CIT	Gas
Metanol al 80%	⊗	⊗		⊗
Etanol al 80%		⊗	⊗	
Acetona al 80%				⊗
Metanol/acetato de etilo/ac. acético	⊗			
Acido clorhídrico/metanol			⊗	

Extracción

La selección del solvente apropiado para la extracción de RCV es uno de los aspectos más confusos e importante en el análisis de estos. A pesar de que el metanol al 80% es el más seleccionado y empleado de los solventes, existe un gran número de reportes que muestran el uso de una serie de sistemas de solventes, obteniéndose una respuesta similar en ambos casos. Sin embargo para poder determinar el solvente apropiado se recomienda el uso de blancos, es decir establecer la extracción con el empleo de estándares de los RCV a analizar y observar si su uso no altera el extracto empleado (Brenner, 1981).

Se estableció la utilización de diferentes disolventes y/o mezcla de disolventes para la extracción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (Hubick y Reid, 1984; Brenney, 1981; Chapman y Pratt, 1981; Hedden, 1993; Russell, 1977; y Weaver, 1972), como principal grupo de estos disolventes tendremos: Metanol al 80%, Etanol al 80% y Acetato de Etilo.

Estas mezclas de disolventes se encuentran reportadas en la literatura como los más utilizados para la extracción y purificación de Reguladores del Crecimiento Vegetal (Hubick y Reid, 1984; Hue *et al.*, 1994; Mitchell y Livingston, 1973; Larqué y Rodríguez, 1993 y Quatrano, 1974). Para el cumplimiento de este objetivo se utilizaron disolventes JT Baker grado reactivo.

PURIFICACION E IDENTIFICACION

Partición

Una purificación posterior a la extracción es la partición del extracto obtenido mediante el empleo de solventes inmiscibles. Estos solventes o sistema de solventes ven favorecida su acción y por ende su coeficiente de partición aumentado, mediante el establecimiento de condiciones que favorezcan tales aspectos como el pH, temperatura, etc. obteniéndose así la fracción de interés (ácida, básica o neutra). Dentro del grupo de solventes de partición de mayor empleo se encuentran el 1-butanol y el acetato de etilo. Posterior a la partición se recomienda la adición de un buffer para estabilizar y conservar el extracto con los RCV (Brenner, 1981; Korhammer y Heaslinger, 1994 y Hedden, 1993). En general

las técnicas empleadas se basan en el uso de solventes orgánico-acuosos y en la separación mediante particiones polares de los extractos.

Primera etapa

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

Se utilizaron columnas Adsorbex RP-18, columna de extracción para extracción en fase sólida, empacada con silicageles sintéticos, eluyendo los extractos con mezclas de disolventes provocando un gradiente de polaridad, y así poder eliminar la fracción correspondiente a los pigmentos y recuperar un extracto exento de algunos compuestos que interfieren en su purificación y posterior identificación (Gutierrez, 1996).

Segunda etapa

Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Hasta que recientemente algunos procesos para el análisis de RCV han incorporado nuevamente a la TLC como una herramienta para la purificación de los extractos obtenidos, su empleo se ha reestablecido, sin embargo la gran capacidad de resolución de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

jamás podrá ser reemplazada por la TLC a no ser por su contraste económico que representa su empleo en el análisis. Generalmente se emplean silica-geles y celulosa para esta técnica.

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

ANALISIS

Se conocen varias clases de hormonas, algunas son sustancias promotoras del crecimiento y desarrollo, y otras son inhibitorias. Se postula además la existencia de varias hormonas sobre la base de experimentos cuyos resultados no parecen poder interpretarse sin la implicación de estímulos aún no conocidos (Bidwell, 1979). Sin embargo para los fines de nuestra investigación sólo realizamos pruebas para la identificación de los siguientes grupos: ABSCISINAS (ABA), AUXINAS (AIA), CITOCININAS (CIT) y GIBERELINAS (GAs). Las técnicas establecidas y empleadas se describen a continuación:

ABSCISINAS Y AUXINAS

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

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

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

B) PURIFICACION PRELIMINAR: Se utilizó una columna Adsorbex RP-18, para eliminar pigmentos principalmente.

C) PURIFICACION: Referida a particiones con éter.

I MATERIAL. La extracción se realizó a partir de muestras de composta.

II PREPARACION DEL EXTRACTO METANOLICO. El material seleccionado es secado durante 24 horas a 60°C. Para preparar el extracto se pesan 50 g de muestra y se colocan en un matraz, adicionándole 300 ml de metanol al 80%, se pone en agitación durante 1 hora, se sella el matraz colocándolo en refrigeración (4°C) y obscuridad por 24 horas. Después se decanta el sobrenadante.

III FILTRACION. El extracto obtenido se filtra con papel Whatman.

IV PURIFICACION PRELIMINAR. El filtrado se pasa por una columna Adsorbex

RP-18 para eliminar los pigmentos.

V. EVAPORACION. El disolvente se evapora del extracto metanólico a presión reducida y 40°C máximo (rotavapor), con lo que se obtiene un residuo acuoso.

VI PARTICION. Se ajusta el pH de la fase acuosa a 3.0 con ácido clorhídrico 6M (2 a 3 ml) y enseguida se lava con 3 porciones (50 ml c/u) de éter, se conserva la fase orgánica y la fase acuosa se desecha.

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

CITOCININAS

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

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

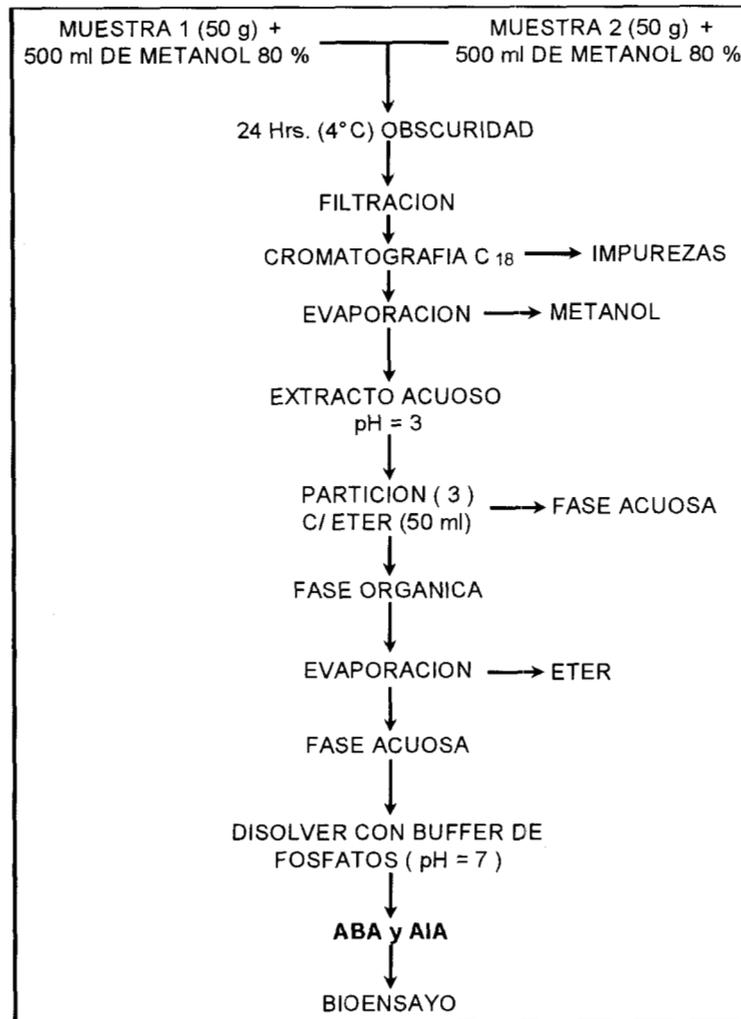


Figura 6. Metodología empleada para la extracción de ABA y AIA

Los disolventes más comúnmente utilizados en la extracción de las citocininas, a partir de tejidos vegetales, son disoluciones acuosas de metanol o etanol al 75%. En su purificación, se ha aplicado la partición en disolventes y la cromatografía en sus diversas modalidades, en particular la de columna, muy empleada en las etapas iniciales de este proceso (Larqué y Rodríguez, 1993; Gutierrez, 1996; Horgan, 1978; Horgan, 1987; Tien *et al.*, 1979; Boerjan *et al.*, 1992; Korhammer y Haslinger, 1994; Hernández-Miñana, 1991 y Taylor *et al.*, 1994). La metodología

para obtener citocininas se describe a continuación:

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

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

222259

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

II EXTRACCION. Se toman 50 g de composta previamente secada, se agregan 300 ml de ácido clorhídrico 0.1N en metanol y se homogeneiza, posteriormente se filtra al vacío utilizando papel Whatman. Se descarta el filtrado y la muestra se homogeniza nuevamente con 150 ml de HCl 0.1N en metanol; se filtra de nuevo descartando el filtrado y se resuspende la muestra en 50 ml de metanol puro; Se homogeniza y se filtra nuevamente, pero ésta vez se guarda el filtrado. De esta forma, de la muestra de composta se han extraído las citocininas que se encuentran ahora en dilución en el metanol.

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

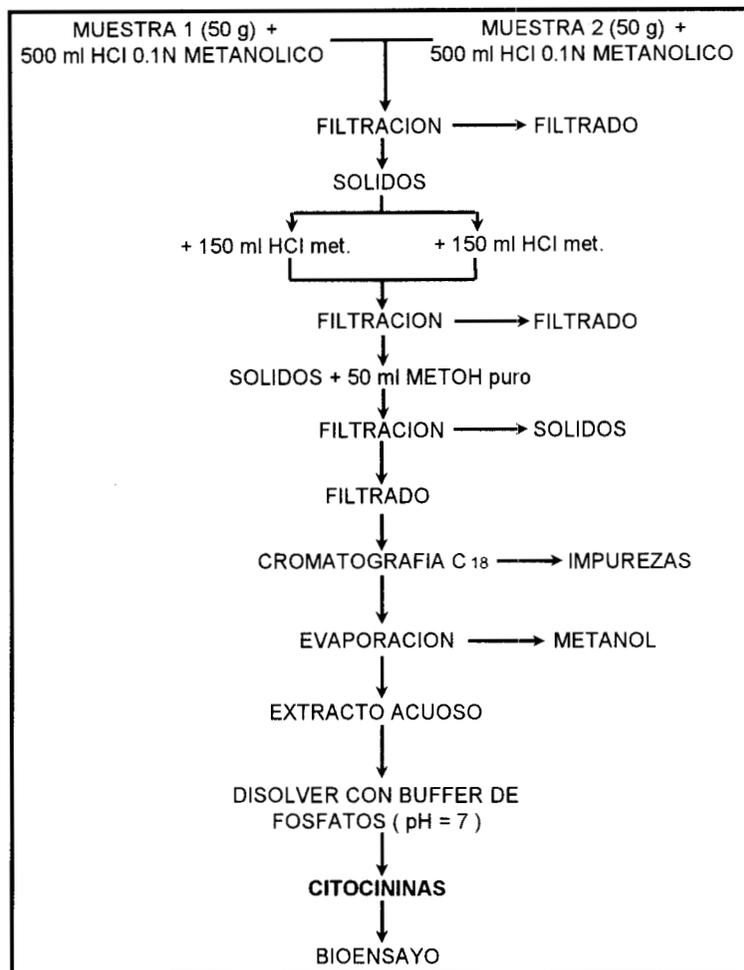


Figura 7. Metodología empleada para la extracción de CIT

GIBERELINAS

No obstante que se han aislado sustancias con actividad giberélica prácticamente de todos los vegetales, solamente se han obtenido giberelinas libres, químicamente caracterizadas, del hongo *Gibberella fujikuroi* y de plantas superiores. Asimismo, en estos organismos se ha detectado la presencia de giberelinas ligadas; glucósidos, por ejemplo. Sin embargo, dado que estos compuestos son más polares, por lo general, que las giberelinas libres, el método empleado para su obtención es diferente (Larqué y Rodríguez, 1993; Gutierrez,

1996; Reeve y Crozier, 1978; Gaskin y MacMillan, 1978; Hubick y Reid, 1984; Koshioka *et al.*, 1994; Poling, 1991; Bensen, 1990; Durley *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1993 y Korhammer y Haslinger, 1994).

A continuación se describe la técnica utilizada para la obtención de giberelinas libres a partir de composta.

A) EXTRACCION: El solvente empleado para la extracción fue acetona al 80%.

B) PURIFICACION PRELIMINAR: Referida al empleo de una gamma de sistemas de solventes y obtener un coeficiente de partición apropiado.

C) PURIFICACION: Se emplearon columnas Adsorbex RP-18.

I MATERIAL. En nuestro caso se utilizaron muestras de composta previamente secada.

II EXTRACCION. Se toman 50 g de composta y se les adicionan 300 ml de acetona al 80%, dicha mezcla se conserva 24 horas a 4°C y bajo obscuridad. Posteriormente se filtra la muestra, desechando los sólidos; el filtrado se somete a una evaporación para la eliminación de la acetona quedando únicamente el extracto acuoso, el cual se lleva a un pH de 2 mediante la adición de ácido fosfórico. Con dicho extracto se hacen 3 particiones con 50 ml de acetato de etilo cada una, de donde se elimina el extracto acuoso, importando en este caso el extracto orgánico; con éste se hace una partición con 25 ml de fosfato de sodio para la eliminación del extracto orgánico. Al extracto acuoso resultante, se le ajusta el pH a 3, y se hacen 5 particiones con 50 ml de acetato de etilo cada una para la eliminación posterior del extracto acuoso. El extracto

orgánico se somete a una evaporación para la consecuente eliminación del acetato a una temperatura de 40°C y a presión reducida.

III CROMATOGRAFIA EN COLUMNA. Se utiliza una columna Adsorbex RP-18. El residuo obtenido se disuelve con buffer de fosfatos pH=7 y se conserva en refrigeración y obscuridad para su uso posterior.

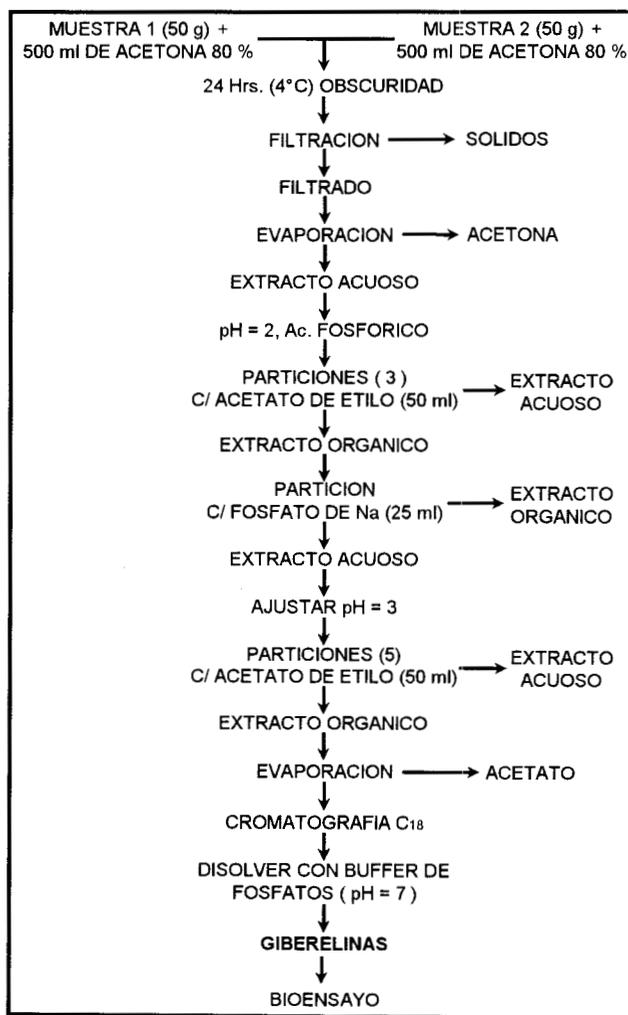


Figura 8. Metodología empleada para la extracción de GAs

IDENTIFICACION (TLC)

Cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizó una cromatoplaqueta de aluminio impregnada de sílica gel Merck 60F254. La muestra se aplica en forma de banda (de 10 a 15 cm de longitud dejando un margen de 2 cm en la parte que se elija como base de la placa) con una micropipeta en varios puntos de la placa; a la misma altura de la muestra, se coloca un patrón de una solución de 10^{-4} M del estándar (ABA, AIA, CIT o GAs según sea el caso). La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente con la fase móvil (eluyente) apropiada; el cromatograma obtenido se seca y se revela bajo luz ultravioleta (UV), ya identificadas las bandas se procede a un revelado final y permanente, aplicando este mediante un aspersor de aire y calentando brevemente la placa después de su aplicación hasta que se empiece a observar color (modificado de Larqué y Rodríguez, 1993).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA (BIOENSAYOS)

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

Como mencionamos precedentemente la presencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal se determina cualitativamente mediante las técnicas anteriormente descritas, pero una herramienta auxiliar en su cuantificación es el empleo de los bioensayos, los cuales ayudan a dar una respuesta sobre su actividad biológica.

Tabla 2. Bioensayos realizados para determinar la actividad biológica de los extractos obtenidos

ABA	AIA	CIT	GAs
Bioensayo de la inhibición de la elongación del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Prueba del segmento del chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	Bioensayo de la senescencia de hojas del trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Bioensayo para giberelinas en plántulas de arroz (<i>Oryza sativa</i>)
Bioensayo de la germinación en <i>Lepidium sativum</i> L.	Prueba del cilindro del coleóptilo del trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Bioensayo de la acumulación de betacianinas en <i>Amaranthus Hybridus</i>	Prueba del crecimiento del tallo del chícharo (<i>Pisum sativum</i>)
Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíces de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Bioensayo de la elongación de raíz de <i>Lepidium sativum</i> L.	Bioensayo de germinación de <i>Lepidium sativum</i> L.	
Bioensayo de la inhibición de la elongación de raíz en <i>Lepidium sativum</i> L.	Bioensayo de la elongación de raíz de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Bioensayo de germinación de <i>Amaranthus Hybridus</i>	

Estos bioensayos se desarrollan bajo condiciones controladas para obtener un resultado más exacto; sin embargo, dada la naturaleza de los extractos obtenidos aún no se encuentra bien definida cual de las técnicas reportadas es la más eficiente y se acerca más a nuestras necesidades, por tal motivo realizamos pruebas comparativas hasta obtener los bioensayos requeridos (Bensen *et al.*, 1990; Brenner, 1981; Weaver, 1972; Brenner, 1981; Russell, 1977; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; e Hiroshi *et al.*, 1977). A continuación se describen brevemente los bioensayos realizados.

ABSCISINAS

Los inhibidores constituyen, entre los reguladores del crecimiento vegetal, un grupo conformado por compuestos con estructura química muy variada que, por

tanto, provocan muy diversos efectos biológicos en las plantas.

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

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

BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LA ELONGACIÓN DEL COLEÓPTILO DEL TRIGO (*Triticum aestivum* L.).

Método: Se ponen a remojar las semillas de *Triticum aestivum* durante 6 horas en agua destilada a una temperatura de 30 ° C. Después de este tiempo, se ponen a germinar en las charolas a las que previamente se les ha colocado un soporte de papel filtro, humedecido con agua destilada. Se siembran aproximadamente 50 semillas por lote, todas con la misma orientación y con el embrión hacia arriba. Las charolas se colocan en la cámara de crecimiento a 20 ° C. y en total

oscuridad. En el transcurso del experimento, estas deberán regarse con agua destilada cada 24 h. Cuando los coleóptilos alcancen una longitud de 2 cm (84 horas aproximadamente) bajo luz verde se remueven del resto de la semilla con las pinzas rectas de punta roma y se colocan en una caja de Petri con agua destilada. Enseguida, se cortan del ápice y de la base con la cortadora de segmentos Wightman, cuidando que los coleóptilos tengan una longitud constante de 1 cm. Conforme se cortan, se ponen nuevamente en una caja de Petri en agua destilada; y se conservan así hasta que son transferidos a los tubos de ensayo, es decir, una vez que todos son cortados, se colocan 10 secciones de coleóptilos en cada tubo de ensayo, los cuales se preparan previamente depositando 1 ml de la solución de ABA o de agua destilada (testigo) o el extracto a analizar. Una vez realizado lo anterior, se sellan los tubos con papel Parafilm y se ponen en el Klinostato (0.138 rpm) en la oscuridad, a 20 °C durante 24 horas.

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

BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LA GERMINACION EN *Lepidium sativum* L. La germinación de las semillas depende de varios factores externos e internos, entre los que pueden mencionarse, además de las condiciones ambientales, la presencia endógena o exógena de los RCV. Si bien el papel de estos no es del todo claro, sobre todo en lo que se refiere al proceso de germinación, se conocen algunos efectos, como resultado de aplicaciones exógenas. El ácido abscísico, en

su papel de inhibidor de la germinación está bien fundamentado experimentalmente, así como su interacción con otros reguladores, básicamente citocininas y giberelinas.

Método: Se seleccionó este tipo de semillas por su rápida germinación, pues incluso en 18 h. se tienen resultados. Se coloca un soporte de papel filtro Whatman No.1 a las cajas de Petri, posteriormente se coloca agua destilada o el estándar (ABA 10^{-4} M) o el extracto a analizar y 10 semillas de *Lepidium sativum* L.. Las cajas así preparadas se tapan y se incuban en la cámara de crecimiento a 25 °C en la oscuridad. Las lecturas de germinación, en porcentajes, pueden realizarse después de 18 a 24 h. de haber establecido el experimento.

BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LA ELONGACIÓN DE RAICES DE TRIGO *Triticum aestivum* L.

BIOENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE LA ELONGACIÓN DE RAIZ EN *Lepidium sativum* L.

Método: En inglés, este bioensayo se conoce como Raft Test (prueba de la balsa) ya que, para su desarrollo, las semillas se flotan sobre la solución nutritiva, utilizando un dispositivo que semeja una balsa. Sobre la balsa se ponen a germinar 30 semillas de *Lepidium* o *Triticum* según sea el caso. La balsa se coloca dentro del cristalizador que contiene 200 ml de solución nutritiva. El estándar (ABA) y el extracto se incorporan al medio, ajustando el pH entre 4.5 y 5.5, si se requiere, con NaOH o HCl 1N, se deja una balsa únicamente conteniendo la solución nutritiva (testigo). Todo el sistema se cubre con una caja de Petri que reducirá la evaporación. Los cristalizadores que se preparen, se incuban en la

cámara de ambiente controlada a 23.5 °C, bajo la luz continua de tubos fluorescentes, por el período que se requiera. Después se determina la longitud de la radícula de las plántulas utilizando escala milimétrica, y se calcula el promedio a partir de los valores obtenidos (King, 1979; Bensen *et al.*, 1990; Weaver, 1972; Brenner, 1981; Saunders, 1978; Hubick y Reid, 1984; Taylor *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993; Russell, 1977; Mitchell y Livingston, 1982, e Hiroshi *et al.*, 1977).

AUXINAS

Las investigaciones iniciadas por Darwin y Darwin y continuadas por Ralther (1894) Boysen-Jensen (1910), Paál (1919), Went (1928) y Söding en 1923 y 1925, como indican McDougall y Hillmann en 1978, nos conducen a la teoría general ya aceptada de que el ácido indolacético es una auxina producida en los ápices de las plantas, como reguladora de la elongación celular en los vegetales. En general los bioensayos empleados ilustran el efecto mencionado mediante la aplicación exógena de soluciones de auxina a coleóptilos. En primer lugar, se flotan los segmentos de coleóptilo en las soluciones de auxina y a continuación se determina el incremento total en la elongación celular (Larqué y Rodríguez, 1993).

Otros bioensayos para auxinas son los diseñados para medir la curvatura de segmentos de tallo o de coleóptilos, han resultado más delicados en su ejecución debido a la dificultad de encontrar sitios cuyas condiciones ambientales estén bien controladas, ya que si hay cambios los resultados pueden alterarse. Por esta razón se han desarrollado bioensayos más sencillos y menos susceptibles a los

factores ambientales. Entre los más aplicados por los fisiólogos vegetales están aquellos que utilizan coleóptilos, segmentos de tallo o raíces como material vegetal de prueba. En ellos, no se miden las curvaturas resultantes de aplicaciones unilaterales, o de la inmersión en las auxinas, sino el incremento en la elongación resultante después de sumergir los cilindros de coleóptilo, segmentos de tallo o raíces en soluciones aireadas de las auxinas en estudio. Los estudios se preparan sumergiendo en agua los segmentos, para determinar la elongación ocurrida por efecto de las auxinas endógenas.

222259

PRUEBA DEL SEGMENTO DEL CHÍCHARO (*Pisum sativum* L.)

Método: Se embeben las semillas de chícharo en agua de 6 a 8 horas y se siembran en las macetas de plástico que contiene vermiculita (20 semillas por maceta). Se dejan germinar y desarrollarse en el cuarto oscuro a 25° C, regando cada vez que sea necesario. Al cabo de una semana aproximadamente, se escogen las plántulas de tamaño uniforme para tomar los segmentos de tallo. Seleccionadas las plantas, se cortan segmentos con una longitud de 20 mm de la parte superior de elongación del segundo entrenudo. En este punto, se recomienda no tocar los segmentos. Conforme van siendo cortados, se colocan en una caja de Petri con agua destilada. Una vez obtenidos todos los segmentos, se secan con papel filtro; luego se ponen muestras de 10 segmentos sobre puentes de papel filtro, apoyados sobre varillas de vidrio y colocados dentro de una caja de Petri con 10 ml de la solución a probar (extracto), o bien, 10 ml de agua destilada a pH 6 en el caso del testigo o en el caso del estándar AIA. Las partes terminales de los puentes de papel filtro deben estar sumergidas en las soluciones de prueba

para suministrar así solución a los segmentos. Después de haber preparado las cajas de Petri en la forma indicada, se tapan e incuban en el cuarto oscuro durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se determina la longitud en mm., Estableciendo la comparación entre el incremento promedio de elongación en los segmentos de cada concentración, extractos y los promedios obtenidos a partir del testigo. Es importante señalar que todas las observaciones y manipulaciones se hicieron bajo la lámpara de luz verde de 60 W.

PRUEBA DEL CILINDRO DEL COLEÓPTILO DEL TRIGO (*Triticum aestivum* L.).

Método: Se remojan las semillas de trigo en agua destilada durante seis horas; enseguida, se ponen a germinar en las charolas, en las que previamente se ha colocado un soporte de papel filtro humedecido con agua destilada. Se siembran aproximadamente 60 semillas por charola, todas con la misma orientación y con el embrión hacia arriba. Se dejan germinar en el cuarto oscuro dentro de una cámara con humedad constante, regando cada 24 horas con agua destilada. Una vez que los coleóptilos han alcanzado una longitud aproximada de dos cm (84 horas aproximadamente) se remueve del resto de la semilla, utilizando las pinzas rectas; a continuación se colocan en una caja de petri con agua destilada. Enseguida, se cortan por el ápice y la base con la cortadora de segmentos Wightman, y se dejan los coleóptilos a una longitud constante de 1 cm. Inmediatamente después de cortarse se colocan nuevamente en agua destilada. El siguiente paso es retirar la hoja primaria de cada segmento y se ensartan 2 segmentos por capilar, dejando que nuevamente floten en agua destilada hasta que sean transferidos a las

soluciones de prueba (extracto, estándar y agua destilada testigo). Terminado el tiempo de tratamiento, se mide la elongación de los coleóptilos en mm.

BIOENSAYO DE LA ELONGACIÓN DE RAÍCES DE TRIGO *Triticum aestivum* L.

BIOENSAYO DE LA ELONGACIÓN DE RAIZ EN *Lepidium sativum* L.

Método: Se remojan las semillas de trigo o *Lepidium* en agua destilada; enseguida, se ponen a germinar en las charolas, en las que previamente se ha colocado un soporte de papel filtro humedecido con agua destilada, todas con la misma orientación y con el embrión hacia arriba. Se dejan germinar en el cuarto oscuro dentro de una cámara con humedad constante, regando cada 24 horas con agua destilada. Una vez que las raíces han alcanzado una longitud aproximada de 0.5 cm se transfieren a nuevas charolas con el estándar (AIA), el extracto y se deja una conteniendo solamente agua (testigo). La caja de Petri se tapa para reducir la evaporación. Las cajas preparadas, se incuban en la cámara de ambiente controlada a 23.5 °C. Después se determina la longitud de la radícula de las plántulas utilizando escala milimétrica, y se calcula el promedio a partir de los valores obtenidos (Bialek y Cohen, 1989; McDougall y Hillman, 1978; Mousdale *et al.*, 1978; Tien *et al.*, 1992; Bensen *et al.*, 1990; Brenner, 1981; Weaver, 1972; Saunders, 1978; Hubick y Reid, 1984; Taylor *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993; Russell, 1977; Mitchell y Livingston, 1982, e Hiroshi *et al.*, 1977).

CITOCININAS

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

Bioensayo de la senescencia de hojas de trigo (*Triticum aestivum L.*).

Método: Se remojan las semillas de trigo en agua corriente durante 6 horas. Estas se siembran en charolas de plástico que contienen la vermiculita húmeda, colocando el embrión hacia arriba, dejando 1.5 cm entre semillas. Las charolas se riegan cada vez que sea necesario. En una semana se tendrán plántulas de entre 10 y 12 cm de longitud. Posteriormente se cortan las plántulas por encima del nivel de la vermiculita, se cortan a 7.5 cm de las puntas separando solo las primeras hojas.

Se vierten 10 ml de cada una de las soluciones a probar (estándar kinetina, extracto y agua destilada como testigo) en cajas de Petri. Se colocan las hojas en las cajas, se tapan e incuban en la cámara de ambiente controlado por 4 días a 25 ° C en la oscuridad. La clorofila se extrae y cuantifica inmediatamente después de cortar las hojas y al término de los 4 días se retiran las hojas de las cajas de Petri, colocándolas en tubos de ensayo con papel aluminio, y que a su vez contiene 10 ml de etanol al 90 %, estos se introducen en baño maría, previamente tapados con las canicas, elevando gradualmente la temperatura hasta llegar a 80°C,

manteniéndose así por 10 min (no debe ocurrir ebullición); se dejan enfriar los tubos, determinando la densidad óptica en el espectrofotómetro a 665 nm, expresando lo resultados como densidad óptica/mg de hoja.

ACUMULACIÓN DE BETACIANINAS EN *Amaranthus hybridus* L.

Método: En dos cristalizadores con agua destilada que contiene algodón y papel filtro se colocan 400 semillas de Amarantho, tapándolos para evitar deshidratación y poniéndolos en cuarto oscuro a 25°C. En el cuarto oscuro bajo luz verde, se coloca en las cajas Petri 5 ml de cada una de las soluciones a probar, agregando 20 cotiledones de amaranto germinado a los que se les ha dejado un segmento de 5 mm de hipocotilo, del mismo tamaño, quedando estos en contacto con el papel filtro, previamente humedecido; Se preparará una caja testigo (agua destilada) por cada tratamiento. Se tapan las cajas y se dejan incubar a 25°C durante 24 h. en la oscuridad. Posteriormente se transfieren los cotiledones a tubos de ensayo que contienen 4 ml de etanol al 10%, colocándolos en baño maría entre 50 y 60 °C durante 30 min, procurando agitarlos en el vortex cada 10 min. Se observará que el etanol adquirió una coloración violeta y en este momento se determina la densidad óptica a 537-620 nm, poniendo como blanco el etanol al 10%.

BIOENSAYO DE LA GERMINACION EN *Lepidium sativum* L.

BIOENSAYO DE LA GERMINACION DE *Amaranthus Hybridus*.

La germinación de las semillas depende de varios factores externos e internos, entre los que pueden mencionarse, además de las condiciones ambientales, la presencia endógena o exógena de los RCV. Si bien el papel de estos no es del

todo claro, sobre todo en lo que se refiere al proceso de germinación, se conocen algunos efectos, como resultado de aplicaciones exógenas. Las citocininas, en su papel de promotor de la germinación esta bien fundamentado experimentalmente.

Método: Se seleccionó este tipo de semillas por su rápida germinación, pues incluso en 18 h. se tienen resultados. Se coloca un soporte de papel filtro Whatman No.1 a las cajas de Petri, posteriormente se coloca agua destilada o el estándar (ABA 10^{-4} M) o el extracto a analizar y 10 semillas de *Lepidium* o *Amaranthus*, según sea el caso. Las cajas así preparadas se tapan y se incuban en la cámara de crecimiento a 25 °C en la oscuridad. Las lecturas de germinación, en porcentajes, pueden realizarse después de 18 a 24 h. de haber establecido el experimento (Bialek y Cohen, 1989; Horgan, 1978; Hernández-Miñana, 1991; Korhammer y Haslinger, 1994; Boerjan *et al.*, 1992; Bensen *et al.*, 1990; Weaver, 1972; Brenner, 1981; Hubick y Reid, 1984; Taylor *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993; Russell, 1977 y Mitchell y Livingston, 1982).

GIBERELINAS

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

vegetales responden a la aplicación de giberelinas acusando prolongación en sus brotes.

BIOENSAYO PARA GIBERELINAS EN PLANTULAS DE ARROZ *Oryza sativa* L.

Método: Se requiere una solución al 1% de agar y se disuelve en baño María, agitando vigorosamente para evitar la formación de grumos. Una vez disuelto rápidamente se vacía en los vasos de precipitado de 10 ml procurando llenarlos casi hasta el borde, se dejan enfriar a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se seleccionan las semillas de arroz y se ponen a germinar en un vaso de precipitado de 250 ml, que contiene agua destilada a 3/4 partes de su volumen. Las semillas que floten se eliminan y las que se queden en remojo se incuban en la cámara de ambiente húmedo durante 72 h. con luz blanca fluorescente. Posteriormente se retira el vaso de precipitado de la cámara y las semillas germinadas se colocan cuidadosamente en una caja de Petri con un poco de agua destilada. Se hace una selección de las semillas que muestren mas uniformidad en su desarrollo. Estas se colocan sobre los vasos de precipitado que contienen el agar ya solidificado, de tal manera que las semillas se introduzcan hasta la mitad y que los coleóptilos queden perpendiculares a la superficie del agar. Estos se colocan en el cristalizador que se tapa con la placa de vidrio y se llevan nuevamente a la cámara de ambiente húmedo. Cuando emergen las primeras 72 horas, el cristalizador se retira de la cámara y se lleva al laboratorio, secando perfectamente con una tira de papel filtro la base de las hojitas, en donde se aplicarán las microgotas de las diferentes soluciones a prueba. Enseguida se coloca en la base de las hojitas una microgota de cada una de las soluciones. Nuevamente se colocan los vasos en la

cámara de ambiente húmedo y transcurridos 7 u 8 días se realizan las lecturas, determinando en mm, el largo de la vaina de la 2a hoja.

PRUEBA DE CRECIMIENTO DEL TALLO DEL CHÍCHARO *Pisum sativum L.*

Método: Se inicia con remojar las semillas de chícharo de 6 a 8 h, en agua corriente, sembrando solo las que hayan embebido en las macetas de plástico que contiene el suelo fertilizado y regado a capacidad de campo (5 semillas por maceta). Las macetas se mantienen en el invernadero regándolas cada vez que sea necesario. Hacia el décimo día cuando el cuarto entrenudo se alarga, las plantas están listas para el bioensayo. Se mide y registra la altura de cada planta, tomando la lectura desde el ras del suelo hasta el ápice del tallo. Se marcan las plantas o macetas para diferenciarlas.

Los tratamientos se aplican de la siguiente manera: Macetas I. Se asperja con agua destilada que contiene Tween 20 (6 gotas por litro) como testigo, macetas II Se asperjan con el estándar (ácido giberélico) y macetas III Se asperjan con los diferentes extractos. La aspersion de las soluciones se puede hacer sobre toda la planta, en especial sobre el ápice. Una semana después de aplicada la última aspersion, se determina la altura de cada planta y se determina el incremento medio en altura, realizando comparaciones de resultados (Zhang *et al.*, 1993; Korhammer y Haslinger, 1994; Koshioka *et al.*, 1994; Poling, 1991; Bensen, 1990; Durley *et al.*, 1989 y Larqué y Rodríguez, 1993).

RESULTADOS y DISCUSIONES

ANÁLISIS DE LA COMPOSTA

Los resultados de la determinación de los contenidos totales de los elementos analizados en la muestra de composta empleada para el análisis de los RCV se presenta a continuación:

Tabla 3 Análisis químico (contenido total en ppm)

ELEMENTO	ppm	ELEMENTO	ppm
Fósforo	5656.5	Hierro	6882.2
Potasio	2369.8	Cinc	498.9
Calcio	26610.7	Cobre	< 5.0
Magnesio	10026.8		

La variabilidad que presentan los resultados, es consecuencia de la heterogeneidad que caracteriza a las compostas como producto terminal aunque no hay que obviar las peculiaridades de cada una de las rutinas analíticas escogidas; similares observaciones son reportadas por Gray *et al.* (1973).

Los obtenidos para la mayor parte de los elementos analizados pero de cualquier manera se hace necesario precisar qué rango de valores es adecuado para un material cuya aplicación al suelo es del orden de las t/ha. Baste como ejemplo el hecho de que una aplicación de 10 t/ha a un suelo cualquiera, con el objetivo de restaurar o mejorar su calidad productiva (lo que es técnicamente aceptable); representaría una aplicación neta de 100.23 y 68.81 kg/ha de magnesio y fierro,

independientemente de que se trata de valores de concentración total, lo que supone que la totalidad del elemento no queda disponible para el consumo vegetal o la interacción con el suelo al mismo tiempo, queda demostrada la conveniencia de caracterizar químicamente a la materia prima empleada en los procesos de composteo, como alternativa para precisar el impacto ambiental del uso agrícola de las compostas.

Igualmente, la notable presencia de fierro y cinc detectada, sugiere la inclusión en el esquema analítico propuesto para estos materiales, de la determinación de otros elementos metálicos como níquel, cromo, cadmio, plomo y manganeso, dadas las semejanzas químicas que los relacionan con aquellos y la importancia que se les atribuye como contaminantes.

Por otra parte, al observar la tabla 4, el grado de disponibilidad nutrimental que caracteriza a la composta, llama la atención que esa magnitud es proporcionalmente muy inferior (solamente para potasio se alcanzan porcentajes superiores al 10%) al valor correspondiente de concentración total, aunque cabe señalar que hay coincidencias con lo precisado con Biddlestone y Gray (1991) y Kuhlman (1992). Este resultado, que también avala la elevada calidad nutricional de la composta procesada, justifica la interpretación de esa característica respecto al consumo vegetal inmediato y en cuanto al efecto adicional que significa el incremento en conjunto de nutrientes del suelo como resultado de los procesos de transformación y degradación que se ponen en marcha durante la interacción composta/suelo.

Tabla 4 Análisis químico (contenido asimilable en ppm)

ELEMENTO	ppm	ELEMENTO	ppm
Nitrógeno	285.35	Magnesio	82.1
Fósforo	113.2	Hierro	61.5
Potasio	374.1	Cinc	1.50
Calcio	198.0	Cobre	0.17

Al igual que en la determinación de los contenidos totales, se pone de manifiesto que la naturaleza de los materiales seleccionados para el proceso de composteo, determina la composición química resultante. Así se explicaría la casi ausencia del cobre.

Conviene hacer aquí una reflexión sobre los métodos de extracción empleados. Se prefirió la acenización y el tratamiento ácido para la evaluación del contenido total por el carácter múltiple del proceso extractivo y por su agresividad; sin embargo, para los valores de concentración asimilable se decidió el empleo de agua (para nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, zinc y carbono) y EDTA disódico (para cobre y fierro) como agentes de extracción, de acuerdo con el criterio de que un tratamiento más enérgico a las muestras, además del mayor volumen de trabajo que significaría por su especificidad, hubiesen significado una sobrestimación de los parámetros en estudio. Es criterio propio que la extracción con agua favorece la evaluación en el sentido de reflejar la disponibilidad en su acepción más inmediata además de corresponder de alguna manera con la heterogénea naturaleza del producto analizado.

Tabla 5 Análisis químico (contenido de carbono en ppm). Extracto acuoso y relación C/N

	C_{TOTAL}	C_{ORGANICO} (%)	C_{TOTAL}/N_{TOTAL} hidrosoluble
COMPOSTA	2744.1	99.9	9.70

Respecto al contenido de carbono y la relación carbono/nitrógeno, que es la información que aparece en la Tabla 5, los valores altos de concentración de carbono corresponden a que la composta es de reciente elaboración; esa relación inversa que puede establecerse, entre contenido de carbono y tiempo de elaboración, demuestra que la composta no es un producto bioquímicamente estable y que su composición cambia ininterrumpidamente, (Trejo Vázquez, 1994). En cuanto a la relación carbono/nitrógeno, aunque la literatura reporta diferentes criterios para su estimación, basados fundamentalmente en la vía de análisis escogida, hay coincidencia en asociar el decrecimiento de su valor con el grado de descomposición o el completamiento del proceso de composteo (Melillo *et al.*, 1982; Finstein *et al.*, 1986; Giusguiani *et al.*, 1989 e Iglesias Jiménez y Pérez García, 1992). De modo general, se reconocen como aceptables valores inferiores a 20 y se plantea que los mismos se asocian a compostas de buena calidad; también hay la tendencia a establecer este indicador a partir de extractos acuosos de acuerdo a lo demostrado por Chanyasak y Kubota (1981) y a lo discutido por Levi-Minzi *et al.* (1990) y por Iglesias Jiménez y Pérez García (1992).

La Tabla 6 contiene el resultado de las determinaciones de la densidad, humedad y cenizas mientras que la Tabla 7 presenta lo correspondiente a pH y

conductividad eléctrica.

Tabla 6 Determinaciones físicas.

	Densidad (g/L)	Humedad (%)	Cenizas (%)
COMPOSTA	456.5	44.5	49.1

En la Tabla 6 se observa, un efecto directo entre el porcentaje de humedad y la densidad y nuevamente, la influencia de la naturaleza del material composteado sobre el resultado analítico, en este caso el porcentaje de cenizas. Hay concordancia, en términos generales, con lo reportado por Finstein *et al.* (1986) y Giusguiani *et al.* (1989) pero es comprensible que valores de humedad superiores al 40 % signifiquen una desventaja a los efectos de la cantidad neta de composta que se logra aplicar al suelo. Igualmente, una elevada proporción de cenizas en la muestra, sugiere mayor estabilidad ante la descomposición y eso equivale a menor grado de interacción composta/suelo. Comparando la Tabla 3 y 6 se observa que la determinación analítica es dependiente del porcentaje de cenizas que aporta la muestra.

Los valores de la Tabla 7 dependen tanto de la naturaleza del material originario como del grado de evolución de la composta. Nuevamente se manifiesta la necesidad de contar con observaciones a lo largo del proceso de composteo para evaluar tendencias y no resultados puntuales. Baste señalar entonces, como observación, que el proceso de maduración da lugar también a un aumento porcentual de ácidos húmicos que no se correspondería con el elevado valor de pH de la composta.

Tabla 7 Determinaciones físico-químicas

	pH	C.E.*
COMPOSTA	9.20	7.57

*C.E.: Conductividad Eléctrica (mseg/cm)

EXTRACCIÓN DE RCV

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

De acuerdo con el análisis realizado a la muestra (composta) para la extracción de RCV, se esperaría encontrar alguna(s) de las posibilidades que muestra la tabla 8 de acuerdo a lo reportado por García-Martínez (1995).

TABLA 8 Posibilidades de la presencia de RCV en la composta

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

Como muestra la tabla 8 la posibilidad V indica un efecto sinérgico que puede existir entre una mezcla de RCV (Gutiérrez, 1996 y Zhang *et al.*, 1993) o en

definitiva la nula presencia de estos o al menos la existencia de dos. Las posibilidades restantes (I, II, III y IV) son puntuales marcando la presencia de solo algún RCV.

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

Como muestra la Tabla 1 de acuerdo a la literatura consultada se probaron los solventes o mezclas de estos para la extracción de nuestros grupos de RCV (ABA & AIA, CIT y GAs). Sin embargo los solventes que cumplieron con el objetivo planteado fueron los mostrados en la Tabla 9. Ya que estos no causaban efectos a los RCV durante la extracción, es decir que no alteraban la estructura, causa principal de resultados erróneos durante el análisis de estos (Horgan, 1987).

Tabla 9. Solventes empleados para la extracción de RCV

SOLVENTE EMPLEADO	ABA	AIA	CIT	GAs
Metanol al 80%	⊗	⊗		
Acetona al 80%				⊗
Acido clorhídrico/metanol			⊗	

La muestra para el análisis se homogenizó con el solvente apropiado, posteriormente se envasó y guardó a una temperatura de 2-4°C. Exceptuando la

muestra para el análisis de citocininas. Posteriormente se mezcló y procedió de acuerdo a la técnica empleada (ver figuras 6, 7 y 8) (Gutiérrez, 1996; Hubick y Reid, 1984; Korhammer, 1994 Larqué y Rodríguez, 1993; Brenner, 1981 y Hedden, 1993).

El empleo de columnas Adsorbex RP-18, empacada con sílicageles sintéticos, resulto de gran ayuda para la purificación, debido a la naturaleza tan heterogénea de la muestra (García-Martínez *et al.*, 1995 y Arozarena *et al.*, 1995) la existencia de una gamma de pigmentos vegetales y grasas animales, las cuales interferían en la técnica empleada, provocando que en ocasiones la obturación de las columnas, debido a la presencia de un exceso de estos (Hedden, 1993; Taylor *et al.*, 1994; Poling, 1991; y Durley, 1989). Para evitar tales efectos se aumento la cantidad de solvente empleado (Gutiérrez, 1996), llegando a ocupar hasta 500 ml de solvente para una muestra de 50 gramos de composta.

El volumen obtenido inicialmente, procedente de la extracción y posterior filtrado, es decir a partir de la primera etapa de la técnica, se comparó con el que se obtuvo al finalizar toda la técnica (denominado volumen del extracto), obteniéndose un rendimiento del 10% para ABA, AIA y GAs, mientras que para CIT fue de 40%.

Por otra parte una técnica auxiliar empleada comúnmente para la comprobación de la técnica (Durley *et al.*, 1989; Gutiérrez, 1996; y Larqué, 1995), es el uso de un estándar durante la extracción, es decir se coloca un patrón conocido del RCV

(AIA, ABA, Kinetina o Ac. Giberélico), en lugar de la muestra y se realiza la extracción, empleando la técnica apropiada, al final se determina si tal estándar no sufrió un cambio en su estructura (comúnmente ocurrida al extraer las GAs) y poder estar seguros que la técnica no causará alteraciones en la muestra y así arroje resultados erróneos (Brenner, 1981).

IDENTIFICACIÓN (TLC)

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

Posterior a la extracción se procedió con la identificación, empleando cromatografía en capa fina (TLC). Se empleó una cromatoplaqueta de aluminio impregnada de sílica gel. La muestra se aplica en forma de banda con una micropipeta en varios puntos de la placa; a la misma altura de la muestra, se coloca un patrón de una solución de 10^{-4} M del estándar (ABA, AIA, CIT o GAs

según sea el caso). La cromatografía se desarrolla a temperatura ambiente con la fase móvil (FM) apropiada. Sin embargo el empleo de la FM apropiada para cada grupo de RCV acusó un serio problema que resolver, por tanto se optó por el uso y posterior selección de siete FM reportadas como buen eluyente. En la tabla 10 se muestra la caracterización de cada una (Tien *et al.*, 1979; Russell, 1977; Hubick y Reid, 1984; McDougall y Hilman, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Horgan, 1978; y Saunders, 1978).

Tabla 10 Composición de la FM empleadas

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

A pesar de poseer un alto grado de especificidad para los RCV a analizar, no todas la FM resultaron con una calificación apropiada, pues el cromatograma obtenido se seca y se revela bajo luz ultravioleta (UV), el cual muestra de manera rápida como se había desplazado la muestra por la placa. Para poder determinar cual FM era la indicada para cada grupo (a pesar de haber probado todas las FM para todos los grupos de RCV), se procedió a proporcionar una calificación a cada una de ellas, sobre la base de su Rf obtenido, siendo un valor de 0.5 el ideal (Cruz, 1996, Hernández-Miñana, 1991).

Tabla 11 Calificación para las FM empleadas, posterior a su revelación

REVELADOR	I	II	III	IV	V	VI	VII
ABA	E	M	R	B	R	M	R
AIA	E	M	R	B	R	M	R
CIT	R	R	R	M	E	M	M
Gas	E	M	M	E	M	M	M

E: Excelente, B: Bueno, R: Regular y M: Malo.

Como podemos apreciar en la tabla 11, las mejores FM fueron las caracterizadas como I para ABA & AIA, IV para CIT y V para GAs. Todas ellas con un Rf de 0.5 y un nivel de significancia de 0.001 (SAS, 1982).

Posterior a la identificación de las bandas o manchas obtenidas a partir de la primera fase, se procede a un revelado final y permanente, aplicando este mediante un aspersor de aire y calentando brevemente la placa después de su aplicación hasta que se empiece a observar color (modificado de Larqué y Rodríguez, 1993). Pero al igual que con la FM este revelado comprendería una serie de ensayos para la obtención del ideal, siendo una característica para tal fin que el revelado fuese marcadamente visible y permanente. Como se muestra en las tablas 12 y 13 (todos los reveladores se aplicaron a todas las muestras) no hubo diferencia significativa que marcara la preferencia para alguno de ellos, pudiéndose emplear de manera similar cualquiera de estos (SAS, 1988; Cruz, 1996; Tien *et al.*, 1979; Russell, 1977; Hubick y Reid, 1984; McDougall y Hilman, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Horgan, 1978; y Saunders, 1978).

Tabla 12 Composición de los reveladores empleados

REVELADOR	COMPOSICION
R - 1	Etanol: ácido sulfúrico (90:10).
R - 2	Acido sulfúrico: etanol al 5% (1:1).
R - 3	Universal (Sulfato cérico, hielo frapé y ácido sulfúrico).

Tabla 13 Calificación proporcionada para cada revelador empleado

	ABA	AIA	CIT	GAs
R - 1	B	B	B	B
R - 2	B	B	B	B
R - 3	B	B	B	B

E: Excelente, B: Bueno, R: Regular y M: Malo.

Tabla 14 Empleo de la FM y revelador adecuado

	ABA	AIA	CIT	GAs
Fase Móvil	FM - I	FM - I	FM - V	FM - I y IV
Revelador	1, 2 & 3	1, 2 & 3	1, 2 & 3	1, 2 & 3

Como se muestra en la tabla 14 para cada grupo independiente de RCV se encontró una FM que diera como resultado un Rf de 0.5, considerado como ideal (Hernández-Miñana, 1991), sin embargo para el caso del revelador todos dieron una respuesta idéntica, pudiendo optar por cualquiera de ellos. Los resultados obtenidos a partir de la identificación, empleando la FM y revelador idóneo se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 15. Rf obtenidos para la identificación de los RCV

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

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

Como se mencionó anteriormente se empleo un estándar como referencia de comparación para determinar si la banda o mancha encontrada correspondía a algún compuesto de peso molecular parecido al RCV aislado. La tabla 15 muestra las medias representativas de un sinnúmero de repeticiones, las cuales demuestran la presencia de sustancias probables RCV en los extractos y de peso molecular parecido al de ABA y AIA, mientras que para los grupos CIT y GAs no hay evidencia significativa que muestre la presencia de estos, ya que sus Rf nos indican una ausencia total comparándola con el estándar, sin embargo posteriormente a todas las muestras se les determinó su actividad biológica, para reafirmar los resultados de la TLC (King, 1979; Horgan, 1987, Tien *et al.*, 1979; Russell, 1977; Hubick y Reid, 1984; McDougall y Hilman, 1978; Reeve y Crozier, 1978; Horgan, 1978; Saunders, 1978; Larqué y Rodríguez, 1993 y Gutiérrez, 1996).

BIOENSAYOS

Los bioensayos juegan un papel muy importante en la extracción, aislamiento y posterior identificación de los RCV. Ya que sirven como una herramienta de identificación, sin embargo dada la naturaleza de la muestra analizada se procedió a la selección del o los bioensayos que proporcionarían una mejor respuesta, ya que existen dos limitantes para el empleo de los bioensayos, estas son la selectividad y sensibilidad, por ello hay que tener en cuenta estos criterios al emplearlos para obtener resultados confiables y fehacientes en el análisis de RCV. En la tabla 2 se muestran todos los bioensayos que se realizaron, posteriormente se seleccionaron los más apropiados para nuestros objetivos (ver tabla 16), es decir aquellos que mostraban una buena sensibilidad y un resultado rápido (Gutiérrez, 1996, Larqué y Rodríguez 1993).

Tabla 16 Bioensayos empleados para determinar la actividad biológica de los extractos.

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

Estos bioensayos se desarrollaron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, para obtener un resultado más exacto. La respuesta obtenida para esta parte del análisis es puntual, es decir no se cuantifica la concentración del RCV,

sino que solo se determina puntualmente si existe evidencia de la presencia de este o no. Así los bioensayos arrojaron los siguientes resultados, existe evidencia de la presencia de ABA, AIA y CIT, no siendo así para el extracto de GAs. Estos resultados nos muestran que solo el extracto obtenido para giberelinas no tiene actividad biológica como tal, siendo que en los extractos restantes hubo evidencia de dicha actividad (Larqué y Rodríguez, 1993; Bensen *et al.*, 1990; Brenner, 1981; Weaver, 1972; Brenner, 1981; Gutiérrez, 1996; Russell, 1977; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; e Hiroshi *et al.*, 1977). Para una mayor visualización de estos resultados podemos observar la tabla 17.

Tabla 17. Resultados de los bioensayos empleados

RCV	RESULTADO DEL BIOENSAYO
ABSCISINAS	POSITIVO
AUXINAS	POSITIVO
CITOCININAS	POSITIVO
GIBERELINAS	NEGATIVO

Para el caso del ABA en los bioensayos observamos un efecto positivo, debido a que el efecto inhibitorio se determinó al realizar todas las pruebas, pues es considerado como el causante de la inhibición de la germinación de semillas, la apertura estomatal y, en general del crecimiento vegetal. Para las auxinas, los bioensayos mostraron la presencia de este compuesto, debido a que en general es el causante de efectos tales como estimulación del crecimiento del tallo, de la división celular, inhibición del crecimiento radical, etc. pero estos efectos observados durante la aplicación del extracto a los bioensayos dieron la pauta a

decir que existe la posibilidad de la presencia de algún compuesto de actividad biológica de una auxina. Pero hay que tomar en cuenta que a concentraciones relativamente altas de auxinas provocan un efecto de inhibición por lo cual cabe señalar que se analizó la muestra (extracto) a diferentes concentraciones y poder determinar si el efecto es debido a este factor.

Las citocininas también dieron positivo el bioensayo, es decir que el extracto analizado muestra evidencia para decir que existe algún compuesto con actividad de citocinina.

Cabe señalar que al igual que los resultados de los bioensayos sólo con un segundo análisis adicional y complementario podríamos definir si es válido o no nuestro argumento, pues es importante señalar que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, ya que éstos están influenciados también por otros factores (no hormonales y nutricionales), tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, efectos físicos como luz, temperatura y aún por la calidad y tipo de la planta o tejido empleado (Hurtado y Merino, 1994).

Como mencionamos anteriormente existe la posibilidad de la presencia de probables RCV en la muestra analizada, sin embargo recordemos que tanto los bioensayos como la TLC son herramientas complementarias y para poder dar un argumento íntegro acerca de la presencia o no habría que comparar ambas técnicas (Hubick y Reid, 1984; Brenner, 1981; y Horgan, 1987)

TLC-Bioensayo

Para poder determinar si el extracto obtenido a partir de la composta contiene algún RCV se procedió a realizar una comparación entre las técnicas empleadas, como podemos ver en la tabla 18.

Tabla 18 Análisis comparativo de resultados entre TLC y bioensayos

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

BIOS: Bioensayo; TLC: Cromatografía en capa fina

Para tener un criterio de clasificación y determinar si existe evidencia de la presencia de algún compuesto probable RCV se tomo como una prueba determinística que solo será positiva la evidencia si ambas pruebas resultan positivas, de lo contrario se considerará escaso de fundamento el análisis para dar el falló positivo a la prueba (Azaola, 1997).

Así pues de acuerdo a la tabla 18 podemos afirmar que hay suficiente evidencia de la presencia de abscisinas y auxinas en la muestra analizada, mientras que para los extractos correspondientes a las citocininas y giberelinas no existe evidencia de la presencia de alguno de estos en la muestra de composta.

ANÁLISIS INDIRECTO

Como una técnica adicional a las empleadas anteriormente se puede echar mano del uso de los bioensayos modificados, es decir se realiza el bioensayo pero ahora se emplea un gradiente de concentración del RCV a analizar (obteniéndose una curva de dosis-respuesta) y el extracto obtenido, esto para poder encontrar de manera indirecta la concentración del RCV, ya que se compara la curva patrón o estándar con el resultado del bioensayo aplicado al extracto, este resultado se extrapola obteniéndose así de manera indirecta la probable concentración del RCV (Larqué, 1995).

Debido a los resultados obtenidos anteriormente solo se practico el análisis indirecto para las muestras de ABA y AIA, pues son las únicas que presentan evidencia de la presencia del RCV. En la tabla 19 se muestran los bioensayos empleados para este análisis indirecto.

Tabla 19 Bioensayos empleados para determinar la concentración de RCV.

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

Solo se emplearon estos bioensayos ya que son los que mejor cubren con los requisitos indispensables: buena sensibilidad, selectividad y rápida respuesta (Larqué, 1995; Bensen *et al.*, 1990; Brenner, 1981; Weaver, 1972; Brenner, 1981; Russell, 1977; Mitchell y Livingston, 1982; Hubick y Reid, 1984; e Hiroshi *et al.*,

1977).

Para el caso del ABA se emplearon los bioensayos de la inhibición de la germinación en *Lepidium sativum* y de la inhibición de la elongación de raíces de *Lepidium sativum*. Para la realización de esta parte del análisis en una primera etapa se realizó el bioensayo empleando un curva patrón de dosis respuesta, la cual tendría un gradiente de concentración de 10^{-4} a 10^{-12} M de ácido abscísico. Posteriormente en una segunda etapa se realizó ahora la prueba colocando ahora el extracto a analizar y un testigo (agua destilada con buffer de fosfatos). Los resultados se compararon y posteriormente se realizó una extrapolación para determinar la concentración aproximada del ABA en el extracto.

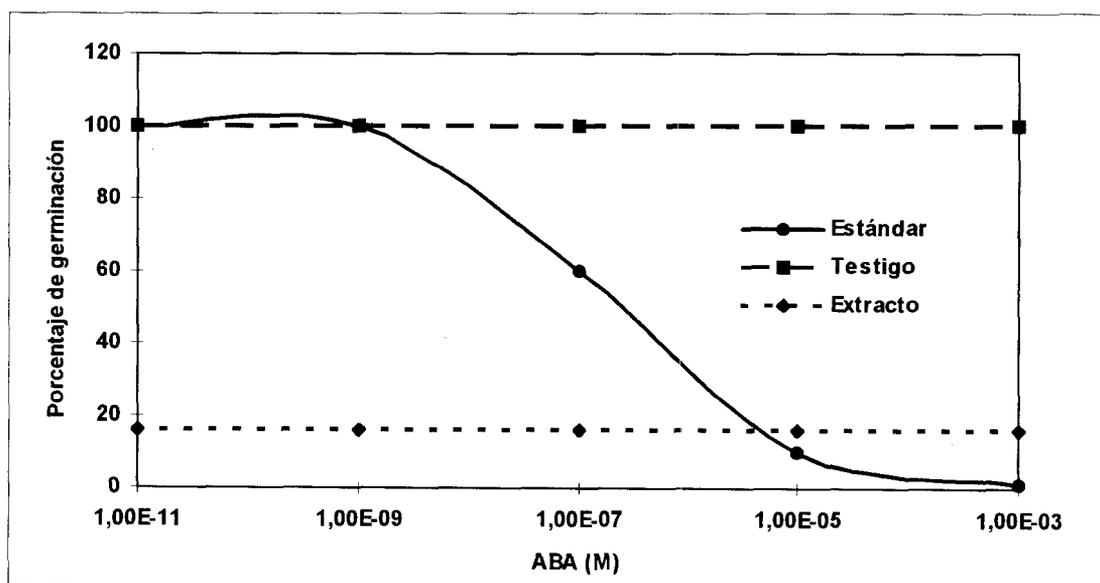


Figura 9. Gráfica de la inhibición del ABA en la germinación de *Lepidium sativum* con respecto al porcentaje de germinación

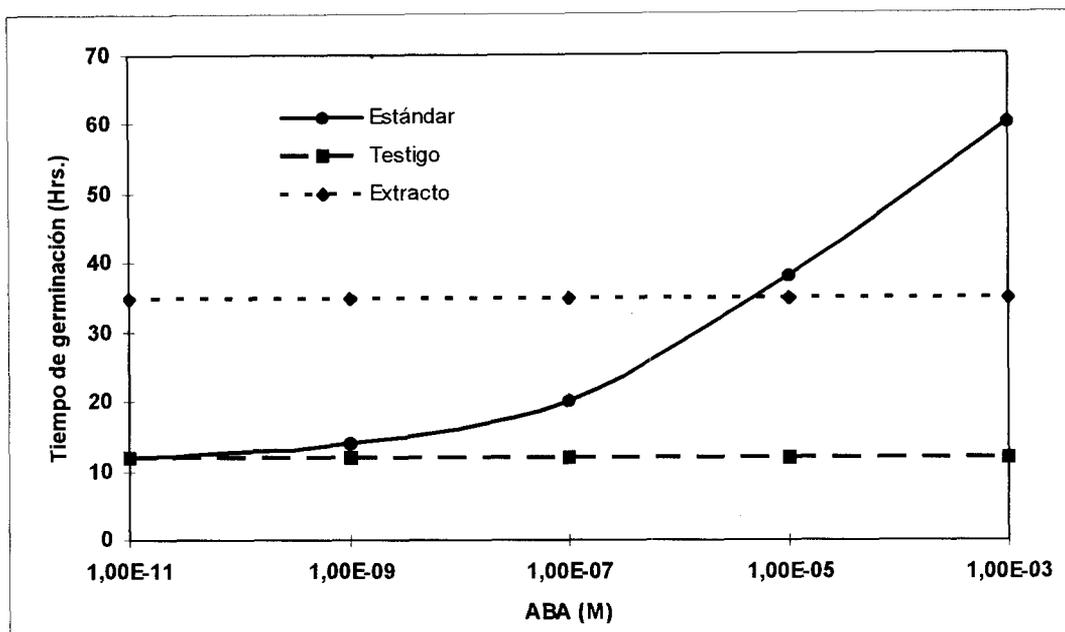


Figura 10. Gráfica de la inhibición de ABA en la germinación de *Lepidium sativum* con respecto al tiempo.

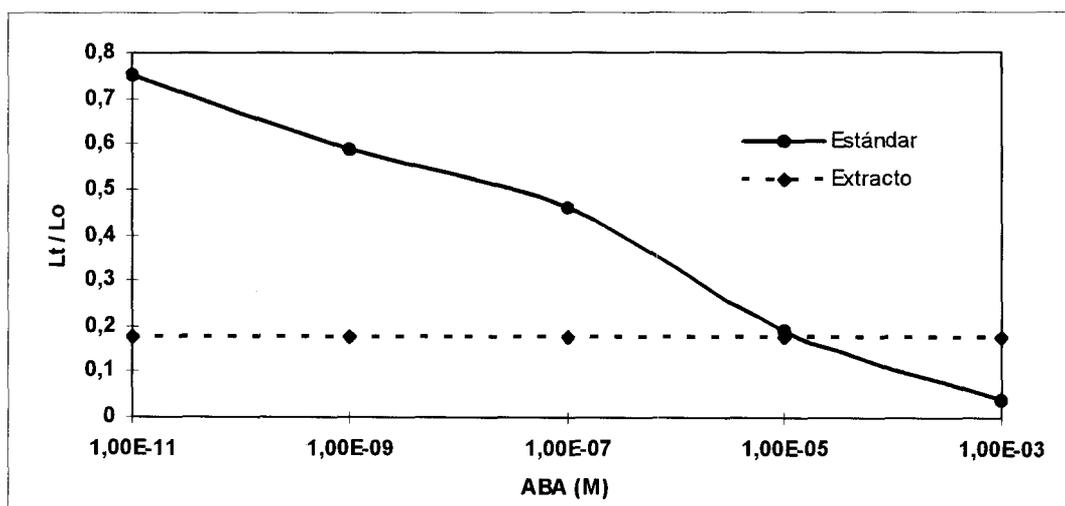


Figura 11. Gráfica de la inhibición de ABA en la elongación de raíces de *Lepidium sativum*.

Lt: Longitud del lote tratado, Lo: Longitud del lote testigo

Como lo muestra la figura 9 la curva de dosis respuesta nos indica que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de ABA y el porcentaje de inhibición, de tal motivo que a una concentración alta de ABA la germinación de

semillas de *Lepidium* se ve casi totalmente inhibida. Por otra parte en comparación con los resultados obtenidos a partir del extracto, podemos apreciar que cae en un rango dentro de los niveles de la curva patrón. La figura 10, no indica que aún después de un lapso de tiempo moderado la inhibición de la germinación sigue acentuada, mostrando el cada vez mas marcado efecto del ABA en el extracto.

Para una mayor percepción del efecto tanto de la curva dosis-respuesta como del testigo y el extracto, podemos observar la figura 11, la cual nuevamente indica que en nuestro extracto obtenido existe la presencia de ABA. Por otra parte los datos fueron analizados de acuerdo a SAS, 1982. Obteniéndose que la concentración aproximada de ABA en el extracto es de $1.0015 \cdot 10^{-5}$ M con un nivel de significancia de 0.0001.

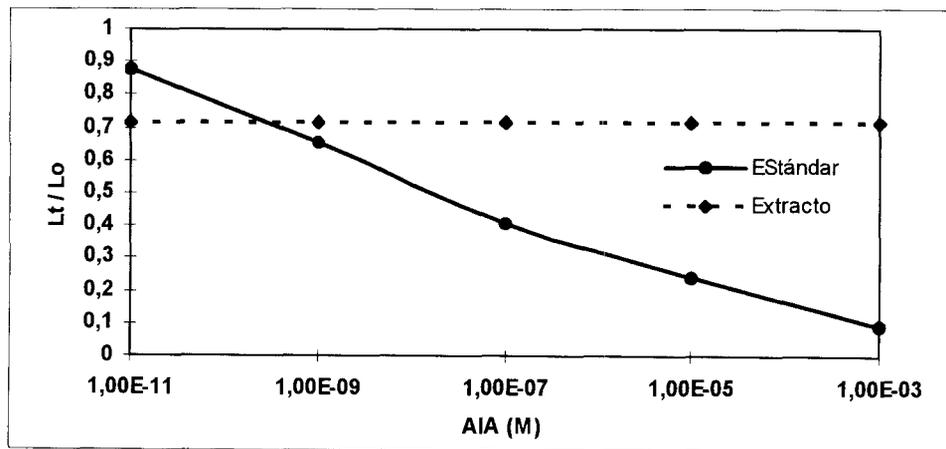


Figura 12. Gráfica del efecto del AIA en la elongación de la raíz de trigo *Triticum aestivum*. Lt: Longitud del lote tratado, Lo: Longitud del lote testigo

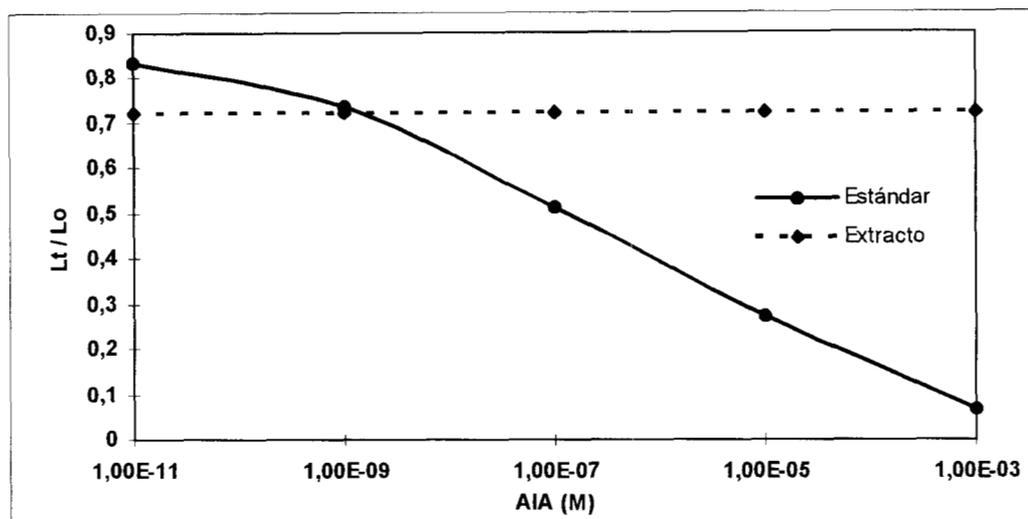


Figura 13. Gráfica de la inhibición de AIA en la elongación de la raíz de *Amaranthus Hybridus*.

Lt: Longitud del lote tratado, Lo: Longitud del lote testigo

La figura 12 muestra el efecto de la concentración del AIA en raíces de trigo, como podemos observar el resultado de la aplicación de este, es directamente proporcional con la inhibición del desarrollo de la raíz. De la misma manera e igual magnitud la figura 13 arroja resultados similares, pero ahora con respecto a raíces de *Amaranthus*, tales efectos comparados con la respuesta observada con la aplicación del extracto, nos muestran de manera inequívoca que en este existe la presencia de un compuesto de actividad biológica de AIA, con una concentración de $2.2927 \cdot 10^{-8}$ M con un nivel de significancia de 0.0001 (SAS, 1982).

FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO

Anteriormente mencionamos algunos de los factores que afectaron el desarrollo de la técnica empleada (FM y revelador para la TLC). Pero otro factor de suma importancia que no se había contemplado, era el empleo del buffer de fosfatos, ya

que en la mayoría de los casos su uso se limitaba a un estabilizador del extracto para su envasado y posterior empleo (Koshioka *et al.*, 1994; Poling, 1991; Durley *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1994 y Zhang *et al.*, 1993). La concentración recomendada es de 0.5 molar (M) y el pH de 7 a 8.

Este buffer se aplicó al producto de la técnica de extracción como paso final y previo al análisis de la actividad biológica (ver figura 6, 7 y 8), pero al realizar los bioensayos con estos extractos, se obtuvo una respuesta negativa para AIA, CIT y GAs. Para corroborar la respuesta de los bioensayos se utilizó un blanco, el cual consistía en colocar una muestra con agua destilada y buffer; al observar el bioensayo, como respuesta se obtuvo que para todos era inhibitorio el buffer, es decir dio una prueba negativa (para AIA, CIT y Gas), por tal motivo se realizó un gradiente de concentración empleando la técnica de McKenzie (1979), el cual estaba contenido en un rango de concentración de 0.1 a 1 M con una diferencia de 0.1 para cada buffer. Posteriormente se aplicaron a los bioensayos y se observó que exceptuando al buffer de concentración 0.1 M todos daban inhibición, por tal motivo se optó por emplear otro gradiente de concentración menor a esta, encontrándose que la mejor era de 10 milimolar (mM) pues el empleo de fosfatos como sal a concentraciones relativamente altas para las células, ocasionan estrés osmótico, de ahí la sensibilidad de los bioensayos empleados, así pues según lo discutido por Gutiérrez (1996), podemos constatar que en efecto a concentraciones de 10 mM el buffer se torna inerte para las células y no lo toman del medio, evitándose así el choque osmótico.

De esta manera el efecto ocasionado por el empleo de un buffer muy concentrado (para concentraciones mayores de 10 mM) se eliminó, permitiendo una determinación de la actividad biológica más certera.

En general

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

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

se observan para concentraciones de alrededor del 30% de composta. (García-Martínez *et al.*, 1995 y López-Sánchez 1996)

Pero estos resultados anteriormente descritos no tienen una respuesta en el análisis de la composta, pues la fracción asimilable de cualquiera de los elementos analizados no rebasa el 10% del valor de su respectiva concentración total, por lo tanto podemos descartar que los cultivos no tienen una respuesta debida a la incorporación de algún nutrimento específico contenido en la composta y permite suponer que la composición química de la muestra analizada no es la responsable de tales atributos, dejando abierta la respuesta a la posible presencia de algún compuesto probable RCV.

Para dar respuesta a esta incógnita se puede observar la tabla 18 donde se muestra que es evidente la presencia de ABA y AIA en la muestra analizada. Cabe señalar que tanto la caracterización de esta como su posterior evaluación agronómica y determinación de RCV corresponden a la misma composta obtenida bajo las mismas condiciones. Habiendo realizado la aclaración anterior proseguiremos.

La respuesta de todas las técnicas empleadas al analizar la muestra de composta, nos muestran que para el caso del ABA, existen los resultados de la tabla 20, mientras que para el AIA, los resultados resumidos están en la tabla 21.

Tabla 20. Análisis de la presencia de ABA en la muestra de composta

Peso de la muestra	Conc. (M) de ABA	Conc. (g/L) de ABA	Conc. final de ABA
50 gramos	$1.0015 \cdot 10^{-5}$	0.0026469	0.0013234 gramos

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

Tabla 21. Análisis de la presencia de AIA en la muestra de composta

Peso de la muestra	Conc. (M) de ABA	Conc. (g/L) de ABA	Conc. final de ABA
50 gramos	$2.2927 \cdot 10^{-8}$	0.000004	0.000002 gramos

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

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de la concentración de ABA muestran que en general se encontró para la muestra analizada un promedio de $2.6 \cdot 10^{-3}$ gramos de ABA por kilogramo de composta obtenida bajo las mismas condiciones que García-Martínez *et al.* (1995).

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

Sin embargo efectos observados en los cultivos donde se incorporó composta no son causados únicamente por la adición de nutrientes externos, como nitrógeno, fósforo, potasio, etc. o algún RCV endógeno. Sino es importante señalar que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos,

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

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

CONCLUSIONES

Los resultados del análisis químico presentan una variabilidad que se corresponde con el alto grado de heterogeneidad que caracteriza cualitativamente a las compostas. Por otra parte la fracción asimilable de cualquier elemento es inferior en magnitud al 10 % del valor de su respectiva concentración total.

La evaluación agronómica debe ser el complemento para el estudio y control del impacto ambiental del empleo de las compostas en la agricultura. La extracción mediante agua es una buena alternativa analítica para el procesamiento y análisis de las compostas.

Valores altos de porcentaje de humedad y de porcentaje de cenizas no son indicadores de buena calidad para las compostas. Las determinaciones de pH, de conductividad eléctrica y de relación carbono/nitrógeno deben realizarse a lo largo del proceso de composteo, para poder establecer la relación que guardan estos indicadores con la calidad del producto obtenido.

De las técnicas establecidas, podemos decir que se obtuvo un buen rendimiento de los extractos, ya que la literatura reporta volúmenes de extracto obtenido inferiores a 1 ml, sin embargo nuestros rendimientos en promedio fueron de 10 ml.

Un factor importante es el empleo de buffers adecuados durante las extracciones y bioensayos, por ser considerado un factor limitante de la técnica, ya que puede conducirnos a resultados erróneos al emplearlos. Un ejemplo de esto, es que una concentración mayor de 10 mM altera los resultados de los bioensayos dando negativas todas las pruebas de los bioensayos, por lo tanto se recomienda su uso a concentraciones de 10 mM.

Otro aspecto importante de este punto, es el empleo del tipo de buffer apropiado, ya que para sistemas biológicos, como es el caso de los bioensayos, es recomendada la utilización de buffer de fosfatos o citratos.

El empleo de la FM adecuada, es un criterio que se debe tomar en cuenta debido a que para el análisis más preciso de la muestra es necesario determinar cual es el solvente o mezcla de solventes a utilizar.

La cromatografía en capa fina (TLC), indica la presencia de compuestos con pesos moleculares parecidos a abscisinas y auxinas, esto es debido a que el Rf obtenido, comparándolo con el estándar es muy parecido y por ende, podemos concluir que estamos extrayendo y purificando tales compuestos. Por otra parte, para el caso de los grupos de citocininas y giberelinas, no se existe evidencia de la presencia de compuestos con peso molecular parecido a estos.

Los bioensayos demostraron que los extractos con actividad biológica son los pertenecientes a los grupos de abscisinas, auxinas y citocininas, sin embargo para

el regulador restante (giberelinas) no hay evidencia de que el extracto tuviera actividad biológica.

En otro punto, en lo que respecta a las muestras empleadas, podemos decir, que dada la naturaleza que les dio origen, la obtención de los extractos fue buena, así pues, para cada grupo podemos decir:

ABSCISINAS (ABA): Este grupo no es su promotor del crecimiento y no se consideraba analizarlo, pero dada la naturaleza estructural (grupo indólico) tan semejante al del las auxinas, se procedió a su extracción, purificación e identificación dando excelentes resultados, ya que la literatura reporta que mezclas de ABA con algún promotor (citocininas, giberelinas y auxinas) da un resultado satisfactorio en el crecimiento de las plantas, de ahí su importancia para este análisis. En particular para nuestra muestra, se puede concluir que existe un compuesto con estructura y actividad biológica parecida a la del ácido abscísico.

AUXINAS (AIA): Para este grupo de reguladores, también se encontró en particular para nuestra muestra, que hay evidencia de compuestos con peso molecular y actividad biológica parecidos al Acido Indolacético. En general esta técnica no presentó problema alguno y se puede concluir que su empleo es satisfactorio.

CITOCININAS: Para este grupo se presentó un aspecto importante, ya que mediante el uso de la TLC, se determinó la no presencia de compuestos

estructuralmente parecidos a las citocininas, sin embargo, se determinó su actividad biológica dando resultado positivo, sin embargo la literatura reporta que algunos procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, ya que éstos están influenciados por otros factores (no hormonales), tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, etc. por tal motivo podemos decir que nuestra muestra en particular no posee algún compuesto con estructura y peso molecular parecido a las citocininas, a pesar de tener la capacidad de tener actividad biológica parecida a citocinina. Por otra parte cabe la duda de que quizás no sean estos los causantes de tal respuesta, siendo atribuida a algún precursor de la biosíntesis de las citocininas, quedando abierta esta hipótesis. Pero para el caso de nuestra analizada (composta) podemos concluir que debido a que solo existe evidencia en una de las pruebas realizadas no existe evidencia de la presencia de citocininas.

GIBERELINAS (GA3): Al igual que los primeros dos grupos, se puede concluir que la técnica cumplió satisfactoriamente con su cometido, ya que tanto la prueba de identificación (TLC), como la de actividad biológica (bioensayo) dio negativa, por lo tanto, para este caso en particular, el extracto no poseía compuestos estructuralmente parecidos a las giberelinas y por ende dando negativa la prueba de actividad biológica.

Con respecto a la cuantificación indirecta de los RCV que dieron un fallo positivo al análisis se encontró que existía en promedio una concentración de $1.0015 \cdot 10^{-5}$ M de ABA, mientras que para el AIA una concentración de $2.2927 \cdot 10^{-8}$ M.

Para el caso de la muestra analizada (composta) posee una concentración de ABA y AIA de 0.0013234 gramos de ABA por kilogramo de composta, mientras que para AIA fue de 0.000002 gramos de AIA por kilogramo de composta.

Finalmente la composta resulta una muestra no convencional para el análisis de RCV, pero con el establecimiento de las técnicas empleadas podemos decir que es posible realizar una evaluación certera de la presencia de tales sustancias en la muestra.

Por tal motivo la muestra analizada de composta obtenida a partir de la metodología empleada en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por García-Martínez *et al.* Posee indicios de contener grupos de RCV concernientes a Abscisinas y Auxinas en una concentración de 0.0013234 gramos y 0.000002 gramos respectivamente por kilogramo de composta.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez M.A.D.; S. Gagne and L. Antoun, (1995). *Applied and Enviromental Microbiology* 61(1): 194-199.
- Arozarena, D.N.J.; I. García-Martínez; R.G. Campos; C.A. Rodríguez; y A. Carmona (1995). Análisis comparativo de compostas I. En: *Productos naturales Vol. 2*. Cruz, S.F.; J.A.Lechuga y J.C. Peña. Editores; UAM-Iztapalapa, México.
- Azaola Espinoza, A.(1997). Comunicación Personal. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Bandurski, R.S. and H.M. Nonhebel (1989). Auxins. In: *Advanced Plant Physiology*; Malcolm B. Wilkins Ed.; Longman Scientific & Tecnical; USA.
- Bandurski, R.S.; J.P. Slovin y J.D. Cohen (1993). Auxinas. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*; J. Azcon-Bieto y M. Talon Editores; Mc Graw-Hill-Interamericana, España.
- Bensen, R.J.; Beall, F.D.; J.E. Mullet and P.W. Morgan, (1990). *Plant Physiol.* 94: 77-84.
- Beyer, M.E.; P.W. Morgan and S.F. Yang (1989). Ethylene. In: *Advanced Plant Physiology*; Malcolm B. Wilkins Ed.; Longman Scientific & Tecnical; USA.
- Bialek K. y J.D. Cohen (1989). *Plant Physiol.* 90: 398-400.
- Biddlestone, A.J. and K.R. Gray, (1991). *Process Biochemistry* 26: 275-279.
- Bidwell, R. G. (1979). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, S. A. México, D.F.

- Boerjan W.; C. Genetello; M.V. Montagu y D. Inzé (1992). *Plant Physiol.* 99: 1090-1098.
- Brenner, M.L., (1981). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 511-538.
- Burch, L.S. y B.A. McGraw (1993). Citoquininas. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*; J. Azcon-Bieto y M. Talon Editores; Mc Graw-Hill-Interamericana, España.
- Crawford, J.H., (1983). *Process Biochemistry.* January/February: 14-18.
- Cruz Sosa, F. (1996). Comunicación Personal. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Chanyasak, V. y H.K. Kubota (1981). *J. Ferment. Technol.* 59:215-219.
- Chapman, H.D. and P.F. Pratt, (1981). *Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters.* Riverside, University of California.
- Chongrak Polprasert, (1989). *Organic Waste Recycling.* Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. John Wiley & Sons. Great Britain.
- Dean C. Alexander, (1993). *Calidad Ambiental* 1(1): 3-5.
- Flanagan, M.S.; R.E. Schmidt and R.B. Reneau, (1993). *HortScience* 28(9): 914-916.
- García-Martínez, I.; Arozarena, D.N.J.; López, S.J.M. y Carmona, A.A. (1995). Producción y evaluación agronómica de compostas. En VII Jornadas de Biotecnología. Cruz, S.F.; J.A. Lechuga y J.C. Peña. Editores; UAM-Iztapalapa, México.

- Gaskin, P. y J. MacMillan (1978). GC and GC-MS techniques for gibberellins. In: Isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de. Cambridge University Press.
- Giusquiani, P.L.; M. Pagliani; G. Gigliotti; D. Businelli and A. Benetti, (1995). *Journal of Enviromental Quality* 24(1): 175-182.
- Giusquiani, P.L.; M. Patuni and M. Businelli, (1989). *Plant and Soil* 116:278-282.
- Gray, K.R.; A.J. Biddlestone and R. Clark, (1973). *Process Biochemestry* October: 11-15.
- Gutierrez, M. (1996). Comunicación Personal. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- Hedden, P., (1993). *Annu. Rev. Plant Physiology* 44: 107-129.
- Hernandez-Miñana, F.M., (1991). *Journal of Horticultural Science*. 66 (4): 505-511.
- Hiroshi, F.; K. Koichi; U. Sadakasu and Y. Yoshimitsu, (1977). *Agric. Biol. Chem.* 41(1): 175-180.
- Hiroshi, F.; K. Koichi; Y. Yoshimitsu and U. Sadakazu, (1977). *Agric. Biol. Chem.* 41(1): 189-194.
- Hiroshi, F.; N. Ryoichi; K. Koichi and Y. Yoshimitsu, (1977). *Agric. Biol. Chem.* 41(1): 187-187.
- Horgan R. (1978). Analytical procedures for cytokinins. In: Isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de. Cambridge University Press.

- Horgan, R. (1987). Instrumental method of plant hormone analysis. In: Plant hormones and their role in plant growth and development. P.J. Davies de. Dordrecht. USA.
- Horgan, R. (1989). Cytoknins. In:Advanced Plant Physiology; Malcolm B. Wilkins Ed.; Longman Scientific & Tecnical; USA.
- Hubick, K.T. and D.M. Reid, (1984). Isolation and analysis of plant growth regulators, pp. 658-683; In: Cell Culture and Somatic cell genetic of plants; Vol 1; Vasil, I. K. Ed.; Academic Press, Inc. USA.
- Hue, N.V.; H. Ikawa and J.A. Silva, (1994). *Soil Science and Plant Analysis* 25: 19-20.
- Iglesias-Jimenez E. and C.E. Alvarez, (1993). *Biology and Fertility of Soils* 16(4): 313-318.
- Iglesias-Jiménez, E. y V. Pérez-García, (1992). *Agriculture, Ecosystems and Enviroment* 38: 331-343.
- King, R.W. (1979). *Aust. J. Plant Physiol.* 6:99-108.
- Korhammer, S.A. and E. Haslinger (1994). *J. Agric. Food Chem.* 42, 2048-2050.
- Koshioka, T.; H. Nishijima; H. Yamasaki; Y. Liu; M.Monaka and L.N. Mander, (1994). *Journal of Horticultural Science* 69 (1): 171-179.
- Kuhlman, L. R., (1990). *Conservation and Recycling* 4: 151-160.
- Kuhlman, L. R., (1992). Value of composting cattle feedlot manure. In: Australian Lot Feeders Association Conference (BEEFEX '92). Coff Harbour, New South Wales, Australia.

Laboratorio de Tratamiento de Residuos Sólidos (1994). Manual de Técnicas Analíticas. UAM-I, México, D.F.

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

Larqué Saavedra A. y R. Reyes, (1988). *Ciencia y Desarrollo* 15(82):49-63.

Larqué-Saavedra, A. (1995). Apuntes del curso Reguladores del Crecimiento Vegetal, adscrito al Programa de Botánica, Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.

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

Little, T. y F. Jackson Hills, (1981). Métodos estadísticos aplicados a la agricultura, Editorial Trillas, México.

Lopez-Sánchez, J.M. (1996). Efecto sobre la calidad nutricional de un sustrato (suelo) pobre al incorporarle composta; Reporte de Servicio Social, Ing. Bioquímico; Universidad Autónoma Metropolitana; México.

Mass, M.J. y García-Oliva F., (1990). *Ciencia y Desarrollo* 15(90):21-36.

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

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

Melillo, J.M.; J.D. Arber and J.F. Muratore, (1982). *Ecology* 63: 321-326.

- Milborrow, B.V. (1989). Inhibitors. In: Advanced Plant Physiology; Malcolm B. Wilkins Ed.; Longman Scientific & Tecnical; USA.
- Mitchell, J W. and G. A. Livingston, (1973). Methods of studyng plant hormones and growth-regulators substance. Ed. Trillas. USA.
- Montgomery, Douglas C., (1991). Desing and analysis of experiments. John Wiley & Sons., Inc. USA.
- Mousdale, D.M.A.; D.N. Butcher y R.G. Powell (1978). Spectrophotofluorimetric methods of determing indole-3-acetic acid. In: Isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de. Cambridge University Press.
- Poling, Stephen M., (1991). J. Agric. Food Chem. 39, 677-680.
- Quatrano, R.S., (1974). Polyacrylamide Gel Electrophoresis of plant proteins; In: Research experiences in plant physiology a laboratory manual; Springer-Verlag, Inc. USA.
- Reeve D.R. y A. Crozier (1978). The analysis of gibberellins by high performance liquid chromatography. In: Isolation of plant growth substances. Hillman J.R. de. Cambridge University Press.
- Rizo Almenara, M.P., (1996). Establecimiento de técnicas de evaluación de RCV en un análisis no convencional; Reporte de Servicio Social, Ing. de los Alimentos; Universidad Autónoma Metropolitana; México.
- Rodríguez, F., (1994). Materia orgánica. Efecto en el suelo e influencia directa en la planta. UACH, Departamento de Suelos; México.
- Romani, J., (1991). *Ecológicas* 2(14): 20-24.

- Romo de Vivar A., (1985). *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Ed. LIMUSA, México.
- Russell, L.J. and J. MacMillan (1989). *Gibberellins*. In: *Advanced Plant Physiology*; Malcolm B. Wilkins Ed.; Longman Scientific & Technical; USA.
- Russell, S., (1977). *Extraction, purification and chemistry of gibberellins*, pp. 1-35; In: *Gibberellins and Plant growth*; Ed. Krishnamoorthy, H. N. Editorial John Wiley & Sons. USA
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W., (1992). *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
- Saunders, P.F. (1978). *The identification and quantitative analysis of abscisic acid in plant extracts*. In: *Isolation of plant growth substances*. Hillman J.R. de. Cambridge University Press.
- Sawhney, V.K. and A. Shukla, (1994). *American Journal of Botany* 81(12): 1640-1647.
- Secretaría de Desarrollo Social/Instituto Nacional de Ecología, (1991-1992). *Informe de la Situación General en Materia Ambiental de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente*.
- Smith, S.R., (1992). *Journal of Horticultural Science* 67(5): 703-706.
- Staff of Biocycle. (1991). *The Biocycle Guide to The Art & Science of Composting*. Journal of Waste Recycling. The J.G. Press Inc. Emmaus, Pennsylvania.
- Talón Manuel (1993). *Giberelinas*. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*; J. Azcon-Bieto y M. Talon Editores; Mc Graw-Hill-Interamericana, España.

- Taylor, J.S.; J.M. Robertson; K.N. Harker; M.K. Bhalla; E.J. Daly; and D.W. Pearce, (1994). *Can. J. Bot.* 73: 307-314.
- Tchbanoglous, G.; H. Theisen and S. Vigil, (1993). *Integrated solid waste management*. McGraw Hill International Editions, Singapore.
- Tien, T.M., M.H. Gaskins, and D.H. Hubbell, (1979). *Applied and Environmental Microbiology* 37(5):1016-1024.
- Trejo Vázquez, R., (1994). *Procesamiento de la basura urbana*. Editorial Trillas, México.
- Trewavas, A.J. (1979). *What`s New*. In: *Plant Physiology* 10:33-36.
- Varner, J.E. and D. Tuan-Hua Ho (1976). *Hormones*; In: *Plant Biochemistry*; J. Bonner & J. E. Varner De.; Academic Press; USA.
- Weaver Robert J., (1972). *Plant growth substances in agriculture*. W. H. Freeman and Company. San Francisco, USA.
- Zhang, W.; H. Yamame and D.J. Chapman (1993). *Botanica Marina*. 36, 257-266.