870127
13
29

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

FALLA DE ORIGEN

DETECCION Y CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD COMO CITOCININA DE PRODUCTOS DE LA FERMENTACION DEL HONGO COMESTIBLE Lentinus lepideus Y DE SU ECTOPARASITO Agrobacterium tumefasciens.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

Marcela del Carmen Humarán Castellanos

A S E S O R :

ROSA MA. MUÑOZ SAUCEDA

GUADALAJARA, JAL. 1986

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Capítulo		pág.
I	GENERALIDADES	1
1.1	Definición de Hormona Vegetal	4
1.2	Nomenclatura de las Sustancias de Crecimiento de las Plantas	5
1.3	Citocininas	7
	1.3.1 Aspectos Históricos de las Citocininas	7
	1.3.2 Efectos Biológicos y Mecanismo de Acción de las Citocininas	9
1.4	Características del Hongo y la Bacteria	13
II	MATERIALES Y METODOS	16
2.1	Métodos Microbiológicos de Cultivo	16
2.2	Purificación de Compuestos Activos	19
2.3	Métodos Biológicos	20
	2.3.1 Bioensayo	21
III	RESULTADOS	25
3.1	Tratamiento de los Datos	26
CONCLUSIONES	. . . . .	30
APENDICE	. . . . .	31
BIBLIOGRAFIA	. . . . .	34

INTRODUCCION

Las sustancias de crecimiento de las plantas desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de los vegetales. Este hecho lo enunció Went, hace muchos años, en su famosa aseveración. "Ohne Wuchstoff, kein Wachstum" ("sin sustancias de crecimiento, no hay crecimiento").

Went encontró que para desarrollarse longitudinalmente los tejidos deben recibir sustancias de crecimiento. Aunque las sustancias naturales de crecimiento (endógenas) controlan normalmente el desarrollo de las plantas, puede modificarse el crecimiento mediante la aplicación de sustancias exógenas, algunas de las cuales pueden producir resultados provechosos para el hombre.

Uno de los grandes problemas con el que el hombre se ha enfrentado, es sin duda alguna el de la alimentación. Desde sus inicios, la humanidad ha sustentado una lucha continua contra el hambre, que es, y seguirá siendo uno de sus principales enemigos. Y he aquí que el hombre ha escogido como uno de sus mejores aliados a la misma tierra, con el fin de lograr su supervivencia.

La química que día tras día hace progresos maravillosos no ha encarado, por considerarlo imposible, la ali-

mentación excluyendo las fuentes del mundo vegetal. Por esta razón decidimos que la agricultura deberá ser atendida con muchas mayor dedicación en todas las partes del mundo donde ella se practique.

Investigaciones acerca de las sustancias de crecimiento naturales, revelan gradualmente los mecanismos de control hormonal de crecimiento y desarrollo de las plantas. Tanto los estudios experimentales como los resultados de investigaciones básicas, han recomendado el uso de sustancias sintéticas de crecimiento en la agricultura, donde adquiere una importancia similar a la de los pesticidas y fungicidas.

En la actualidad los reguladores de crecimiento de las plantas se utiliza ampliamente en el control del desarrollo de las frutas, defoliación, propagación y control de tamaño.

Hay conocimiento de que culturas antiguas como la Indú practicaban una rara costumbre que consistía en colocar trozos de madera en estado de putrefacción en los cultivos, con la creencia de que así obtendrían mejores resultados.

En realidad lo que hacían era inocular la tierra con variedades de hongos y bacterias que al contacto con la humedad del suelo y en presencia de los nutrientes necesarios crecían y se multiplicaban dando a cambio un compuesto que permitía el mayor y mejor crecimiento de las

plantas, cuyo beneficio para el campesino resultaba inmejorable. Hoy en día esta costumbre sigue practicándose en la India y el Japón con resultados igualmente favorables.

En nuestros días la tecnología cuenta con las herramientas necesarias para fabricar por vías biológicas estos compuestos tan benéficos para la agricultura, y por consiguiente para la humanidad misma, como se demuestra con este trabajo.

Así, pues, la naturaleza nos brinda la oportunidad de echar mano a sus incontables secretos, con el fin de lograr un mayor aprovechamiento de nuestros recursos naturales en nuestra cada vez más necesaria lucha contra el hambre.

Capítulo 1

GENERALIDADES

1.1 DEFINICION DE HOMONA VEGETAL (FITOHORMONA)

Definir las sustancias que intervienen en el crecimiento de las plantas es requisito previo de cualquier estudio de su desarrollo histórico, y de lo más importante para quiene desean establecer alguna comunicación inteligente sobre el tema. En la actualidad, se reconocen cuatro tipos generales de hormonas de las plantas: auxinas, giberelinas, citocininas e inhibidores.

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos (diferentes de los nutrientes), que, en pequeñas cantidades, fomentan e inhiben además de modificar de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal. Los nutrientes se definen como materiales que proporcionan energía o elementos minerales esenciales a los vegetales. Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de aquéllas. Por lo común, las hormonas se desplazan del lugar de producción a un sitio de acción dentro de la planta.

El término hormona, empleado correctamente, se aplica en exclusiva a los productos naturales de las plan-

tas. El término regulador debe utilizarse en lugar de "hormona", al referirse a productos químicos agrícolas que se utilicen para controlar el desarrollo vegetativo, su inhibición, estimulación floral, tamaño del fruto, etc.

1.2 NOMENCLATURA DE LAS SUSTANCIAS DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Como se dijo anteriormente se reconocen cuatro tipos principales de hormonas de las plantas, eston son:

AUXINAS

Auxina es un término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las ccélulas de los brotes. Algunas auxinas son naturales y otras se producen sintéticamente. Se asemejan al IAA (ácido indol acético), por los efectos fisiológicos que provocan en las células vegetales, el más importante de los cuales es el prolongación. Por lo general, esos compuestos son ácidos de núcleo cíclico insaturados o derivados de esos ácidos. Los precursores de auxinas son compuestos que se pueden transformar en auxinas dentro de las plantas.

GIBERELINAS

La giberelina puede describirse como un compuesto que tiene esqueleto de gibane, y estimula la división celular. Las giberelinas pueden provocar un aumento sorprendente de la prolongación de los brotes en muchas especies, que resulta particularmente notable cuando se aplican a

ciertos mutantes enanos. Aparentemente, el hecho de que esos mutántes enanos no produzcan suficientes giberelinas para su crecimiento normal, puede corregirse aplicándoles giberelinas.

La giberelina fue extraída por primera vez de un hongo "Giterella fujikuroi", llamado en Europa Fusarium heterosporum en el que produce una enfermedad el arroz, llamada en el Japón "bakanae", que provoca una necrosis de diversos tejidos y mata a las plantas.

INHIBIDORES

Los inhibidores constituyen un grupo bastante distinto entre las sustancias de crecimiento de las plantas, que inhibe o retrasa el proceso fisiológico de los vegetales. De acuerdo con sus propiedades fisiológicas, algunas inhibidores endógenos parecen ser hormonas vegetales. Diversos inhibidores naturales pueden tener diferentes acciones; por ejemplo, pueden ser inhibidores del crecimiento de las auxinas, de las giberelinas, o bien, inhibidores de la germinación.

CITOCININAS

Se denominan citocininas a un grupo de sustancias naturales o sintéticas, cuya actividad más característica es estimular la división celular en tejidos vegetales. Muchas citocininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la denina, una base nitrogenada de purina.

La primera citocinina fue descubierta en la década de 1950, en la Universidad de Wisconsin, por el grupo del profesor Folke Skoog, a partir de una muestra de DNA envejecido. En 1962, se descubrió un grupo de polipéptidos que poseen actividad hormonal en tejidos animales y se les denominó cininas. Para evitar la posibilidad de confusión con mecanismos animales, se introdujo el término "citocinina", para aplicarlo específicamente a los vegetales.

Aunque la propiedad más característica de las citocininas es estimular la división de diversos tejidos vegetales, por lo que puede observarse "in vitro", tienen otras actividades muy diversas e importantes, que se verán más adelante.

1.3 CITOCININAS

Siendo éstas el principal tema del presente estudio se considera importante dar una visión más detallada y clara de las características químicas y biológicas de las citocininas.

1.3.1. ASPECTOS HISTORICOS DE LAS CITOCININAS

Las citocininas desempeñan un papel muy importante en los procesos de división celular. Los primeros trabajos relizados por Haberlandt (1913) revelaron la existencia de tipos de hormonas diferentes de las auxinas, que influyen en la división celular. Demostró que la división celular

en tubérculos de papa ocurría solamente en presencia de una vena que contuviera tejido de floema y que la influencia que induce la división celular iniciada en el floema, penetra una película delgada de agar.

Haberlandt (1921) demostró también que la división celular puede producirse en superficies cortadas de plantas suculentas mediante la aspersión sobre esas superficies de tejidos triturados de otras hojas. Sin embargo, encontraron que al enjuagar la superficie cortada desaparecía el estímulo.

El descubrimiento de la primera citocinina, la cinetica se logró durante experimentos derivados de investigaciones sobre cultivos de tejidos, en los laboratorios de Skoog y Strong en la Universidad de Wisconsin. Se cultivaron en un medio sintético, sugmentos de tallos de tabaco (Nicotina tabacum). Se produjo un crecimiento rápido de tejido calloso (una masa de tejido blando y no diferenciado que se forma con frecuencia en las superficies cortadas de tejidos vivos) pero muy pronto perdió velocidad y se detuvo. La adición de IAA no logró reanudar el crecimiento, sin embargo, al agregar agua de coco y extracto de levadura en combinación con IAA, se estimularon nuevamente divisiones celulares. El compuesto activo, la cinetina, se identificó posteriormente.

Aunque las citocininas se asocian especialmente a la estimulación de la división celular, se ha demostrado

también que tiene otros efectos de crecimiento.

También se ha señalado que la aplicación de una citocinina termina con el letargo en semillas de lechuga, tabaco y otras plantas. Las investigaciones de Mothes y sus coloboradores demostraron que la movilización de nutrientes se provoca mediante la aplicación de citocininas.

1.3.2 EFECTOS BIOLOGICOS Y MECANISMOS DE ACCION DE LAS CITOCININAS

EFECTOS BIOLOGICOS

Poco después del descubrimiento de las citocininas, en la década de 1950, resultó evidente la infinidad de sus efectos diversos. Dos efectos sorprendentes de las citocininas son provocar la división celular y regular la diferenciación de tejidos cortados. Las concentraciones extremadamente bajas (5×10^{-11} M) de la citocinina denominada zeatina, provocan división celular en médula de tabaco y explantaciones de floema de zanahoria; sin zeatina o alguna otra citocinina se produce sólo un crecimiento ligero de esos tejidos. Cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces, pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes. Cuando la relación es intermedia se desarrollan tejidos de callo no diferenciados. Esos resultados sugieren firmemente que las citocininas pueden resultar importantes en el control de la forma de las plantas.

Otro efecto de las citocininas es retrasar el envejecimiento de los tejidos vegetales. las citocininas son también importantes para el fenómeno de la movilización de las plantas. Cuando una parte de una hoja se trata con citocininas, los aminoácidos y otros elementos nutritivos se ven atraídos hacia la parte tratada. En ocaciones las citocininas afectan la germinación. Las semillas de cierta variedad de lechuga, cuya germinación requiere luz, pueden germinar en la oscuridad, cuando son tratadas con citocininas.

MECANISMO DE ACCION

Quizás las citocininas actúan a nivel molecular o de los genes, pero aún se desconoce su mecanismo de acción. En la actualidad se sabe que las citocininas pueden incorporarse a ácidos nucleicos en las células. El hecho de que muchas citocininas se hayan aislado a partir de preparados de RNA, indica que las citocininas están relacionadas de algún modo con los ácidos nucleicos. Pueden actuar como depresores de los genes. Hay ciertas pruebas de que en el RNA de transferencia para el aminoácido serina, la citocinina 6-(y,y-dimetilalilamino) purina es una base impar inmediatamente adyacente al anticodón (la secuencia de bases que llevan el código de igualación del RNA mensajero que especifica a su vez el lugar apropiado del aminoácido en la nueva proteína). También se han detectado citocininas en el RNA de transferencia de serina, en el hígado, las le-

vaduras y el RNA de E. coli.

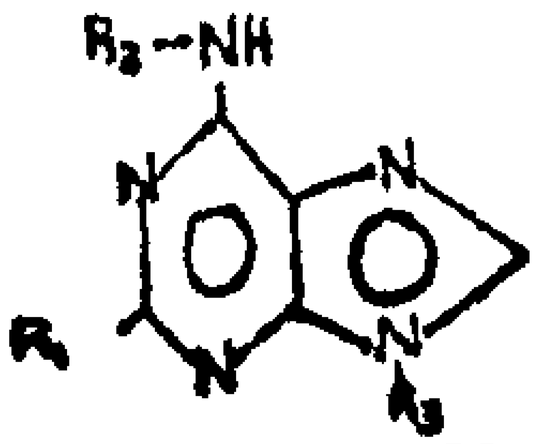
CITOCININAS SINTETICAS

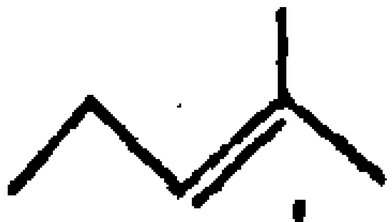
Después que Miller y colaboradores (1956), trabajando en el laboratorio del profesor Folke Skoog, aislaron la cinetina a partir de un preparado envejecido de DNA, se le identificó químicamente como 6-furfurilaminopurina. Más tarde se emprendieron investigaciones para identificar compuestos más poderosos.

Hay una gran variedad de sustitutos que pueden reemplazar al anillo de furano, dando así a los compuestos un nivel más amplio de solubilidad en las grasas. Por sí sola, la adenina da muestras de tener actividad como citocinina, aunque la cinetina es aproximadamente 30,000 veces más potente que la adenina. El aumento de la actividad quizás se deba a la mayor solubilidad del producto y a su mayor capacidad para penetrar el tejido de las plantas, así como su mayor movilidad dentro de éstas.

Se señala que hay una gran variedad de tipos químicos, incluyendo tipos de compuestos aromáticos y no aromáticos que dan muestra de actividad citocinínica.

En la siguiente tabla se muestran las diferentes estructuras de citocininas que han sido encontradas como producto de algunos microorganismos, tales como especies del género Rhizopogon, Micorrizal, etc. Cabe destacar que todas ellas son derivados de un núcleo general, que es una base purica, la adenina.



R1	R2	R3
H		ribósido
H		H
H		ribósido (Cis-zeatina)
H		ribósido (Trans-zeatina)
H		H (Trans zeatina)
H		ribósido
	CH_3CHOH	
H	CONHCH-COOH	ribósido
SCH_3	$CONHCH_2$-COOH	ribósido
H	$-CH_2$	H (Cinetina)
H	$-CH_2$	H (Bencialamino-purina)

1.4 CARACTERISTICAS DEL HONGO Y LA BACTERIA

LENTINUS LEPIDEUS

Los hongos del género Lentinus son carnosos y resistentes cuyas esporas son de color blanco-crema. Los bordes de las lamelas están minuciosamente dentadas o irregularmente recortadas.

El pileus mide no más de 30 cm. de diámetro en cuerpos frutales grandes, pero son frecuentemente más pequeños; convexos, de superficie seca que va de crema a blanco con numerosos parches grandes cafés. La carne es blanca, gruesa y resistente.

Las lamelas concurren en forma de rayas blanquiscas cuando son jóvenes, pasando a crema oscuro con tinciones rosáceas, los bordes aserrados muy marcados, moderadamente separados unos de otros. El tallo mide no más de 8 cm. de longitud, es grueso y curvo hacia abajo, blanquisco al principio y luego se torna café tirando a rojo. Un anillo membranoso superior está presente cuando es joven (véase figura 1).

Las esporas son blancas, suaves, lisas, cilíndricas, de 12-5 x 5-6 micras. Comestible cuando es joven. Este hongo se encuentra en las cortezas de las coníferas durante el verano, en las montañas. El cuerpo frutal es largo y resistente y los bordes serrados de las lamelas proveen de buenas características para identificación.

Puede causar daño considerable a la madera que se

usa en la construcción de soportes hecha por el hombre, ya que algunas veces infesta los durmientes del tren, y se le conoce como "rompetrenes",. Las esporas de especies del oeste, son más grandes que aquéllas de otras áreas.

AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS

Las bacterias del género Agrobacterium son causantes de enfermedades en plantas, algunas especies son nativas del suelo y otras se encuentran por breves periodos, como resultado de contaminación reciente con tejidos o flúidos de plantas enfermas. Los organismos que persisten por algún tiempo pueden infectar al hospedero que crece en la misma área en la siguiente estación. De las células de diferentes tipos de suelos capaces de formar colonias en placas de agar, el 20% pertenecen al género Agrobacterium.

Este género es heterotrótofo y usan pesticidas como sustrato, ya sea cometabolizando las moléculas o usándolas como nutrientes. Son bacterias microsimbiontes y participan en la adquisición simbiótica de nitrógeno por parte de la planta. Son bacilos Gramm (-), no forman esporas, son aerobios. Los representantes de éste género son típicamente móviles y utilizan algunos carbohidratos, produciendo a veces ácido, pero nunca gas.

Sus colonias son de superficie húmeda, convexas de color café.

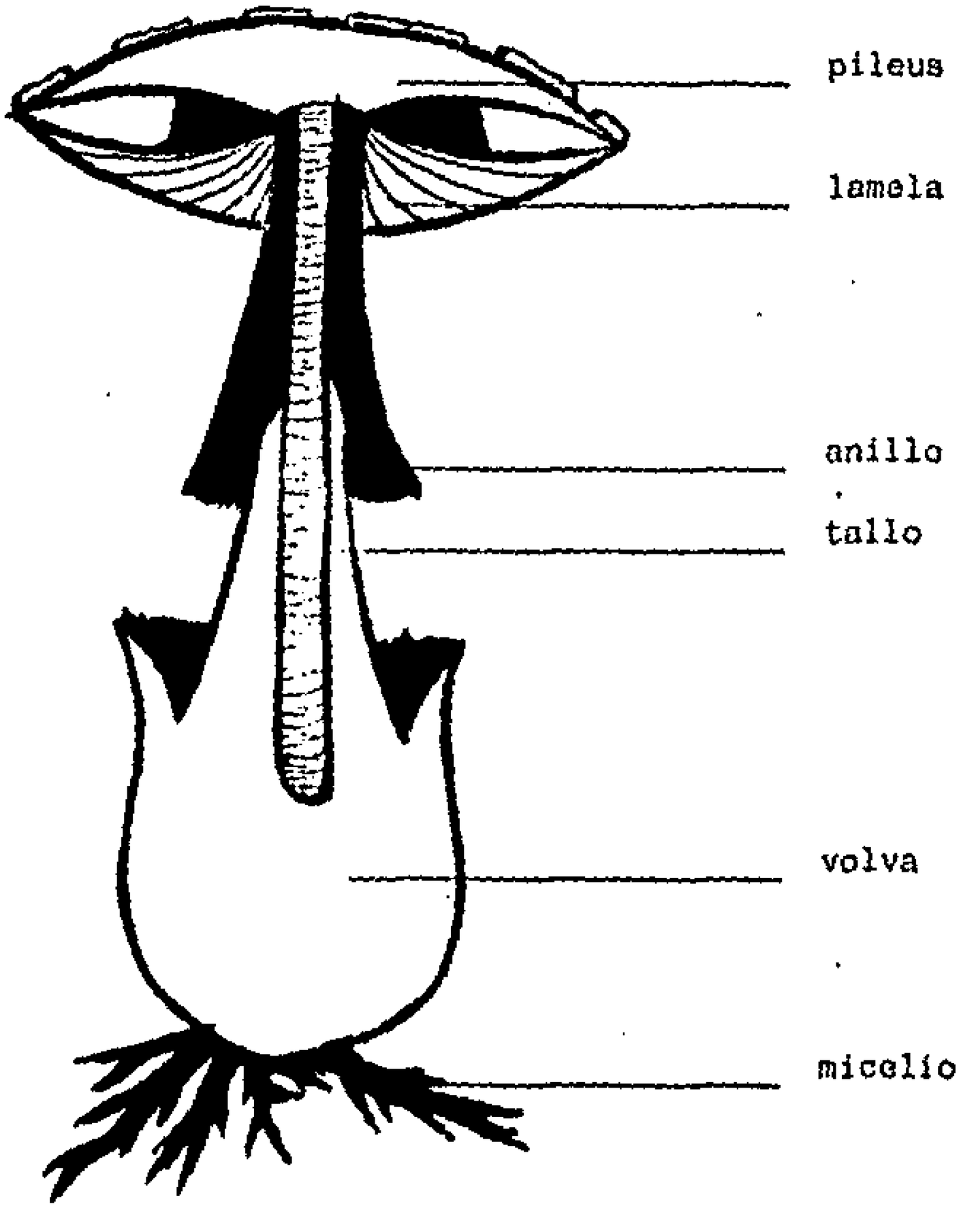


Figura 1

Capítulo 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 METODOS MICROBIOLOGICOS DE CULTIVO

Para la propagación inicial del hongo y la bacteria, fueron preparados medios sintéticos de cultivo como son PDA (papa-dextrosa-agar), en el caso del hongo y medio # 201, en el caso de la bacteria. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 lbs. de presión por 15 min., y se vaciaron a cajas de Petri dentro de una campana de lus U.V. con flujo laminar de aire positivo (para asegurar esterilidad del ambiente). Cuando los medios estuvieron listos (sólidos), se inocularon a partir de cepas congeladas (hongo) y lifilizadas (bacterias). El inóculo se llevó a cabo dentro de la campana de luz U.V.

Cuando los cultivos crecieron, el micelio del hongo fue transferido a un frasco de vidrio color ámbar de 3 lts. de capacidad, conteniendo 2 lts. de medio líquido de Hagem estéril asímismo, las colonias de la bacteria se transfirieron a un grasco con las mismas características conteniendo 2 lts. de medio # 201 líquido estéril. Todo ésto se efectuó dentro de la campana de luz U.V., para evitar contaminación.

Ambos frascos fueron tapados con tapones de hule horadados (esterilizados previamente en alcohol y cloruro de benzalconio al 5%). Un aparato de aereación fue conectado y un tubo de que permitiera la salida del aire con filtro. El aparato de aereación, además de este fin sirve para proveer al medio de una agitación constante. La incubación se llevó a cabo en un periodo de dos semanas a una temperatura de 30°C, controlada con baña maría de temperatura constante.

NOTA: Las mangueras y tubos de vidrio que estuvieron en contacto con los medios fueron previamente esterilizados con una solución que contenía alcohol al 80% y cloruro de benzalconio al 5%.

La campana de luz U.V. se encendió una hora antes de cada inóculo o cada vez que se utilizó, con todos los implementos dentro de ésta, asegurando así que tanto el material a usar como el medio ambiente está completamente estéril. La solución alcohol-cloruro de benzalconio fue utilizada para limpiar la campana.

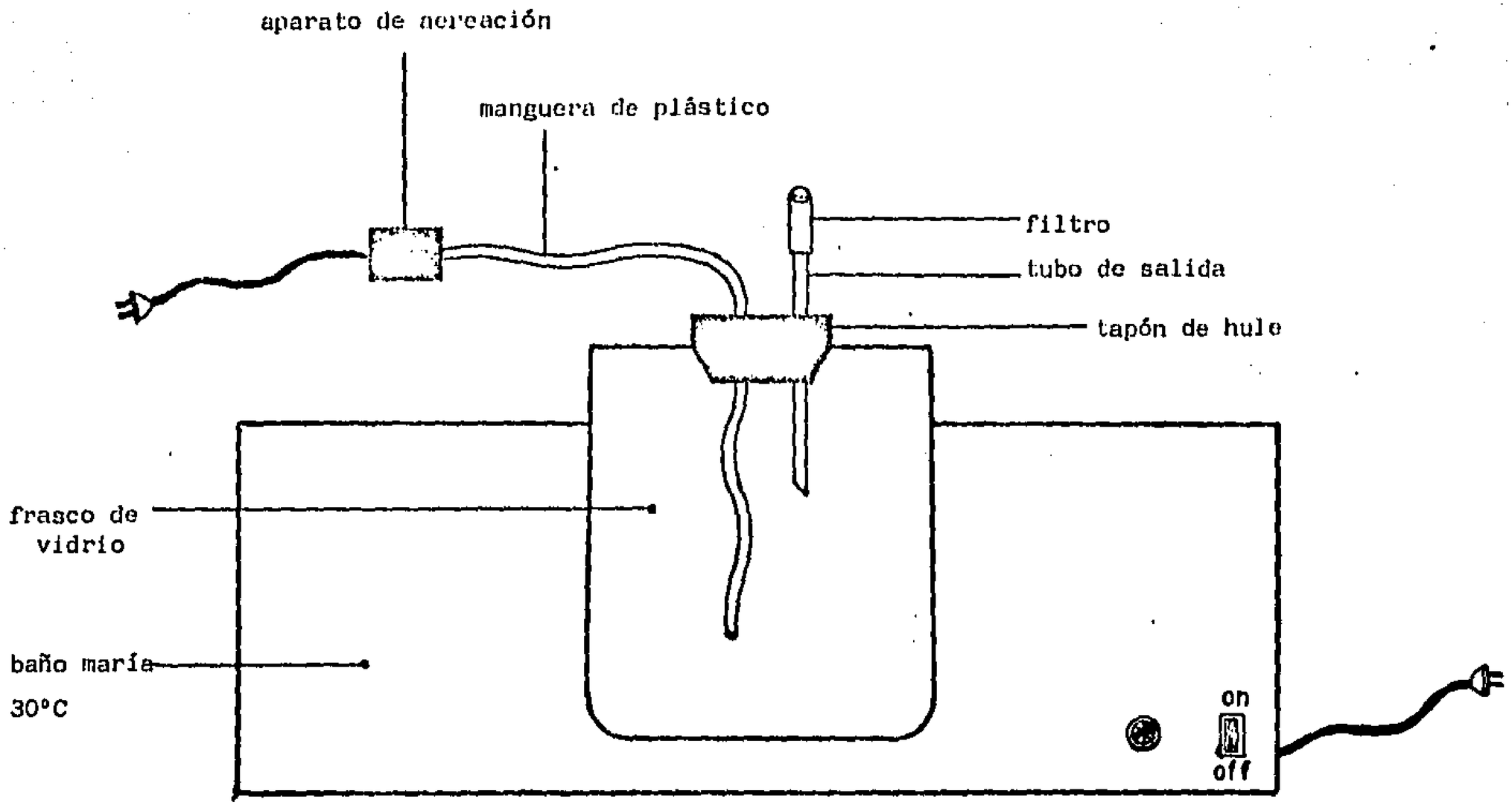

aparato de aereación
manguera de plástico
filtro
tubo de salida
tapón de hule
frasco de vidrio
baño maría
30°C
on
off

Figura 2

2.2 PURIFICACION DE COMPUESTOS ACTIVOS

Después del periodo de incubación el cultivo fue filtrado con gasas, y el pH ajustado a 2.5 (con HCl), después fue pasado por una columna que contenía 120 ml de resina intercambiadora de cationes (Dowex-50 W8 H^+, 50 meq.), ésta fue lavada con 200 ml de agua destilada. Los materiales más activos quedan pegados a la resina y son eluídos con 320 ml de NH_4OH 6N. El hidróxido de amonio se remueve por evaporación al vacío.

Después de eliminado el hidróxido de amonio, la solución se dividió en dos fracciones iguales, una de las cuales se analizó directamonte y la otra se sometió a un tratamiento posterior, que consistió en una extracción con acetato de etilo ácido. El acetato se evaporó y el residuo se resuspendió en agua ácida para su análisis.

A: Parte del medio de cultivo (tanto para el hongo como para la bacteria) pasado por la columna.

B: Parte de la fracción eluída con hidróxido de amonio que se analizó después de haber sido evaporado éste.

C: Parte de la fracción eluída con hidróxido de amonio que se extrajo con acetato de etilo, después de evaporar el NH_4OH (esta fracción se analizó resuspendiendo el residuo en agua ácida después de evaporar el acetato de etilo).

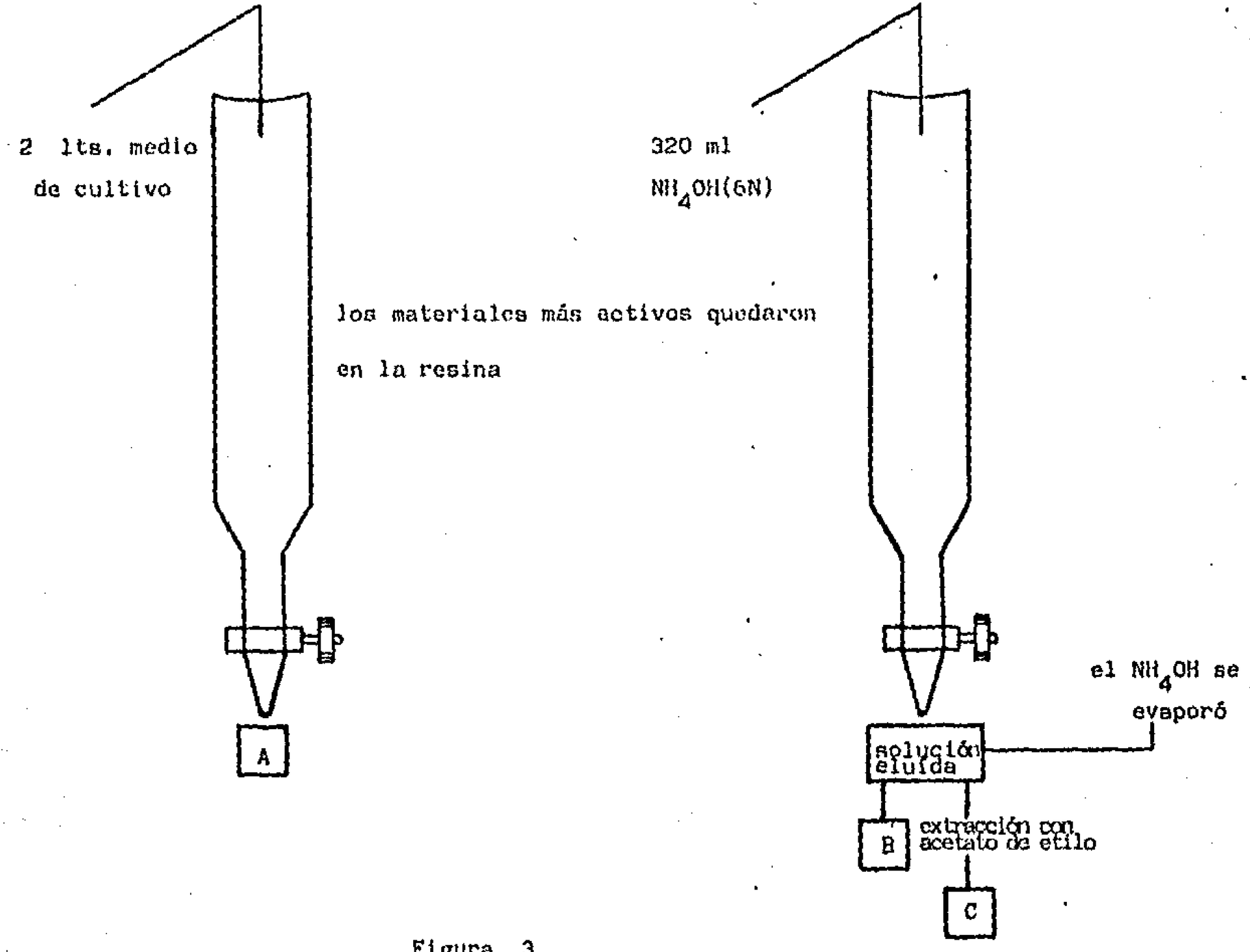

2 lts. medio
de cultivo
A
los materiales más activos quedaron
en la resina
320 ml
NH_4OH(6N)
el NH_4OH se
evaporó
solución
eluída
B
extracción con
acetato de etilo
C

Figura 3

2,3 METODOS BIOLOGICOS

Estudios previos han establecido que las citocininas aceleran la diferenciación de cloroplastos, así como estimulan y regulan la producción de clorofila en cotiledones etiolados de pepino. El incremento de producción de clorofila fue encontrado ser proporcional a la concentración de citocinina, lo que provee de un rápido y sensible bioensayo para citocininas.

La sensibilidad y especificidad de varios ensayos sobre citocininas, incluyendo aquél basado en la senescencia y formación de callo, han sido revisadas por Lethmna. en un estudio comparativo, Dumbroff y Browm encontraron que el ensayo de crecimiento de cotiledón de pepino fue conveniente y sensible y da una respuesta más lineal que la prueba de callo de frijol de soya. Desde entonces el ensayo de cotiledón de pepino ha sido usado para el estudio de efectos de herbicidas.

Por ejemplo se encontró que el ensayo de enverdecimiento de pepino provee de un método preciso, para la cuantificación de citocininas. La cantidad de clorofila producida por cotiledones estiolados de pepino después de exposición a la luz, depende de la edad de los cotiledones, así como del periodo de incubación en la oscuridad.

2.3.1 BIOENSAYO

Semillas de pepino (Cucumus sativus. National

pickling) fueron germinadas en arena a una temperatura de 28°C y en la oscuridad. Los cotiledones de 5 días fueron expuestos a la luz verde tenue mientras se les retiraba el gancho del hipocotilo (los cinco días se empiezan a contar desde que los cotiledones nacen). Después de pesados los cotiledones fueron puestos en cajas de Petri conteniendo cada una 3 ml. de las soluciones prueba que consistieron en:

a) 2 ml de agua destilada + 1 ml de KCL 40 mM
b) 2 ml de cinetina 10^{0} (mg/lt) + 1 ml KCL 40 mM
c) " " 10^{-1} " " "
d) " " 10^{-2} " " "
e) " " 10^{-3} " " "
f) " " 10^{-4} " " "
g) " " 10^{-5} " " "
h) 2 ml de solución A(hongo) " "
i) " " " A(bacteria) " "
j) " " " B(hongo) " "
k) " " " B(bacteria) " "
l) " " " C(hongo) " "
m) 2 " " C(bacteria) " "

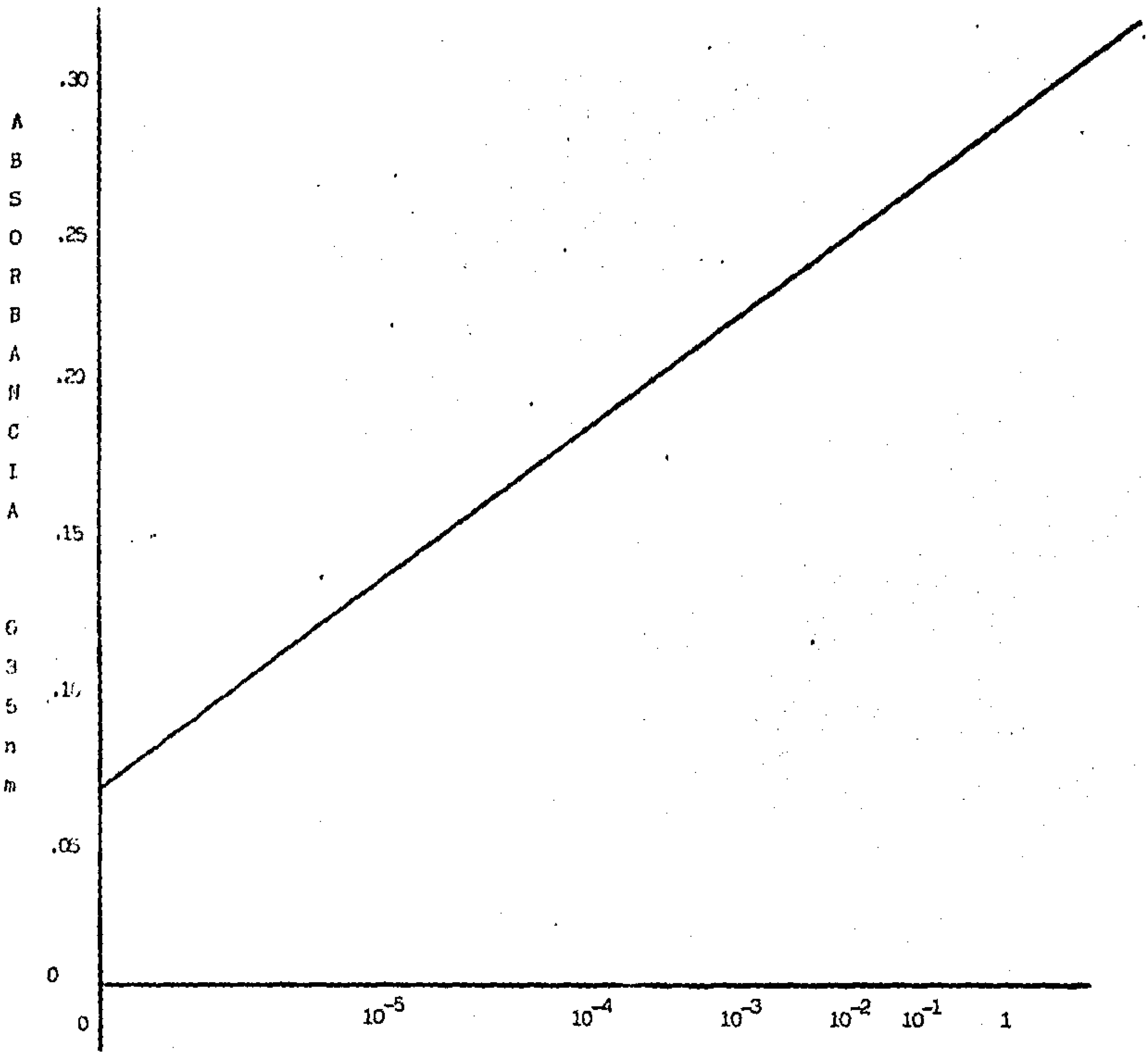
Las cajas de petri fueron regresadas a la oscuridad durante 24 hrs. Después fueron expuestas a la luz fluorescente por 3.5 hrs. Los cotiledones fueron entonces homogeneizados y la clorofila se extrajo con 8 ml de acetona

acuosa 80%, utilizando para ello un mortero de porcelana, el volumen se aforó a 10 ml en un matraz aforado de 10 ml con acetona acuosa. El sobrenadante se decantó y fue leída la absorbancia en un espectofotómetro de U.V. a 635 nm.

Con las lecturas de absorbancia encontradas, se elaboró una curva de calibración, (con los estándares de cinetina). Las lecturas de absorbancia que dieron las muestras o soluciones problema se interpolaron para obtener así la concentración de cinetina correspondiente y relacionarla con la actividad citocinínica que éstas muestran.

CURVA DE CALIBRACION PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CINETINA

Y = 0,01266 X + 0.3015 Correlación = 0.9963



Capítulo 3

RESULTADOS

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en la parte experimental. Estos resultados fueron repetitivos y por lo tanto se consideran confiables de acuerdo al método utilizado. Los datos dados a continuación son en realidad la media de los obtenidos en las ocho ocaciones que se repitió el experimento.

MUESTRA	PESO COTILEDONES	ABSORBANCIA
cinetina 10^{-5} mg/lt	0.0697 g	0.152
" 10^{-4}	0.0791	0.190
" 10^{-3}	0.0766	0.210
" 10^{-2}	0.0756	0.250
" 10^{-1}	0.0700	0.270
" 10^{0}	0.0723	0.300
solución A(hongo)	0.0615	0.190
" A(bacteria)	0.0645	0.200
" B(hongo)	0.0783	0.253
" B(bacteria)	0.0797	0.190
" C(hongo)	0.0654	0.090
" C(bacteria)	0.0727	0.080
Blanco	0.094	0.060

El blanco (agua destilada) representa una concentración de cinetina de cero, la lectura de absorbancia que dio corresponde a una concentración menor de 10^{-5} de cinetina y representa la cantidad de clorofila que retuvo la planta por sí misma, es decir sin el efecto de la cinetina.

Asímismo, las fracciones C tanto del hongo como de la bacteria que son las que se sometieron a extracción con acetato de etilo ácido, dan lecturas de absorbancia que corresponden a concentraciones de cinetina despreciables, casi cero. Esto como resultado de la poca afinidad que mostró el producto por el acetato de etilo, reteniéndose en la fase acuosa.

3.1 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Con los datos de concentración y absorbancia de los estándares de cinetina, se obtuvo una recta (de tipo logarítmica). Las absorbancias que mostraron las soluciones problema se interpolaron de dicha recta para obtener las concentraciones de cinetina que corresponden a cada una.

MUESTRA	ABSORBANCIA (635 nm)	CONCENTRACION (mg/lt)
A (hongo)	0.190	1.5×10^{-4}
A (bacteria)	0.200	3.3×10^{-4}
B (hongo)	0.253	2.2×10^{-2}
B (bacteria)	0.190	1.5×10^{-4}

C (hongo)	0.90	5.5×10^{-8} (*)
C (bacteria)	0.080	2.5×10^{-8} (*)
BLANCO	0.60	5.1×10^{-9} (*)

(*) Estas cantidades se consideran despreciables

En las fracciones B (tanto para hongo como para bacteria) las concentraciones de cinetina correspondientes no son en realidad las de el medio de cultivo inicial (2 lts.), ya que al momento de quedar en la resina y ser eluída con 320 ml de hidróxido de amonio, fueron concentradas 6.25 veces, entonces la concentración verdadera del medio inicial sería:

Para la fracción B del hongo

$$\frac{2.2 \times 10^{-2}}{6.25} = 3.5 \times 10^{-3} \text{ mg/lt de cinetina}$$

Para la fracción B de la bacteria

$$\frac{1.5 \times 10^{-4}}{6.25} = 2.4 \times 10^{-5} \text{ mg/lt de cinetina}$$

ahora en las fracciones A (para ambos) las concentraciones correspondientes sí son las del medio inicial, ya que los 2 lts que se pasaron por la columna se recogieron en las

fracciones A sin sufrir alteración en cuanto a su concentración.

Para conocer entonces las concentraciones de citocinina que en realidad se obtuvieron en el medio de cultivo por efecto de la fermentación de los microorganismos, deben tomarse en cuenta también estas cantidades que no quedaron separadas por la resina tal vez por la poca afinidad que tuvo el compuesto por la resina o a la poca disponibilidad de estas moléculas para llevar a cabo un intercambio catiónico.

Así pues en el caso del medio de cultivo del hongo Lentinus lepideus, la concentración real de citocinina sería la suma de las fracciones A y B.

$$3.5 \times 10^{-3} + 1.5 \times 10^{-4} = 3.65 \times 10^{-3} \text{ mg/lt de cinetina}$$

y en el medio de cultivo para la bacteria Agrobacterium tumefasciens, igualmente la concentración real sería la suma de las fracciones A y B correspondientes.

$$2.4 \times 10^{-5} + 3.3 \times 10^{-4} = 3.54 \times 10^{-4} \text{ mg/lt de cinetina}$$

estos datos significan que:

En el medio de cultivo para Lentinus lepideus se detectó un compuesto X (no fue identificado) que tiene una actividad biológica similar a la que

muestra una concentración de cinetina de 3.65 x 10^{-3} mg/lt.

E igualmente para el caso de la bacteria Agrobacterium rumefasciens, se encontró en el medio de cultivo donde se llevó a cabo la fermentación de ésta, un compuesto (tampoco fue identificado) que muestra una actividad biológica similar a la de una concentración de cinetina de 3.54 x 10^{-4} mg/lt.

CONCLUSIONES

Después de los resultados obtenidos, podemos concluir que tanto el hongo Lentinus lepideus, como la bacteria Agrobacterium tumefasciens efectivamente secretan como metabolito un compuesto que tiene una alta actividad como citocinina (específicamente como cinetina). Aunque la estructura química no fue determinada, se piensa que se trata de un ribósido de citocinina, ya que mostró mayor afinidad por el agua que por el acetato de etilo, durante el experimento de extracción; con lo que queda de manifiesto su polaridad.

Muchos hongos que se creen viven en simbiosis con las plantas, en realidad mejorar la actividad fisiológica de éstas modificando la concentración de algún tipo de fitohormona, ya que son ellas las que rigen el crecimiento de las plantas a la vez que permiten un mayor aprovechamiento de los nutrientes que redunda en un mejor desarrollo de los cultivos.

APENDICE

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Los materiales y reactivos que se utilizaron en todos los experimentos, están descritos a continuación.

Campana de luz ultravioleta con flujo de aire laminar, marca LABBONCO.

Espectofotómetro U.V. Coleman Junior II. Modelo 6/35.

Baño Maria Thelco. Modelo 83 GCA/Presición científica.

Balanza analítica. Sartorius. Capacidad máx. 100 g.

Autoclave CENCO-MENZEL. National Board. Capacidad 350 psi.

Agitador magnético.

Bonba de vacío.

Matraces Erlenmeyer 2000, 1000, 500 ml. Pyrex.

Cajas de Petri 10 cm diámetro.

Aparato de aereación.

Columna de vidrio 40 x 2.5 cm con llave de vidrio.

Frascos de vidrio color ámbar. 3 lts.

Material para análisis volumétrico de vidrio.

REACTIVOS

Agua destilada.

Resina intercambiadora de cationes. Dowex -50 W8 H^+, 50 meq.

Hidróxido de amonio.

Acetato de etilo.

Ácido clorhídrico.

Acetona

Cloruro de benzalconio.

Etanol

Cinetina

Cloruro de potasio (KCl)

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

PAPA-DEXTROSA AGAR

Papa	200 gr
Dextrosa	20 gr
Agar	20 gr
Agua destilada	1 lt
pH	5.6

MEDIO #201

Papa	200 g
Levadura deshidratada (Fleisman's)	10 g
Hígado (infusión)	25 g
peptona de carne	5 g
Medio de tioglicolato deshidratado	10 g
glucosa	5 g
glicerina	15 g
Agar	15 g

Agua destilada	1 L
pH	7

MEDIO LIQUIDO DE HAGEM

Sacarosa	10,000 mg/1t
KH_2PO_4	5,000 "
NH_4Cl	500 "
$MgSO_4$	500 "
citrato férrico amoniacal	5 "

NOTA: Tanto la papa como el hígado son cortados en cubos y hervidos por medio hora y pasados después por gasas para obtener así las infusiones que se usan en los medios de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Robert J. Weaver. 1972. Plant Growth Substances in Agriculture. W.H. San Francisco U.S.A., Freeman and Company.

- List of Cultures. 1978. Institute for Fermentation of Osaka. 6th edition.

- Robert T. Orr and Dorothy B. Orr. 1975. Mushrooms of Wester North America. London, England. University of California Press.

- R. A. FLETCHER, V. KALLIDUMBIL, AND P. STEELE. An improved bioassay for citokinins using cucumber cotiledons. Plant Physiol, 69, 675-677. 1982.

- CAROL B. CRAFTS AND CARLOS O. MILLER. Detection and identification of cytokinins produced by Mycorrhizl fungi. Plant Physilo, 54, 586-588. 1974.

- MILLER, C.O. Cytokinins in Zea maya. Ann N.Y. Acad. Sci. 144, 251-257. 1967.

- MILLER, C.O. Zeatin and Zeatin riboside from a Mycorrhizal fungus. Science 157, 1055-1057. 1967.

- Pharmazie, 30, H.6 University of Martin Luther King. Biochemistry Departmunt. Berlin, Germany. 1975.

INSTANTESIS

TESIS • INFORMES • MEMORIAS
COPIAS • REDUCCIONES • EN-
CUADERNADO • IMPRESIONES •
COPI-OFFSET • TRANSCRIPCIO-
NES IBM EN LINO • DIBUJO DE
GRAFICAS, PLANOS Y ORGANI-
GRAMAS • HELIOGRAFICAS •
REVELADO KODAK.

ENRIQUE G. MARTINEZ No. 30
(ANTES PARROQUIA)
TEL. 13 - 99 - 23 GUADALAJARA