



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

"AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES PRESENTES EN

EXUDADOS DE RAÍZ DE *Prosopis laevigata*, BAJO CONDICIONES DE

DEFICIENCIA EN EL SUMINISTRO DE NITRÓGENO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUDITH SALAS OROPEZA

Director:

Dr. César Mateo Flores Ortiz



TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Macroproyecto “Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano” por la beca otorgada para la realización de mis estudios de licenciatura.

A la DGAPA por los recursos otorgados mediante el Programa PAPIIT, con número de proyecto IN209307.

A mi Director de Tesis, Dr. César Mateo Flores Ortiz, quien me guió y aconsejó en el desarrollo de este trabajo, brindándome libertad, confianza, paciencia y por todas las enseñanzas, pero sobre todo por haber creído en este proyecto.

A todos mis sinodales, por haberse tomado el tiempo de revisar este trabajo y por todas sus sugerencias. Al Dr. Ignacio Peñaloza Castro por sus observaciones y por su tiempo; al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por sus comentarios y opiniones; a la Dra. Margarita Canales Martínez por su amabilidad y por la minuciosidad con que revisó este trabajo; y al Biol. Luis Barbo Hernández Portilla, por todo su apoyo, disponibilidad y paciencia.

Quiero agradecer de manera especial a:

Mis padres, por todo su cariño, cuidados, paciencia y apoyo incondicional. Por hacer de mí la persona que soy, por ser mi ejemplo a seguir y por que sin importar cuantas veces he caído, siempre han estado allí para ayudarme a levantar. Los amo.

A mis hermanos, porque con sus logros me inspiran a tratar de ser mejor, los amo y admiro muchísimo.

A Rodolfo, gracias por todo tu apoyo, por ser la persona tan maravillosa que eres y por ayudarme a ser mejor. Te amo.

A la Maestra José, por toda su ayuda, consejo, enseñanza y por darme ánimos. Pero sobre todo por toda la confianza y amistad que me ha brindado. La quiero mucho maestra.

A Luis, porque tuve la suerte de tenerlo como profesor de metodología científica el primer semestre y porque desde entonces no ha dejado de enseñarme.

Al Maestro Rafa, por toda su amabilidad y ayuda brindadas; y por hacer el trabajo más ameno con sus bromas y buen ánimo.

Al Dr. Elías, por el apoyo y por ayudarme tanto, por su buen humor que hace que los problemas no parezcan tan grandes.

A la Maestra Margarita y a la Maestra Martha, por ser siempre tan amables y por todas sus atenciones.

Al los profesores Alberto Arriaga y Gumercindo de la Cruz por sus consejos y apoyo.

Al Biol. Federico Rivera, por ayudarme a descubrir mi vocación junto con las maestras Ma. Eugenia Eres e Irma Dueñas. Gracias a los tres por abrirme la puerta del maravilloso y apasionante mundo de la Biología.

Finalmente pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos: Emilio, Diana, Angélica y Lucero con quienes hice este viaje y sin los cuales no habría podido superar muchos retos. Gracias por la paciencia en mis ratos de locura, por los buenos momentos y por todas esas aventuras que hemos vivido juntos. Los quiero.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
1.0. RESUMEN.....	7
2.0. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1. <i>Prosopis laevigata</i>	8
2.2. Flavonoides.....	10
2.3. Exudados de raíz.....	12
2.4. Los genes <i>nod</i> y los flavonoides.....	13
3.0. ANTECEDENTES.....	17
4.0. JUSTIFICACIÓN.....	21
5.0. HIPTÓESIS.....	21
6.0. OBJETIVOS.....	22
7.0. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1. Área de estudio.....	23
7.2. Recolección de material en campo.....	23
7.3. Condiciones de cultivo.....	24
7.4. Registro de datos de crecimiento.....	24
7.5. Parámetros fotosintéticos.....	24
7.6. Obtención de exudados fenólicos.....	25
7.7. Preparación de extractos de tejido vegetal.....	25
7.8. Identificación de flavonoides.....	25
7.9. Análisis estadístico.....	26
7.10. Esquema de la metodología.....	27
8.0. RESULTADOS.....	28
8.1. Crecimiento de raíz y tallo de <i>Prosopis laevigata</i>	28
8.2. Peso de tallo y raíz.....	30
8.3. Peso de hojas y área foliar.....	30
8.4. Parámetros fotosintéticos.....	32

8.5.	Obtención de compuestos fenólicos.....	34
8.6.	Flavonoides con posible función inductora de genes <i>nod</i> en extractos de raíz.....	39
8.7.	Flavonoides con posible función inductora de genes <i>nod</i> en extractos de tallo.....	41
8.8.	Flavonoides con posible función inductora de genes <i>nod</i> en extractos de hojas.....	43
9.0.	DISCUSIÓN.....	45
9.1.	Evaluación del crecimiento de las plántulas.....	45
9.2.	Evaluación de los parámetros fotosintéticos.....	45
9.3.	Compuestos fenólicos.....	46
10.0.	CONCLUSIONES.....	49
11.0.	PERSPECTIVAS.....	50
12.0.	BIBLIOGRAFÍA.....	51
ANEXOS :		
I.	Esquema y diseño de rizotrones.....	58
2.	Resultado de la curva de Fotosíntesis a diferentes valores de PAR.....	59
3.	Resultados del estudio preliminar.....	61
4.	Muestreo de exudados de raíz en papel filtro Watman.....	62
5.	Muestreo de percolados.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
FIGURA 1 Individuo adulto de <i>Prosopis laevigata</i>	8
FIGURA 2 Estructuras químicas de las principales subclases en que se clasifican los flavonoides.....	10
FIGURA 3 Estructura química de los azúcares sustituyentes, más comunes para flavonoides.....	11
FIGURA 4 Esquema de comunicación química entre plantas leguminosas y bacterias fijadoras de N ₂	14
FIGURA 5 Mapa de ubicación geográfica de Zapotitlán de las Salinas, Puebla.....	23
FIGURA 6 Esquema de la metodología.....	27
FIGURA 7 Índice de crecimiento de raíz por tratamiento y tiempo.....	29
FIGURA 8 Valores de peso y área foliar a las 22 semanas de tratamiento.....	31
FIGURA 9 Parametros fotosintéticos a las 7 y 22 semanas.....	33
FIGURA 10 Espectros UV λ_{max} (nm) de los flavonoides aislados.....	38
FIGURA 11 Flavonoides de raíz con posible función inductora de genes <i>nod</i>	40
FIGURA 12 Flavonoides de tallo con posible función inductora de genes <i>nod</i>	42
FIGURA 13 Flavonoides de hoja con posible función inductora de genes <i>nod</i>	44
FIGURA 14 Medidas y especificaciones de Rizotrón.....	58
FIGURA 15 Curva de Fotosíntesis a diferentes valores de PAR.....	60
FIGURA 16 Resultados del estudio preliminar.....	61
FIGURA 17 Pasos del muestreo de exudados usando papel filtro Watman.....	62
FIGURA 18 Recolecta de percolados en rizotrones.....	63

1.0. RESUMEN

Bajo condiciones limitantes de nitrógeno en el suelo, los rizobios son capaces de establecer nódulos con leguminosas en los que se fija biológicamente N_2 . En etapas tempranas de la simbiosis los rizobios son quimioatraídos por flavonoides liberados por la raíz de la planta, y una serie de genes de nodulación son rápidamente inducidos por estas señales a través de mecanismos que implican la transcripción de factores Nod. *Prosopis laevigata* es una leguminosa importante debido a sus usos y como componente arbóreo en zonas áridas y semiáridas. Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar polifenoles exudados por raíces de *P. laevigata*, a fin de identificar los compuestos de importancia durante el proceso de simbiosis. Para ello, se cultivaron plántulas de *P. laevigata*, con diferentes niveles de nitrógeno, un óptimo y dos deficientes (200, 100 y 50 mg/L respectivamente), se tomaron datos semanales de crecimiento de raíz, altura del tallo, longitud de una hoja y se midió la tasa fotosintética. A las siete semanas de edad, se tomaron muestras de los exudados mediante el contacto de las raíces con papel filtro Whatman No 541. Una semana después se tomaron muestras de los percolados de cada unidad experimental; y a las 22 semanas las plántulas fueron explantadas, medidas, pesadas y se emplearon para obtener extractos de tejido. Todas las muestras fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Para identificar los compuestos se reconocieron los máximos de absorbencia de cada compuesto en el espectro UV con un rango de barrido de 220 a 400 nm. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en el crecimiento de raíz-tallo, área foliar o parámetros fotosintéticos; no se encontraron concentraciones detectables de polifenoles en las muestras de papel filtro ni de percolados, pero se identificaron 13 flavonoides endógenos de los extractos de tejidos: 2 derivados de apigenina, 3 de genisteina y 6 de quercetina, encontrando diferencias significativas en los contenidos de genisteina y quercetina, donde los valores más elevados fueron registrados en las muestras con menor suministro de N. Se concluye que no se alcanzó un estatus de estrés por deficiencia de N significativo por lo cual no fue posible establecer una clara asociación entre la deficiencia de N y la exudación de flavonoides quimioatrayentes que inducen de genes *nod*.

2.0. INTRODUCCIÓN

2.1. *Prosopis laevigata*

Prosopis laevigata (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnston, es una leguminosa de la familia Fabaceae; la cual es llamada comúnmente mezquite (Figura 1). Se trata de una especie endémica de México (Roldán, 2004), que se presenta como arbusto (2 a 3 m de altura) o como árbol (6 a 12 m de altura) (Orozco, 1996) en las zonas áridas y semiáridas del país. El diámetro del tronco va de 30 a 60 cm en promedio, pero puede alcanzar el metro de diámetro; presenta una corteza gruesa y fisurada de color café; posee una copa más ancha que alta con ramas glabras y espinosas (espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo), sus hojas se pierden durante la temporada de secas (Calderón y Rzendowsky, 2001) y son pecioladas con 1 a 3 pares de pinas, cada una con 10 a 20 pares de folíolos sésiles. Presenta un solo periodo de reproducción por año con flores amarillas dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo, hermafroditas, actinomorfas y productoras de néctar, el periodo de floración es entre los meses de marzo y mayo (Siqueiros, 1996 en Roldán 2004); los frutos son vainas delgadas de unos 10 a 15 cm de largo con aproximadamente 5 a 10 semillas cada una; el tiempo de desarrollo de las flores hasta la absorción de los frutos maduros es de aproximadamente 110 días. La fructificación comienza en mayo y continúa hasta agosto (Roldán 2004; Olvera 2006).



Figura 1. Individuo adulto de *Prosopis laevigata*.

El género *Prosopis* en América comprende alrededor de cuarenta especies distribuidas en las zonas áridas y semiáridas. En América del Norte (incluido México) se encuentran nueve especies que son nativas, mientras que en América Central y Sudamérica se encuentran treinta y un especies que son endémicas. Las especies que se encuentran distribuidas dentro del territorio mexicano son: *P. juliflora* (Sw) DC., *P. pubescens* Bentham, *P. palmeri* S. Wats., *P. articulata* S. Watson, *P. tamaulipana* Burkart, *P. glandulosa* Yorr., *P. velutina* S.

Wats, *P. reptans* var. *Cinerascens* (A. Gray) Burkart; y *P. laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnston, (Rzedowsky, 1988). Este último se distribuye en México en los estados de: Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, Zacatecas, Puebla y Oaxaca (Olvera, 2006).

Prosopis laevigata ha sido estudiada por su importancia como componente arbóreo de la vegetación en zonas áridas y semiáridas (Villanueva, 1993) y es considerada indicador de estas mismas condiciones. Las citadas plantas son abundantes en estas regiones y frecuentemente, constituyen el único estrato arbóreo de la vegetación, resaltando su capacidad por colonizar los suelos alcalinos típicos de estas zonas (Morales, 1971). Por estas razones son de gran importancia ecológica, ya que fungen como nodriza de algunas especies tales como *Neobuxbaumia tetetzo* (F.A.C. Weber) Backeb favoreciéndolas con un microclima, el cual proporciona sombra a la plántula en la época calurosa, mayor retención de suelo y agua, mejores condiciones de pH, protección contra heladas, mayor contenido de materia orgánica, protección de depredadores; así como, probable transferencia de nutrimentos entre las raíces de ambas plantas mediada por hongos micorrízicos (Reyes-Quintanar *et. al.*, 2000). Todas las condiciones mencionadas favorecen, además, la formación de islas de fertilidad alrededor de plantas individuales de *P. laevigata*, debido a su capacidad de asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno, además de crear condiciones propicias para el establecimiento y la actividad de microflora benéfica para ambos componentes. Ruíz y colaboradores (2008) encontraron que en las terrazas aluviales de Zapotitlán de las Salinas, México, el mezquite presenta la mayor contribución para el enriquecimiento nutrimental del suelo debido al nitrógeno fijado en su zona de raíces.

Además de su importancia biológica, *P. laevigata* ha sido de gran interés para el hombre, debido a la gran cantidad de usos que se le dan, de los cuales se puede mencionar los siguientes: la madera de estos árboles es muy preciada porque con ella se elabora carbón, o se utiliza como leña que es considerada de muy buena calidad (Arias, 2000)., además es muy utilizada como elemento de construcción (Casas *et al.*, 2001); los frutos se utilizan para la elaboración de harina, pinole, pan, atole y como forraje (hojas y ramas) para el ganado; la corteza se usa para aliviar las molestias por picadura de abeja, el dolor de muelas y para tratar infecciones en los ojos; las raíces (jóvenes) son diuréticas y se usan para tratar bronquitis; reumatismo y fiebre. Al pie de los tallos es común que se siembren *Hylocereus undatus* (Haw) Britton & Rose (pitahaya), a la que le sirven de sostén y de sombra. En la temporada en que crece el cocopache, los habitantes de la región visitan a los mezquites en busca de estos insectos, ya que es un platillo muypreciado para ellos (Arias, 2000). Adicionalmente, el mezquite produce una resina que se usa para matar piojos y para el

cuidado del cabello; además, esta resina es muy parecida a la goma arábiga, de ahí su uso potencial en la industria alimenticia como un sustituto más barato (Orozco, 1996).

2.2. Flavonoides

Actualmente se conocen más de 8000 polifenoles vegetales, entre los cuales podemos encontrar a las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos y los flavonoides; estos últimos forman el grupo más numeroso (más de 4000 agrupados en 12 subclases; Strac y Wray, en: Harborne, 1994), poseen una gran diversidad estructural y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Químicamente, los flavonoides se derivan del compuesto básico, flavona; estos compuestos se clasifican de acuerdo con el grado de oxidación del anillo central de pirano, en antocianinas y otras clases (Figura 2). Dentro de cada clase, estos compuestos varían en el número y la posición de los grupos hidroxilo y metilo, y de otros sustituyentes (Azcon-Bieto y Talon, 2000). Las subclases esenciales de los flavonoides son: a) flavonas, b) flavonoles, c) isoflavonas, d) flavanonas, e) chalconas, f) antocianidinas, g) catequinas y h) flavanoles (Rijke *et al.*, 2006)

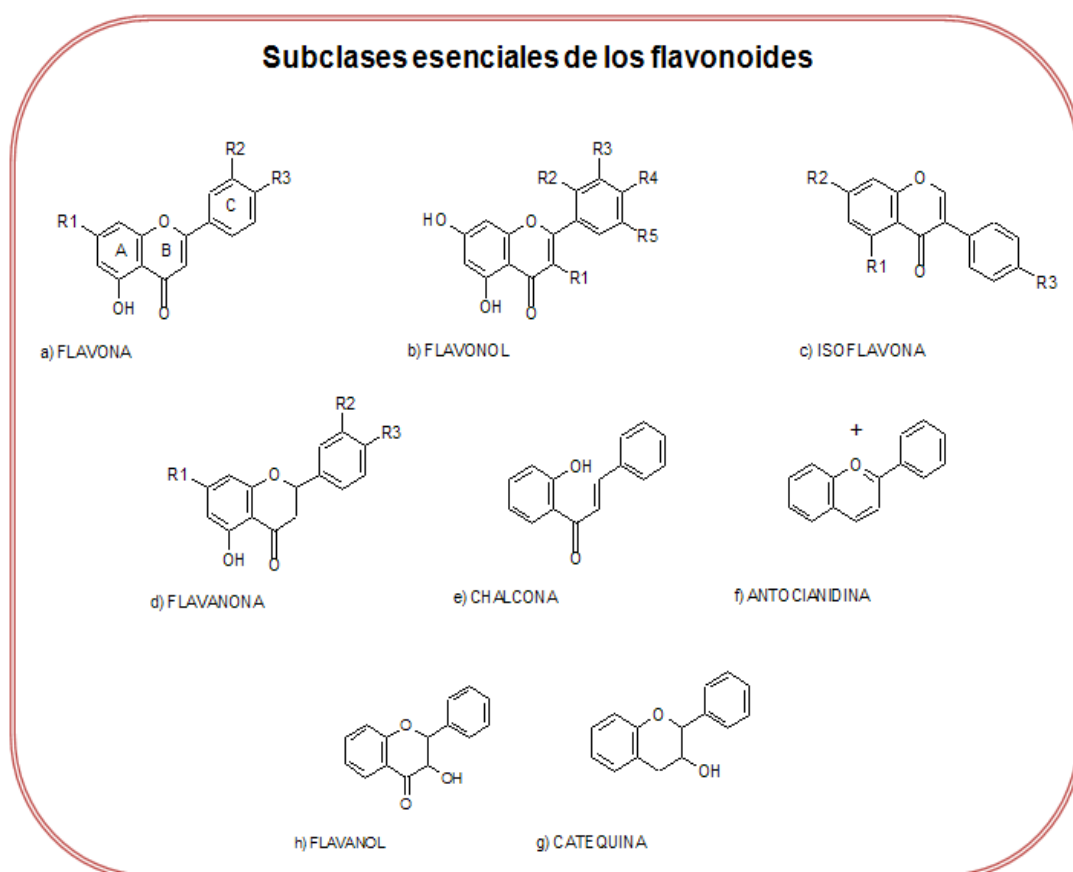


Figura 2. Estructuras químicas de las principales subclases en que se clasifican los flavonoides.

La estructura básica de los flavonoides está constituida por quince átomos de carbono, los cuales forman dos anillos bencénicos unidos por una cadena lineal de tres carbonos ($C_6-C_3-C_6$). Es común que los flavonoides se encuentren hidroxilados en las posiciones: 3, 5, 7, 3', 4', y/o 5'. Frecuentemente uno o más de estos grupos hidroxil están metilados, acetilados o sulfatados (Rijke *et al.*, 2006). A menudo en las plantas, estos compuestos se presentan glicosilados (Harborne y Baxter, 1999; Rijke *et al.*, 2006) en la unión **O-** ó **C-**; más frecuentemente en la unión **O** que en la unión **C**. El *O-glicósido* tiene azúcares como sustituyentes unidos al un grupo hidroxil de la aglicona, usualmente localizado en la posición 3 o 7; mientras que, los *C-glicósidos* tienen azúcares unidos al carbono del aglicona, usualmente en 6-C o en 8-C. Los carbohidratos más comunes son: ramnosa, glucosa, galactosa y arabinosa (Figura 3).

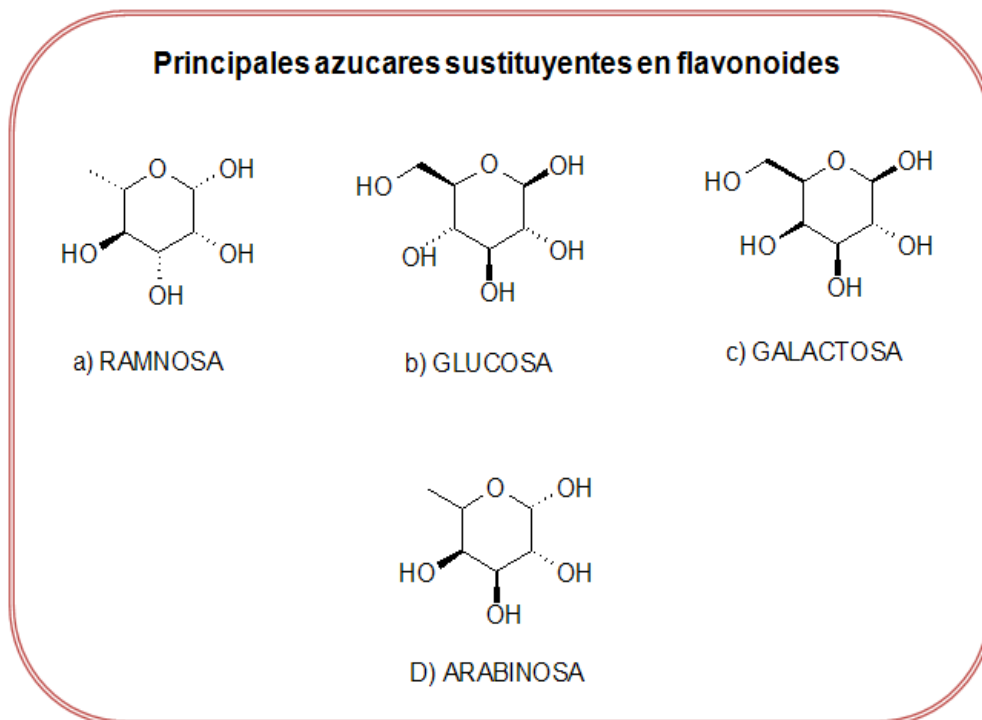


Figura 3. Estructura química de los azúcares sustituyentes, más comunes para flavonoides.

Biológicamente hablando, los flavonoides desempeñan diversos papeles en el crecimiento y desarrollo vegetal, en la defensa contra microorganismos patógenos y plagas (Dixon, 2001); además, se sabe que en las etapas tempranas de la simbiosis de leguminosas con bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios), éstas son quimioatraídas por flavonoides y otras moléculas liberados en exudados de raíz de la planta (incluyendo azúcares) y desplazados hacia sitios localizados en la raíz (Gaworzewska y Carlilie 1982; Djordjevic *et al.*, 1987; Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Dixon, 1999). Además, estos mismos flavonoides inducen rápidamente una serie de genes de nodulación (Guerreiro *et al.* 1997; Djordjevic *et al.*, 1987; Redmond *et al.*, 1986), a través de mecanismos que implican la transcripción de factores Nod. (Guerreiro *et*

al., 1997; Cabrerizo *et al.*, 2001). Algunos flavonoides a concentración nanomolar, provocan quimiotaxis activa en los rizobios hacia la superficie radical. Estos mismos flavonoides a concentración micromolar, activan los genes responsables de la nodulación (*genes nod*) de la bacteria (Azcon-Bieto y Talón 2000).

2.3 . Exudados de raíz

Además de acumular químicos biológicamente activos, las raíces están continuamente produciendo y secretando compuestos hacia la rizosfera. La rizosfera se define como el volumen de suelo afectado por la presencia de raíces de plantas. La presencia de estas raíces provoca cambios biológicos; así como, alteraciones de las propiedades químicas, biológicas y físicas del suelo influenciado por éstas (Pinton, 2001).

Los compuestos químicos exudados por la raíz hacia la rizosfera incluyen la secreción de iones, oxígeno libre y agua, enzimas mucílago y un diverso surtido de metabolitos primarios y secundarios (Bertin *et al.*, 2003; Uren, 2000). A grandes rasgos, la exudación radical puede dividirse en dos procesos activos. El primero, excreción radical, que implica una producción que depende del gradiente de pérdida de materiales con función conocida, mientras que el segundo, es la secreción, que involucra la exudación de compuestos con funciones de defensa y reconocimiento (Bais, *et al.*, 2004; Uren, 2000). Comúnmente los exudados radicales son divididos en dos clases de compuestos: a) compuestos de bajo peso molecular tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios, los cuales cuentan con la mayor variedad de compuestos dentro de los exudados radicales; b) mientras que los compuestos de alto peso molecular como el mucílago (polisacáridos), y proteínas, son los menos diversos, pero frecuentemente componen una gran proporción de la masa de los exudados. Esto muestra claramente que la exudación radical representa un significativo costo de carbono para las plantas (Harsh, *et al.*, 2006), y la magnitud de productos de la fotosíntesis secretados vía exudados radicales varía dependiendo del tipo de suelo, edad, estado fisiológico de la planta y la disponibilidad de nutrientes (Brimecombe *et al.* 2001). A pesar de que la mayoría de las funciones de los exudados radicales no han sido determinadas, diversos componentes presentes en los exudados juegan importantes roles en procesos biológicos (Bais *et al.*, 2003).

El establecimiento de nódulos de fijación de N₂, entre leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* (colectivamente denominadas rizobios) está regulado por un intercambio mutuo de señales químicas (Redmond *et al.*, 1986; Guerreiro *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2000; Maj *et al.*, 2008). En las leguminosas, una baja disponibilidad de nitrógeno promueve la fijación simbiótica de

N₂ mediante el incremento de la exudación de compuestos señalizadores (flavonoides y algunos azúcares) (Haase *et al.*, 2007).

2.4 . Los Genes *nod* y los flavonoides

Los genes de nodulación (leguminosa-rizobio) han sido clasificados dentro de tres categorías: I) genes de nodulación comunes *nodABC*, los cuales son esenciales para la nodulación, II) genes hospederoespecíficos (*nodFE*, *nodH*, *nodG*, *nod PQ*, y otros) estos determinan el alcance de hospederos del microsimbionte e influyen en el índice y frecuencia de formación de nódulos; y III) una familia de regulación, los genes *nodD* (Maj *et al.*, 2008).

La primera señal entre la planta hospedera y el simbiote se compone de flavonoides producidos por la planta (Cuadro 1), éstos además de otras funciones, son necesarios para la inducción de los genes *nod* (Rossen, *et al.*, 1985). Los flavonoides influyen sobre el ADN productor de factores NodD, proteínas pertenecientes a la familia LysR de regulación transcripcional. NodD junto con un Flavonoide específico, unen una secuencia conservadora arriba del operón *nod*, llamados caja *nod*, actuando como un activador transcripcional de varios promotores de genes *nod*. Estudios recientes sugieren que la presencia del flavonoide apropiado induce cambios en la topología del ADN en la ubicación de NodD vinculado en la región promotora; de este modo, permite que la ARN polimerasa inicie la transcripción (Chen *et al.*, 2005). Los genes *nod* controlan la biosíntesis de lipopolisacáridos llamados factores Nod, estos son secretados por las bacterias y con esto provocan múltiples respuestas para la nodulación de la planta hospedera adecuada. El rizobio invade la raíz a través de una estructura tubular llamada hilo de infección, el rizobio penetra en el cortex radical y estimulan la formación de un primordio de nódulo (Jones *et al.*, 2007). La división de las células primordiales es precedida por la inhibición del transporte de auxinas causado por un flavonoide de raíz endógeno, lo cual indica que estos compuestos juegan un rol crucial durante el desarrollo de señales durante la formación inicial del primordio de nódulo (Mathesius *et al.*, 1998; Wasson *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2006); ver figura 4.

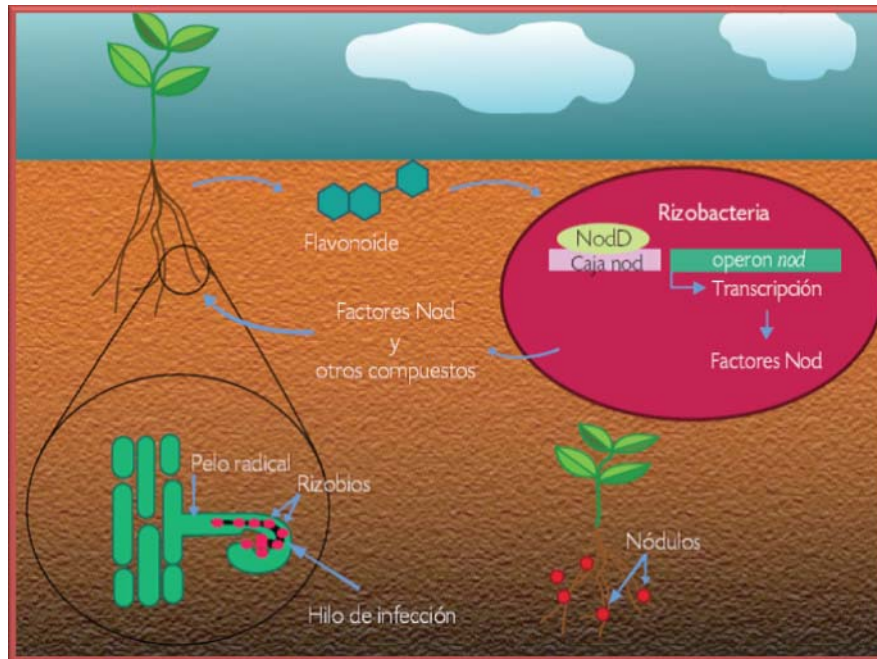


Figura 4. Esquema de comunicación química entre plantas leguminosas y bacterias fijadoras de N². Tomado de Holguín (2008)

Normalmente se asume que la interacción entre NodD y los flavonoides es específica; sin embargo, los genes *nod* de diferentes rizobios pueden responder a diferentes juegos de flavonoides. Se ha observado que algunos flavonoides presentes en extractos de raíces o semillas pueden ser simbióticamente inefectivos e incluso inhibir la nodulación. La mezcla de flavonoides y otros compuestos que son exudados por las raíces son considerados como las señales que influyen sobre la capacidad de los rizobios para colonizar la raíz, sobrevivir en la rizosfera y afectar la competitividad de rizobios y las interacciones simbióticas con leguminosas (Cooper, 2004, 2007). Por otra parte, existen evidencias de que la introducción de inductores exógenos incrementa la nodulación de algunas especies de leguminosas (Kapulnik *et al.*, 1987; Hungria y Phillips, 1993; Zhang y Smith, 1995, 1996; Begum *et al.*, 2001) ver cuadro 1.

Cuadro 1. Flavonoides reportados como inductores de genes nod (Hungria y Stacey, 1997).

Leguminosa hospedera-rizobio	Flavonoide inductor	Nombre común	Fuente
<i>Medicago sativa</i> - <i>S. meliloti</i>	5, 7, 3', 4'-Tetrahidroxiflavona	Luteolina	Extractos de semillas
	5, 3', 4'-Tetrahidroxiflavona-7-O-glucosido	Luteolina-7-O-glucósido	Exudados de semillas
	5-Metoxi-7, 3', 4'-trihidroxiflavona	5-Metoxiluteolina	Exudados de semillas
	3', 5-Dimetoxi-7, 4'-dihidroxiflavona	3', 5-Dimetoxiluteolina	Exudados de semillas
	3'-Metoxi-5, 7, 4'-trihidroxiflavona	Crisoeriol	Exudados de semillas
	7, 4'-Dihidroxiflavanona	Licuiritigenina	Exudados de raíz
	7, 4'-dihidroxiflavona	s/nc	Exudados de raíz
<i>Pisium sativa</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i>	4, 4'-Dihidroxi-2'-metoxichalcona	Metoxichalcona	Exudados de raíz
	5, 7, 4'-Trihidroxiflavona-7-O-glucosido 5, 7, 3', 4'-tatrahidroxiflavona	Apigenina-7-O-glucosidoeridictiol	Exudados de raíz y de semillas
<i>Vicia sativa</i> - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i>	3, 5, 7, 3'- Tetrahidroxi- 4'-metoxiflavanona	s/nc	Exudados de raíz
	7, 3'-Dihidroxi-4'.metoxiflavanona	s/nc	Exudados de raíz
<i>Trifolium repens</i> - <i>R. leguminosarium</i> bv. <i>Trifolii</i>	7, 4'-dihidroxiflavona	s/nc	Exudados de raíz y extractos de semillas
	7, 4'-Dihidroxi-3'-metoxiflavona	Geraldona	Extractos de plántulas

Cuadro 2. Continuación.

	4'-Hidroxi-7-metoxiflavona	s/nc	Extractos de plántulas
<i>Glicina max-B.japonicum</i> y <i>S. frediiG.</i> <i>Max-B. japonicum</i>	7, 4'-dihidroxisoflavona	Daidzeina	Extractos de semillas y plántulas
	5, 7, 4'- Trihidroxisoflavona	Genisteina	Extractos de plántulas
	4, 2', 4'-Trihidroxichalcona	Isolicuiritigenina	Exudados de raíz
<i>Phaseolus vulgaris-R. leguminosarum</i> bv. <i>Pphaseoli</i> y <i>R. etli</i>	3-O-Glicósido de 3, 5, 7, 3'4', 5'- hexahidroxiflavilium	3-O-glicosidos de Delfinidin	Exudados de semillas
	3, 5, 7, 4', 5'- Pentahidroxiflavilium	Petunidina	Exudados de semillas
	3, 5, 7, 4'-Tetrahidroxiflavilium	Malvidina	Exudados de semillas
	3-O-Glicósido de 3, 5, 7, 3'4', 5'- hexahidroxiflavona	3-O-glicoósidos de Miricetina	Exudados de semillas
	3, 5, 7,3', 4'-Pentahidroxiflavona	Quercetina	Exudados de semillas
	3, 5, 7, 4'-Tetrahidroxiflavona	Kaempferol	Exudados de semillas
	5, 4'-Dihidroxisoflavona-7-O-glicósido	Genisteina-7-O-glicosido	Exudados de raíz
	5, 7, 3', 4'-Tetrahidroxiflavona	Eridictiol	Exudados de raíz
	5, 7, 4'-Trihidroxiflavona	Naringenina	Exudados de raíz

3.0. ANTECEDENTES

Los estudios de la secreción de flavonoides hacia la rizosfera, han sido orientados a la descripción de la regulación de la expresión molecular de los genes involucrados, la fisiología y el metabolismo de las plantas hospedadas, así como la influencia de las deficiencias nutrimentales.

Hungria *et al.* en **1991** examinaron exudados de raíces jóvenes de *Phaseolus vulgaris*, identificando tres flavonoides inductores de genes *nod*: eriodictiol, el 7-O-glicosido de genisteína, y naringeína.

El efecto de varios planes de nutrición y un periodo de sequía inducida sobre la biomasa y la partición nutrimental entre diferentes órganos vegetales, en relación con el agua en plántulas de *Prosopis* fue estudiado en **1992 a** por M. Imo y V.R. Timmer . Encontrando que a pesar de que el modo de fertilización no influye en la producción total de materia seca, la biomasa y distribución nutrimental entre los diferentes órganos sí se afecta dependiendo del régimen de fertilización. Y que bajo condiciones óptimas de riego las plántulas mostraron una alta transpiración y conductancia estomática a lo largo del día. Pero la sequía inducida disminuyó ambos parámetros en todos los tratamientos excepto cuando se sometieron a una dosis única de fertilización, en cuyo caso mantenían una elevada apertura estomática y transpiración.

En otro trabajo de Imo y Timmer (**1992 b**) evaluaron la asimilación de nitrógeno en plántulas de mezquite, bajo dos planes de fertilización: uno convencional y uno exponencial (puro y uno exponencial modificado con adiciones incrementadas). Encontraron que con el régimen de fertilización exponencial se puede alcanzar un estado de nutrición estable. Mientras que los regímenes convencionales muestran un alto grado de dilución nutrimental, causando estrés nutrimental.

Aiazzi, Argiello y Abril en **1996**, compararon el ahorro de carbono y nitrógeno en plantas de la especie *Prosopis chilensis*, noduladas y no noduladas con especies nativas de microorganismos diazotrofos; con NO_3 y N_2 (fijado simbioticamente),

evaluaron la acumulación de materia seca en tratamientos, encontrando que en ambos tratamientos la asimilación de nitrógeno fue muy similar, lo que indica eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno en condiciones de sistemas empobrecidos.

En **1997** Bolaños y Werner, estudiaron el efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici*, *R. etli* y *R. leguminosarium* sobre la concentración de seis flavonoides (daidzeina, coumestrol, naringenina, licuiritigenina y isolicuiritigenina), inductores de genes *nod*, exudados por la raíz de *Phaseolus vulgaris*. Concluyendo que la concentración de estas señales es relativa a la naturaleza de la bacteria, y que, daidzeina, coumestrol, naringenina, fueron los compuestos dominantes de los exudados tanto en plantas infectadas como en las no infectadas, observando un marcado aumento en la concentración de daidzeina y naringenina después de la inoculación con todas las sepas.

Un trabajo realizado por Chishaki y Horiguchi en **1997**, estableció la estrecha relación existente entre la deficiencia de algunos nutrientes, y la respuesta del metabolismo secundario de tres plantas de cultivo (*Oriza sativa* L., *Hordeum vulgare* L y *Vicia Fava* L.). Encontrando que las deficiencias en N, P y K estimulan el metabolismo fenólico en *Oriza sativa*; y que la respuesta más sensible fue hacia la deficiencia de N en las plantas al observar que los niveles de algunos ácidos fenólicos se elevaron en respuesta a esta deficiencia. Concluyendo que el análisis de metabolitos secundarios, tales como ácidos fenólicos, puede servir como método para el diagnóstico de los desórdenes nutricionales antes de que aparezcan síntomas visibles.

Reyes-Quintanar y su grupo de trabajo compararon, en el **2000**, la riqueza de especies de microorganismos en la asociación *Neobuxbaumia tetetzo* y leguminosas arbóreas; así como, la importancia de micorrizas arbusculares en suelos erosionados y no erosionados en una zona de la cuenca del Río Salado de Zapotitlán de las Salinas, Puebla; encontrando que, en la zona no erosionada, el número de microorganismos de la interrzosfera formada por las plantas fue mayor que en plantas aisladas; así como el porcentaje de micorrización. En la zona erosionada encontraron menor cantidad de microorganismos pero una mayor colonización de micorrizas. Por lo cual concluyeron que la diferencia entre las poblaciones microbianas, así como la colonización por

micorrizas se debe a los productos radicales producidos por las plantas, ya sea en conjunto o aisladas.

Ante la necesidad de herramientas para la evaluación morfofisiológica *in situ* de raíces, en el **2001** Guedea-Fernández, *et al.*; propusieron un modelo de rizotróon con paredes laterales deslizables; lo cual permite colocarlos en tres posiciones. Estas características ofrecen una amplia gama de posibilidades en el plano didáctico, ya que pueden evaluarse diseños experimentales sobre fertilización, sequía, desórdenes nutrimentales, salinidad, micorrización, etc.; haciendo de este diseño una buena herramienta en docencia e investigación.

En el **2003** Vilela, Rennella y Reventa, compararon la respuesta de dos arbustos (*Prosopis flexuosa*-arbusto y *Prosopis strombulifera*) y dos árboles (*Prosopis alba* y *Prosopis flexuosa*-árbol), a la disponibilidad de agua (buen y bajo abastecimiento) y nitrógeno (0, 50, 100 y 200 mg de N), encontrando que *P. alba*, fue la única de las especies que al aumentar N y con buen suministro de agua acumuló biomasa y que la deficiencia de agua afectó el crecimiento de todas las especies a excepción de *P. strombulifera*. Al analizar sus resultados concluyeron que solo *P. alba* fue capaz de beneficiarse con el incremento de agua y N, y que solo *P. strombulifera* desvía recursos para almacenaje de carbohidratos, mientras que *P. flexuosa* exhibe un patrón intermedio de respuestas por tratamiento.

Haase y colaboradores en el **2007** realizaron un trabajo en el que evaluaron la cantidad y cualidad de los exudados de raíz de *Phaseolus vulgaris*, sometidos a una alta concentración de CO₂ y creciendo en suelo con baja disponibilidad de Nitrógeno. Encontrando que al elevar el CO₂ ambiental se estimuló el exudado de azúcares, malato y quimio-atrayentes de rizobios; así como, un incremento en la acumulación de malato que es una mejor fuente de carbono para el microsimbionte, y de malato esencial para el desarrollo del nódulo. Además, observaron un incremento en la liberación de flavonoides inductores de genes *nod* (genisteina, daidzeina y coumestrol) independiente del suministro de N.

Ruíz, *et al.* (**2008**), estudiaron diversidad de microorganismos (cultivables), instalados en islas de fertilidad alrededor de *Prosopis laevigata* y *Pachycereus hollianus*, en suelos degradados de Zapotitlán Salinas, México. Encontrando bacterias

pertenecientes al género *Rhizobium*, y *Streptomyce*, concluyendo que las islas de fertilidad formadas bajo *P. laevigata* son la fuente de nutrientes más importante que eleva la actividad microbiana en suelos degradados.

La distribución vertical de las comunidades microbianas bajo *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*, en los suelos de Tehuacán, México, fue estudiada por Rodríguez-Zaragoza y colaboradores (2008). En este trabajo encontraron que el total de bacterias, hongos y diazótrofos heterótrofos encontrados, fue mayor bajo el dosel de los árboles que en el suelo desnudo. Además, observaron que la actividad diazotrofa heterotrófica, fue mayor bajo *P. praecox* que bajo *P. laevigata*. Concluyeron que las diferencias fenológicas de estas plantas no afectan el número de microorganismos y que la elevada actividad de nitrogenasa bajo *P. praecox* puede influir en la distribución de nitrógeno en este ambiente.

En un estudio de Maj, *et al.*, (2008) , se valoraron las respuesta a flavonoides como factores de influencia sobre la competitividad de rizobios y su actividad simbiótica. Utilizando flavonoides sintéticos y promotores exudados por semillas de trébol, guisante, frijol y arveja. Encontrando que de todos los flavonoides y exudados de semillas evaluados, la naringenina, hespertina y exudados de semillas de trébol y arveja fueron los más efectivos inductores del promotor nodA.

4.0. JUSTIFICACIÓN

Después del agua, el nitrógeno es el nutriente más importante en el desarrollo de la planta debido a la gran cantidad que requiere del suelo; desafortunadamente, los suelos comúnmente son más deficientes en nitrógeno que en cualquier otro elemento, especialmente en zonas áridas y semiáridas. Considerando la importancia de la fijación simbiótica de Nitrógeno en estas zonas, es de suma importancia realizar estudios que contribuyan al conocimiento de este proceso; con el fin de identificar cuales son los factores que pueden favorecer o limitar el desarrollo de especies vegetales en zonas áridas donde los niveles de nitrógeno son reducidos.

5.0. HIPÓTESIS

Bajo condiciones limitantes de Nitrógeno en suelo, los rizobios son capaces de asociarse con las leguminosas y formar nódulos donde se fija nitrógeno atmosférico. Un factor determinante en las primeras etapas de formación de estas estructuras es la liberación de flavonoides quimioatrayentes por parte de la planta. Por lo que es de esperarse que al limitar el suministro de nitrógeno a plántulas de *Prosopis* (que es una leguminosa) se aumente la liberación de estos compuestos.

6.0. OBJETIVOS

General:

- Aislar, caracterizar e identificar los polifenoles exudados por raíces de *P. laevigata*, a fin de identificar los compuestos que han sido señalados por su importancia durante el proceso de asociación simbiótica de las leguminosas.

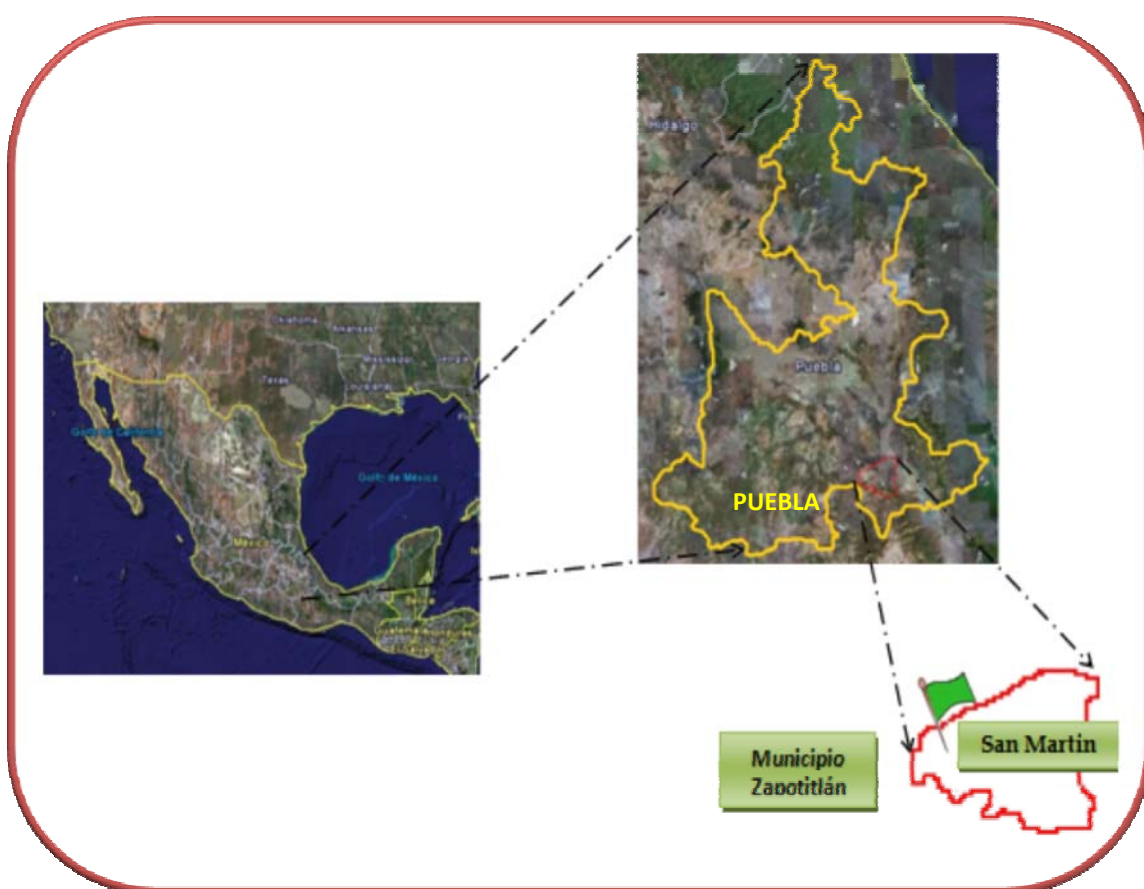
Particulares:

- Extraer y aislar compuestos polifenólicos exudados por la raíz de plántulas de *P. laevigata*, crecidas en rizotrones.
- Identificar los compuestos polifenólicos aislados.
- Cuantificar la concentración de los compuestos polifenólicos.

6.0. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Área de estudio

El Valle de Zapotitlán Salinas, se localiza en el occidente del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en el sureste del estado de Puebla y zonas adyacentes al noroeste de Oaxaca (Olvera, 2006). Su superficie aproximada es de 270 km², se encuentra entre los 18° 12' Y 18° 24' de latitud norte y entre los 97° 24' y 97° 36' de longitud oeste, con un rango altitudinal de 1,460 a 2,600 msnm. Pertenece a la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur, subprovincias Sierras centrales de Oaxaca, dentro de la región de la Alta Mixteca y la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Figura 5).



. Figura 5. Mapa de ubicación geográfica de Zapotitlán de las Salinas, Puebla

7.2. Recolecta de material en campo

Para este trabajo se utilizó material vegetal silvestre recolectado en campo, el cual consistió en semillas de *Prosopis laevigata*. Para la obtención de semillas se realizó una selección de las plantas madre, tomando en cuenta el vigor y altura (1 a 1.5 m) del árbol y que se encontrara libre de plagas e insectos. La recolecta se realizó manualmente, cortando las vainas de las ramas o recogéndolas del suelo. Posteriormente, en el laboratorio, se retiró el pericarpio, mesocarpio y se obtuvo la

pepita o endocarpio, para retirar éste último se utilizaron pinzas y/o tijeras para obtener la semilla sin ningún daño.

7.3. Condiciones de cultivo

Las semillas de *P. laevigata* se escarificaron con ácido sulfúrico por 15 minutos, después se hidrataron por 24 horas en agua y se germinaron en cajas petri con el fondo cubierto con papel filtro y dos mililitros de agua destilada. Cuando la radícula apareció se trasplantaron a rizotrones de acrílico transparente con una ventana móvil diseñados para este proyecto (ver ANEXO 1); en los cuales, se cultivaron las plántulas (1 plántula por rizotrón), éstas, fueron tratadas con diferentes suministros de nitrógeno, una óptima (200 mg/l) y dos deficientes (100 y 50 mg/l). Los niveles de inclusión de nitrógeno en los tratamientos fueron definidos con base en los estudios previos de Imo y Timer (1996 a y b) y considerando los niveles de nitrógeno de la zona de estudio. El sustrato utilizado fue agrolíta y los riegos se realizaron a capacidad de campo con agua destilada cada tercer día y con la solución nutritiva correspondiente quincenalmente.

7.4. Registro de datos de crecimiento

Se tomaron datos semanales de longitud de raíz y altura del tallo hasta las 8 semanas; a la semana 22 las plantas fueron extraídas de los rizotrones, se registraron los datos de peso, longitud de raíz y de tallo; además, se midió el área foliar utilizando un integrador de área foliar marca LI-COR modelo LI 3000A.

7.5. Parámetros fotosintéticos

Los parámetros fotosintéticos evaluados en este trabajo fueron, tasa fotosintética, concentración intracelular de CO₂, apertura estomática y transpiración. Estos parámetros se midieron usando un Analizador Infrarrojo de CO₂ (IRGA), marca Li-COR modelo Li-6400. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) utilizada fue de 300 $\mu\text{Mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$, para definir este valor se realizó una curva en la cual se estableció que este valor era el más adecuado, ya que fue con el que se obtuvieron los valores más altos de tasa fotosintética (Ver ANEXO 2). La temperatura en la cámara se fijó en 20°C. Los datos se tomaron a las 14 y a las 22 semanas de tratamiento, a la par que se realizaban las pruebas con los exudados.

7.6. Obtención de Exudados Fenólicos

Se decidió hacer el primer muestreo de exudados a las siete semanas de edad, debido a que en un estudio preliminar en el que se obtuvo una curva de crecimiento de raíces de *P. laevigata* (ver ANEXO 3) y en ella se observó que a partir de la semana 6 los valores eran más constantes. La recolecta de exudados se llevó a cabo mediante adsorción en papel filtro de acuerdo a lo publicado por Haase *et al.*, (2007). En el muestreo se recolectaron exudados mediante el contacto de las raíces con papel Whatman No 541 por dos horas, este procedimiento se realizó tres horas después de iniciado el periodo de luz. Una vez retirados los filtros, se sumergieron en 250 ml de solución metanol/acetato de etilo grado-HPLC (1:1, v/v) con agitación constante por 5 horas, transcurrido este tiempo, las soluciones se evaporaron a sequedad utilizando aire comprimido, los residuos se resuspendieron en 1ml de metanol (ver ANEXO 4). Una semana después se tomaron muestras de los percolados de cada rizotró; del fondo de cada rizotró se recolectaron aproximadamente 5 ml, posteriormente se evaporaron y se resuspendieron en metanol (ver ANEXO 5). Todas las muestras fueron almacenadas a 4° C para su posterior análisis.

7.7. Preparación de extractos de tejido vegetal

En la semana 22 del tratamiento, las plántulas de *P. laevigata* se extrajeron de los rizotrones y se prepararon extractos con tejido de raíz, tallo y hojas por separado, cada muestra fue macerada en metanol (grado HPLC), recuperada en un tubo ependorff y centrifugada a 14 000 rpm para precipitar los restos de tejido.

7.8. Identificación de Flavonoides

Las muestras obtenidas tanto del papel filtro Watman, como de los percolados y los extractos de tejidos fueron analizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés), empleando un sistema de fase reversa en modo isocrático. La fase móvil consistió en una mezcla de agua:metanol:ácido acético (60:35:5 v/v/v) y como fase estacionaria una columna Discovery C-18 de 25cm x 4.6 mm, 5 micras. Las muestras separadas fueron analizadas con un detector de arreglo de diodos ajustado a 280 nm y con un rango de barrido de 220 a 400 nm. La asignación de la estructura de los flavonoides se realizó mediante la inspección del espectro de absorción en el rango de luz ultravioleta, comparando los máximos de absorción con los obtenidos de estándares puros reportados en la literatura (*Masa et al.*, 2007; *Lin et al.*, 2007; *Greenham et al.*, 2007; *Liu et al.*, 2007; *Farag et al.*, 2007;

Sutthanut *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008). Para la cuantificación de los flavonoides se utilizó el índice de extinción promedio 12000 mM^{-1} (López *et al.*, 2001; Satoshi y Ragai, 1995; Franke *et al.*, 2004). Adicionalmente, se realizó un ensayo de recuperación enriqueciendo una muestra con un estándar puro de naringina y empleando el método de extracción descrito anteriormente. Los resultados mostraron una recuperación del 98%.

7.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de crecimiento, fotosíntesis, y concentración de flavonoides encontrados, se analizaron mediante pruebas de ANOVA con una $\alpha=0.05$ como valor de significancia y en los casos en que se encontraron diferencias significativas se aplicaron pruebas de LSD de Fisher (Daniel, 1977) utilizando el programa STATISTICA (1998).

7.10. Esquema de la metodología

El diseño experimental para este trabajo se describe esquemáticamente en la siguiente Figura 6.

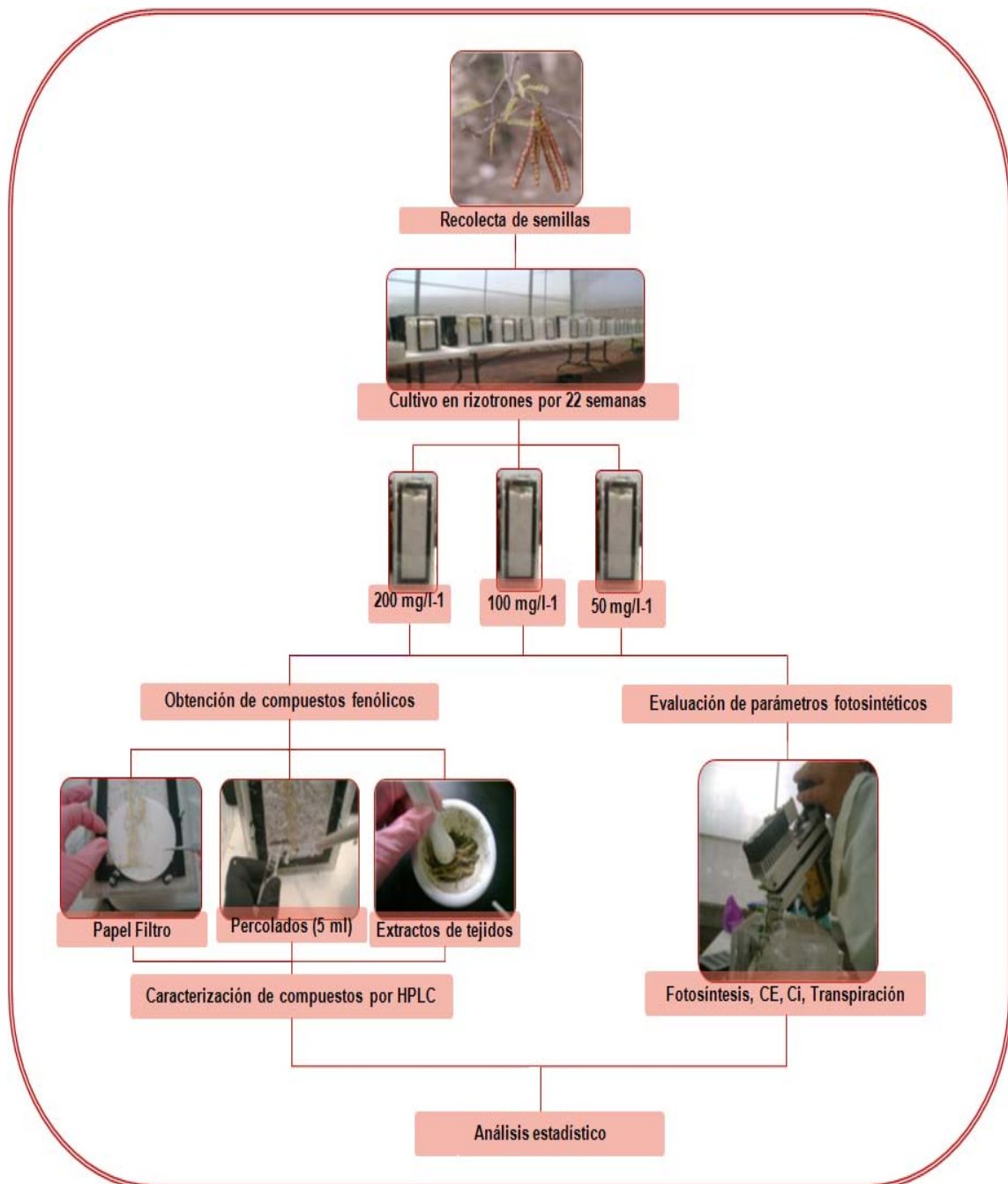


Figura 6. Esquema de la metodología.

8.0. RESULTADOS

8.1. Crecimiento de raíz y tallo de *Prosopis laevigata*

No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las plántulas (longitud de raíz, altura de tallo) bajo los tres tratamientos (control: N=200 mg/l de disolución; deficientes: N=100 mg/l y N=50 mg/l de disolución); sin embargo, se observó una tendencia de crecimiento de raíz mayor en las plantas con más limitación en nitrógeno (N=50 mg/l de disolución), ya que presentaron los valores más altos de crecimiento de raíz que van de los 56.65 mm a los 573.33 mm de la primera a la octava semana y a las veintidós semanas 573.33 mm de longitud de raíz (Figura 7a). Por otro lado, los valores de las plántulas en el tratamiento control (N=200 mg/l de disolución) registraron tasas de crecimiento de la raíz que van de 46.53 a 195.77 mm de longitud de raíz de la primera a la octava semana respectivamente llegando a 548.33 mm de longitud a las veintidós semanas (Figura 7a). Las imágenes de las raíces de individuos en tratamiento se pueden observar en la Figura 7d. Así mismo, se observó una tendencia contraria en el crecimiento del tallo; ya que, en este caso las plántulas del tratamiento control presentaron mayor crecimiento que en promedio las plantas midieron 20.84 mm la primera semana y llegaron a medir en promedio 54.93 mm de altura en la semana ocho y 196 mm de altura en la semana veintidós (Figura 7b), mientras que las plántulas del tratamiento más deficiente mostraron valores menores de crecimiento de tallo con valores que van de 12.96 mm a 49.31 mm de longitud de tallo de la primera a la octava semana, y a las veintidós semanas 135 mm de altura de tallo (Figura 7b). Estos resultados se muestran de manera sintética en la gráfica de la ilustración 1c, donde se observan los valores de crecimiento de tallo por tratamiento y a lo largo del tiempo, sobre el eje de las ordenadas positivas y los valores de crecimiento de raíz también sobre el mismo eje, pero en negativo, sólo como un modo gráfico de mostrar la tendencia observada en este trabajo.

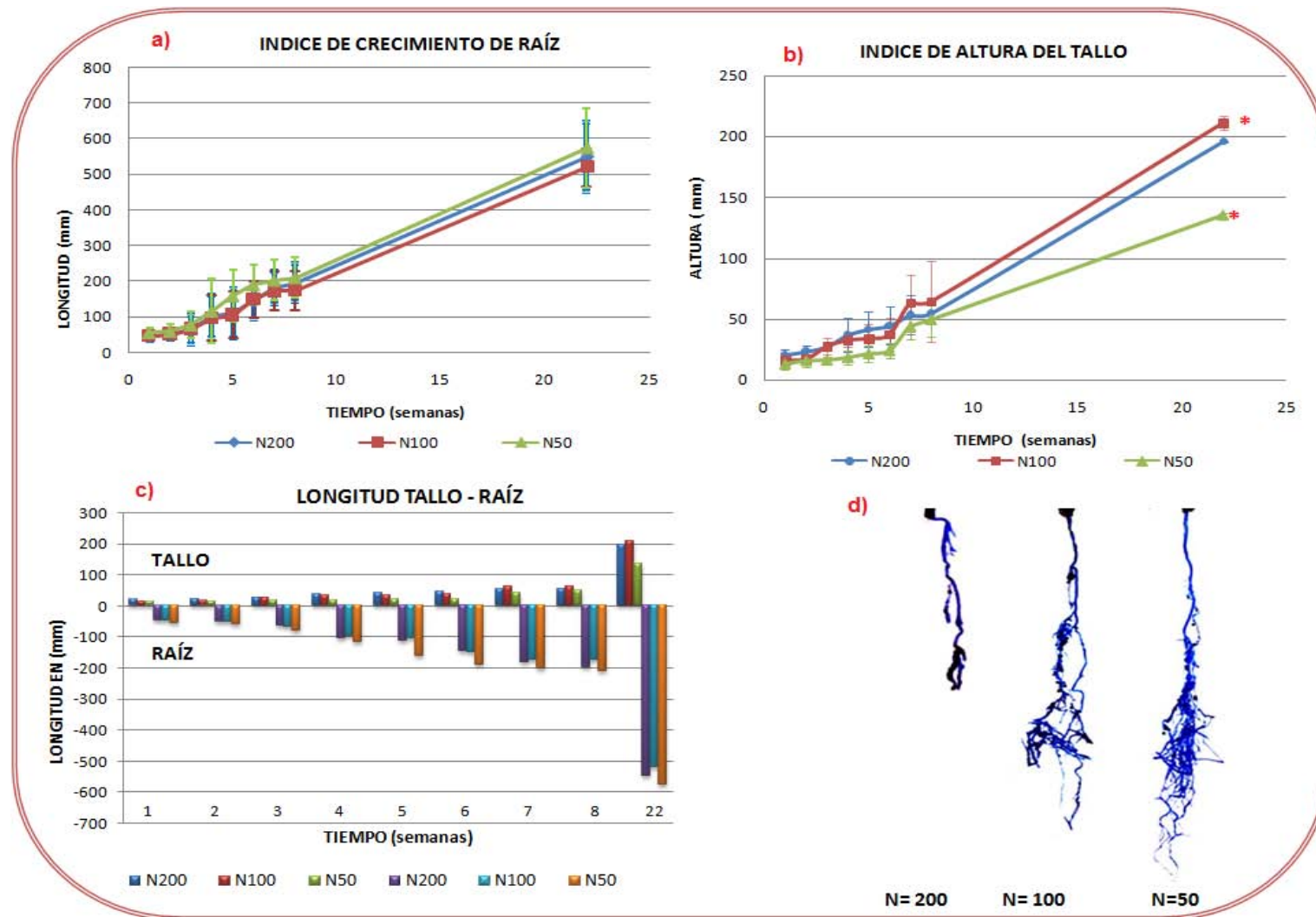


Figura 7. a) Índice de crecimiento de raíz por tratamiento y tiempo; b) Índice de crecimiento de tallo por tratamiento y por tiempo ; c) Relación del crecimiento del tallo y raíz d) Raíces de plántulas de *Prosopis laevigata*, crecidas bajo las diferentes concentraciones de N

8.2. Peso de tallo y raíz

En cuanto al peso húmedo, se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) del peso de las raíces de veintidós semanas de edad, entre los tratamientos con 100 y 50 mg de N, ya que como se muestra en la figura 8a, las raíces que presentaron menor promedio de peso fueron las de plántulas que estuvieron bajo tratamiento con menor cantidad de nitrógeno (N=50 mg/l de disolución), con un promedio de 1.38 g; por el contrario, los tallos de estas mismas plántulas presentaron el mayor promedio de peso con 2.23 g; encontrando diferencias significativas ($p > 0.05$) entre éstos y los tallos de las plántulas con N=200 mg/l de disolución, con un valor promedio de 0.574 g (Figura 8b).

8.3. Peso de hojas y área foliar

En cuanto al peso de las hojas a las veintidós semanas de tratamiento, se observó una tendencia de menor peso ganado en las plántulas del tratamiento con N=50 mg/l de disolución, con un promedio de peso de 0.273 g seguido por las plántulas con tratamiento de n=100 mg/l de disolución, con 0.492 g en promedio y 0.566 g para el tratamiento con N=200 mg/l de disolución (Figura 8c). La misma tendencia se presentó en el área foliar con un promedio de 38.46, 33.32 y 21.16 cm² para N=200, 100 y 50 mg/l respectivamente (Figura 8d). Los análisis estadísticos de los datos de peso de hoja y área foliar no mostraron diferencias significativas.

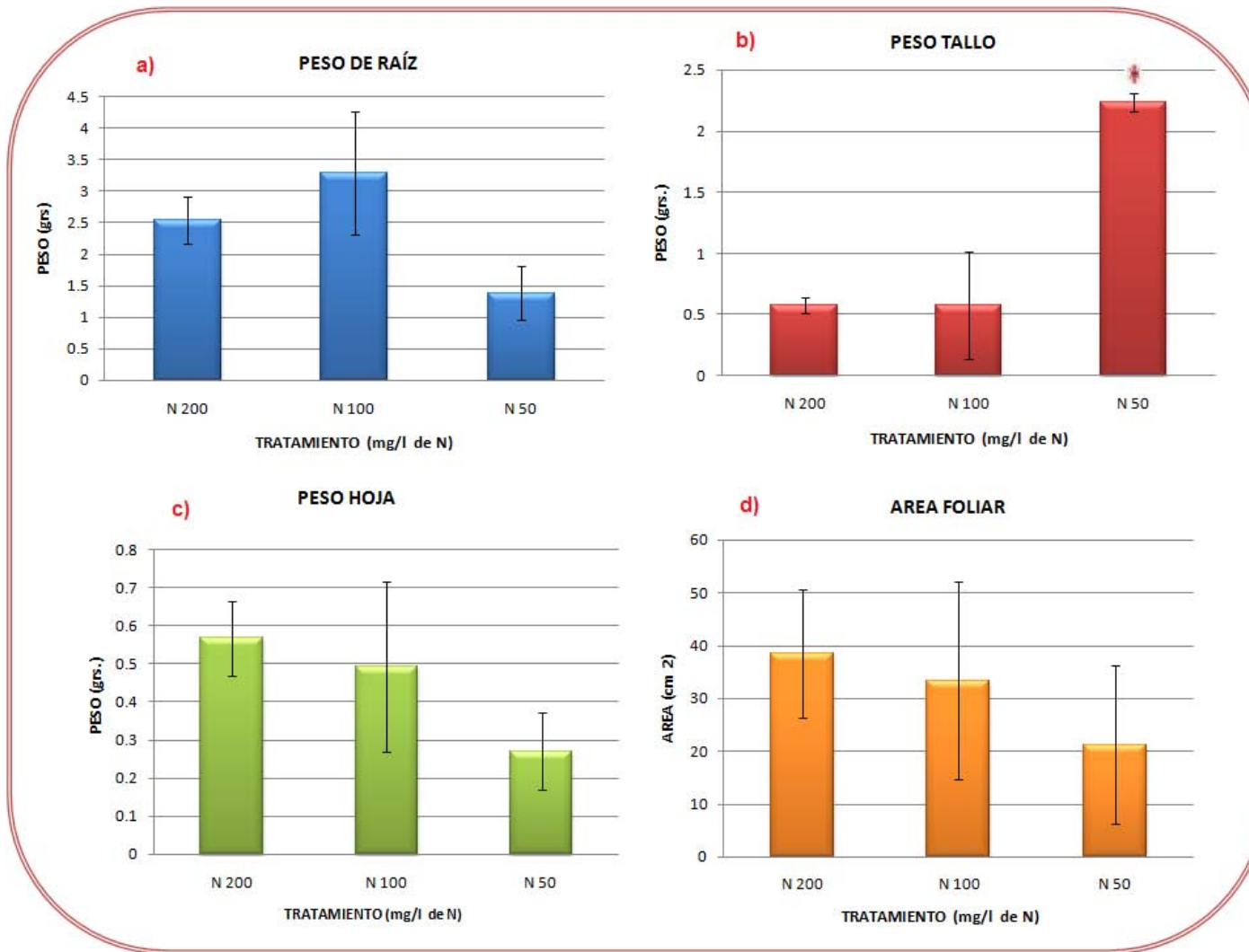


Figura 8. Valores de peso y área foliara las 22 semanas de tratamiento (Nitrógeno= 200, 100 y 50 mg/l de disolución) a) Peso de raíz, b) Peso de tallo. C) Peso de hoja y d) Área foliar.

8.4. Parámetros fotosintéticos

La tasa de fijación de CO₂ no mostró diferencias significativas entre los tratamientos cuando se midió a las siete semanas (Figura 9a). A las veintidós semanas de tratamiento la tasa de fijación de CO₂ (fotosíntesis) mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el tratamiento control (N= 200 mg/l de solución) y el tratamiento con menor cantidad de nitrógeno (N= 50 mg/l de disolución) con valores de 7.81 y 5.49 $\mu\text{Mol/m}^2 \text{s}^{-1}$, respectivamente (Figura 9a).

En cuanto a la conductancia estomática, se encontraron los siguientes valores a las siete semanas 0.0147, 0.0132 y 0.0028 Mol H₂O m² s⁻¹, y a las veintidós 0.0525, 0.0922 y 0.0486 Mol H₂O m² s⁻¹ para 200, 100 y 50 mg de nitrógeno por litro, sin encontrar diferencias significativas en ninguno de los casos (Figura 9b).

El valor de CO₂ intracelular fue nulo a las siete semanas y a las veintidós semanas de tratamiento mostró los siguientes valores para N= 200, 100 y 50 mg/l de solución: 254.33, 262.66 y 131.66 $\mu\text{Mol CO}_2/\text{mol aire}$ respectivamente, sin diferencias significativas (Figura 9c).

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en los valores de transpiración a las siete semanas (0.604, 0.505 y 0.060 mmol H₂O m² s⁻¹), ni a las veintidós semanas (1.03, 2.05 y 0.99 para N= 200, 100 y 50 mg/l de solución respectivamente), esto se muestra en la Figura 9d.

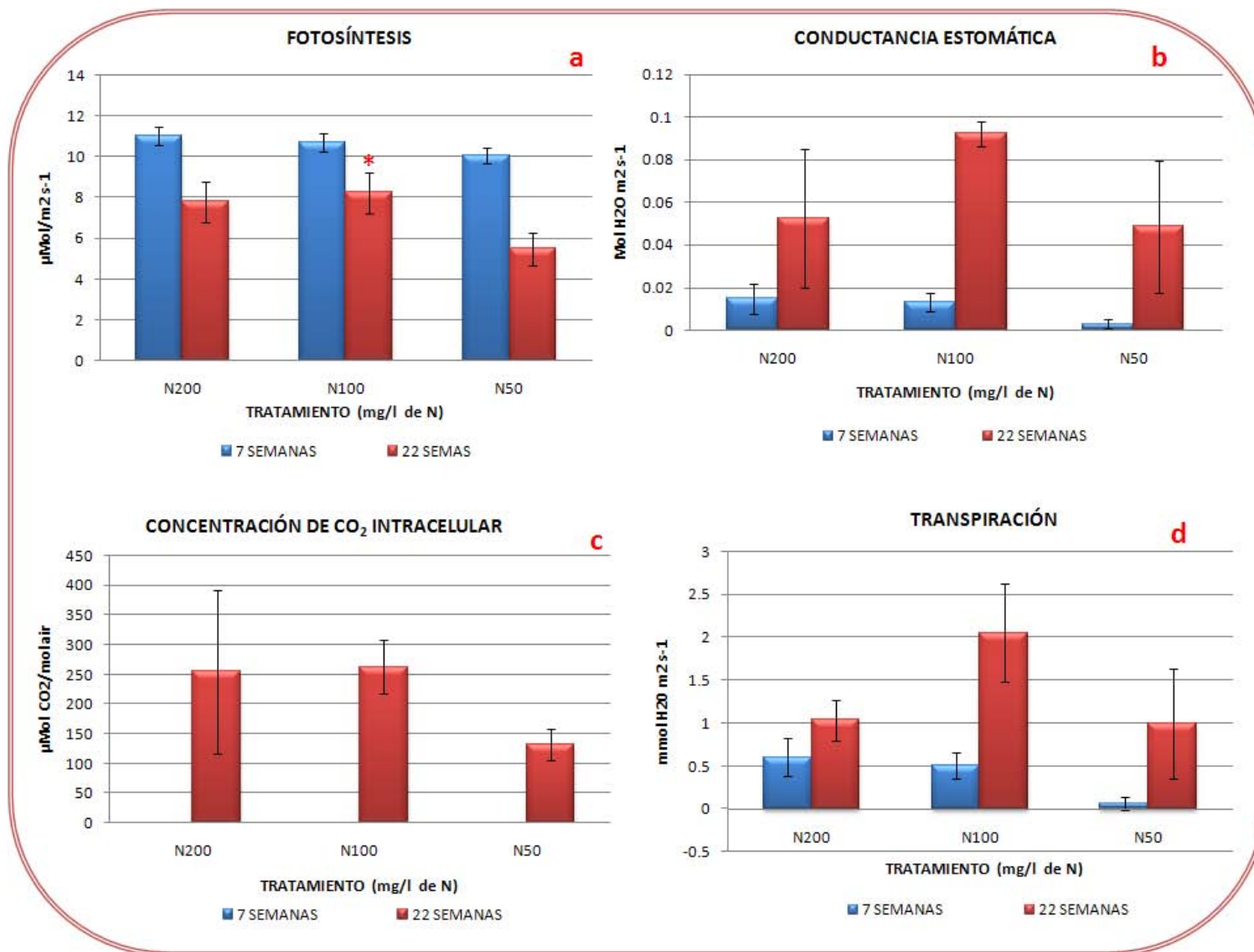


Figura 9. Parametros fotosintéticos a las 7 y 22 semanas, Nitrógeno= 200, 100 y 50 mg/l de disolución a) Fotosíntesis; b) Conductancia stomática; c) Concentración intracelular de CO₂;

8.5. Obtención de compuestos Fenólicos

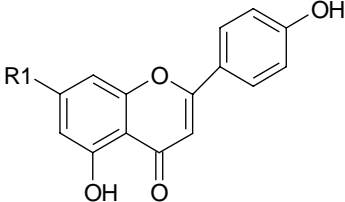
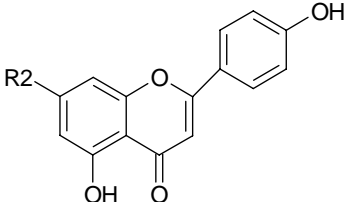
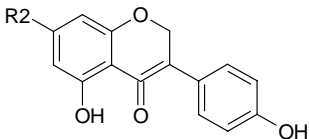
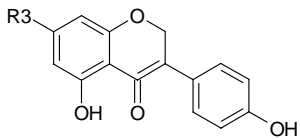
No se encontraron concentraciones detectables en las muestras obtenidas mediante papel filtro Watman, ni en las muestras de los percolados de los rizotrones. Sin embargo, cuando se prepararon extractos de raíz, tallo y hoja, se encontró un total de 13 compuestos fenólicos distribuidos en los diferentes tejidos de las plántulas de *P. laevigata* (Cuadro 2).

Al realizar los extractos de los tejidos se encontraron 13 flavonoides endógenos (Cuadro 2), para los cuales corresponden cuatro espectros de UV básicos; apigenina (UV λ_{max} :238, 270, 330 nm), genisteina (UV λ_{max} : 238, 268, 328 nm), quercetina (UV λ_{max} : ; 238; 256,266 sh, 300 sh, 354 nm) y una flavona sin determinar (UV λ_{max} : 238, 272, 324 nm). Los espectros obtenidos de estos flavonoides se presentan en la Figura 10.

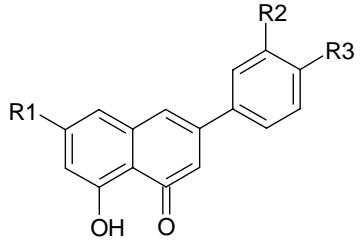
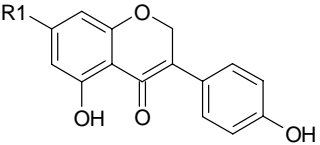
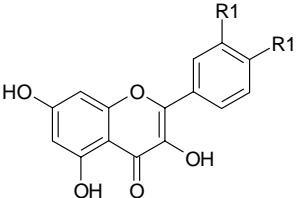
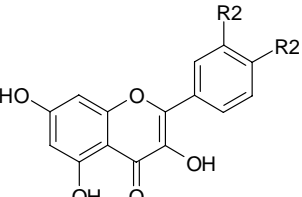
En raíz se encontraron cinco compuestos: apigenina 1 y 2 (AP 1 y AP 2); genisteina 1, 2 y 3 (GE 1, GE 2 y GE 3). Cuatro compuestos fenólicos fueron encontrados en el tallo: flavona 1 y 2 (FLAV 1 y FLAV 2); y, quercetina 3 y 6 (QUER 3 y QUER 6) (Cuadro 2).

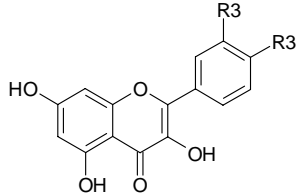
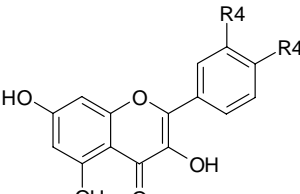
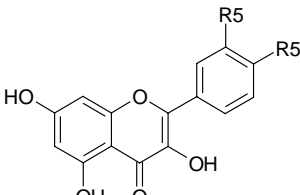
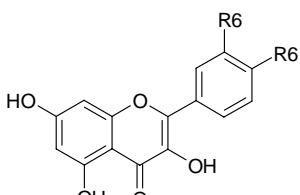
Mientras que en el tejido de hoja se encontró el mayor número de compuestos, al detectar siete de ellos: genisteina 1 y 2 3 (GE 1 y GE 2) y quercetina 1, 2, 3, 4 y 5 (QUER 1, QUER 2, QUER 3, QUER 4 y QUER 5) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Flavonoides de tejidos de *P. laevigata* identificados por HPLC. Las estructuras y las posiciones de lo glúcidos fueron asignadas de acuerdo a lo reportado previamente por Andersen y Markham (2006). *sh: hombro; ** los máximos de absorción de UV de este compuesto se aproxima a varios compuestos reportados.

TEJIDO	COMPUESTO	ABREV.	ESTRUCTURA QUÍMICA	UV λ_{max} (nm)	REFERENCIA
RAIZ	APIGENINA 1	AP 1		238, 270, 330	Lai <i>et al.</i> , 2007 238, 268, 330
RAIZ	APIGENINA 2	AP 2		238, 270, 330	Lai <i>et al.</i> , 2007 238, 268, 330
RAIZ	GENISTEINA 2	GE 2		238, 268, 328	Farag <i>et al.</i> , 2007. 265, 328
RAIZ	GENISTEINA 3	GE 3		238, 268, 328	Farag <i>et al.</i> , 2007. 265, 328

Cuadro 2. Continuación.

TALLO	FLAVONA 1 Cuadro 2. Continuación.	FLAV 2	 <p>The structure shows a flavone core with a hydroxyl group at position 7 and a carbonyl group at position 4. It has a substituent R1 at position 6 and a phenyl ring at position 3 with substituents R2 and R3.</p>	238, 272, 324	Suthanut <i>et al.</i> , 2007 (244, 270, 3249) y (240, 272, 324) Liu <i>et al.</i> , 2007 (273, 328)**
HOJA, TALLO	GENISTEINA 1	GE 1	 <p>The structure shows a genistein core with hydroxyl groups at positions 5 and 7, and a carbonyl group at position 4. It has a substituent R1 at position 6 and a phenyl ring at position 3 with a hydroxyl group at position 4.</p>	238, 268, 328	Farag <i>et al.</i> , 2007. 265, 328
HOJA	QUERCETINA 1	QUER 1	 <p>The structure shows a quercetin core with hydroxyl groups at positions 3, 5, and 7, and a carbonyl group at position 4. It has a substituent R1 at position 6 and a phenyl ring at position 3 with substituents R1 at positions 3 and 4.</p>	256,266 sh, 300 sh, 354	Masa <i>et al.</i> , 200 255.6, 266 sh*, 296 sh*, 354.1
HOJA	QUERCETINA 2	QUER 2	 <p>The structure shows a quercetin core with hydroxyl groups at positions 3, 5, and 7, and a carbonyl group at position 4. It has a substituent R2 at position 6 and a phenyl ring at position 3 with substituents R2 at positions 3 and 4.</p>	256,266 sh, 300 sh, 354	Masa <i>et al.</i> , 200 255.6, 266 sh*, 296 sh*, 354.1

HOJA, TALLO	QUERCETINA 3	QUER 3		256,266 sh, 300 sh, 354	Masa <i>et al.</i> , 200 255.6, 266 sh*, 296 sh*, 354.1
HOJA	QUERCETINA 4	QUER 4		256,266 sh, 300 sh, 354	Masa <i>et al.</i> , 200 255.6, 266 sh*, 296 sh*, 354.1
HOJA	QUERCETINA 5	QUER 5		256,266 sh, 300 sh, 354	Masa <i>et al.</i> , 200 255.6, 266 sh*, 296 sh*, 354.1
TALLO	QUERCETINA 6	QUER 6		256,266 sh, 300 sh, 354	Masa <i>et al.</i> , 200 255.6, 266 sh*, 296 sh*, 354.1

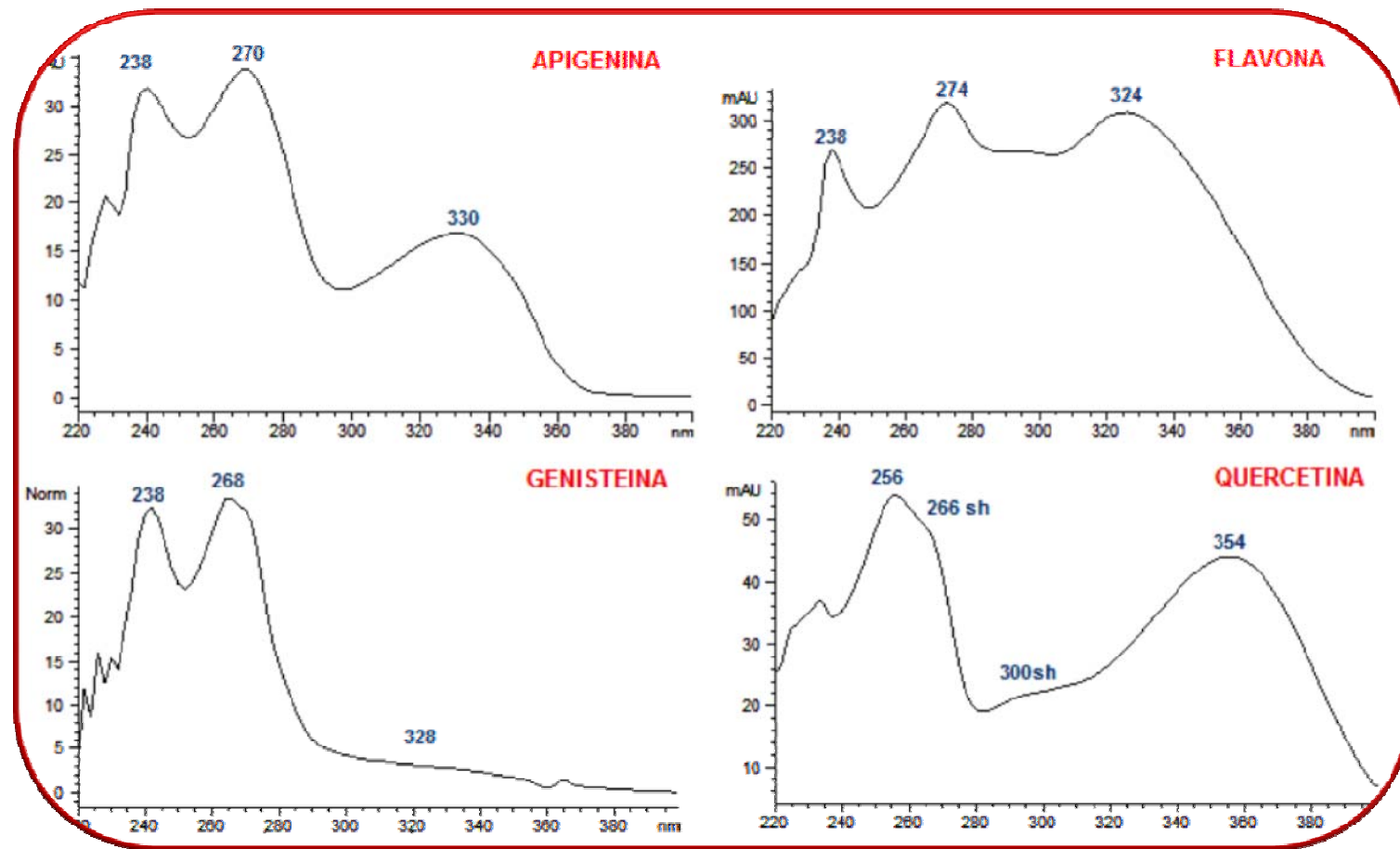


Figura.10. Espectros UV λ_{\max} (nm) de los flavonoides aislados

8.6. Flavonoides con posible función inductora de genes *nod* en extractos de raíz

Se encontraron los mismos flavonoides inductores en los extractos de raíz de las plántulas en los tres tratamientos (control: N= 200 mg/l de solución; deficientes: N= 100 y 50 mg/l de solución); pero, se encontraron en distintas concentraciones sin que se presentaran diferencias significativas.

La apigenina 1 (AP 1), se encontró en las siguientes concentraciones promedio: 260.41, 254.79 y 205.58 μg por cada 100 g de tejido; en N= 200, 100 y 50 mg/l respectivamente (Figura 11A) apareciendo a lo 3.3 minutos en los cromatogramas, ocupando el quinto pico (Figura 11B). Con respecto a la apigenina 2 (AP 2) se encontraron las siguientes concentraciones promedio: 112.09, 83.57 y 119.91 $\mu\text{g}/100$ g. para N=200, 100 y 50 mg/l respectivamente (Figura 11A); en el cromatograma, este compuesto apareció en el sexto pico a los 3.8 minutos (Figura 11B). Por otro lado la genisteina 1 (GE 1), con un tiempo de retención de 4.4 minutos (Figura 11B) y en las concentraciones promedio de: 181.71, 75.62 y 218.48 $\mu\text{g}/100$ grs para N= 200, 100 y 50 mg/l respectivamente (Ilustración 4A). La genisteina 2 (GE 2) se encontró a los 4.7 minutos ocupando el octavo pico en cada cromatograma (Ilustración 4B) y los promedios de concentración por tratamiento (N=200, 100 y 50 mg/l) 143.21, 94.92 y 146.33 $\mu\text{g}/100$ grs (Figura 11A). Finalmente, en el noveno pico a los 5.6 minutos se encontró la genisteina 3 (GE 3) que mostró concentraciones por tratamiento de 91.34, 80.42 y 96.42 para N= 200, 100 y 50 mg/l (Figura 11A).

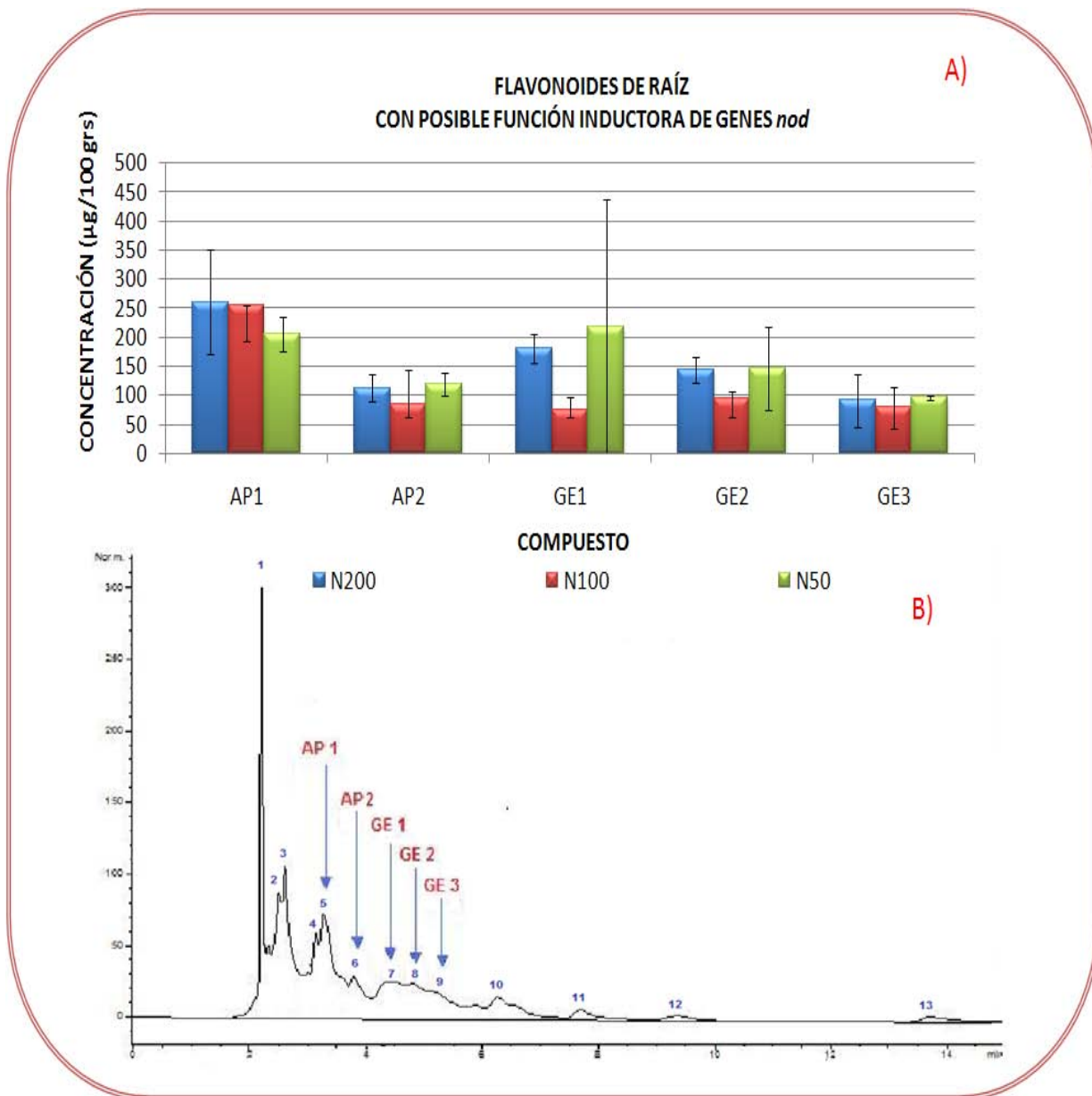


Figura 11. Flavonoides con posible función inductora de genes *nod*, encontrados en extractos de raíz en tratamientos con N= 200, 100 y 50 mg/l. A) Gráfica de promedios de concentración de apigenina 1 y 2 (AP 1 y AP 2); genisteína 1, 2 y 3 (GE 1, GE 2 Y GE 3). B) Cromatograma por HPLC de una muestra de extracto de raíz de *P. laevigata*; pico 6: AP1 tiempo de retención (TR): 3.3 min.; AP 2 TR: 3.8 min.; GE 1 TR: 4.2 min.; GE 2 TR: 4.2 min; GE 3 TR: 5.6 min.

8.7. Flavonoides con posible función inductora de genes *nod* en extractos de tallo

Se identificaron dos flavonoides inductores de genes Nod en los extractos de tallo: quercetina 3 (QUER 3) y quercetina 6 (Quer 6). La primera con un tiempo de retención (TR) de 8.8 minutos (Figura 12B) y con un promedio de concentración de 548.10 $\mu\text{g}/100$ grs en las plántulas bajo tratamiento control (N= 200 mg/l); 54.32 en las plántulas con N= 100 mg/l y las plantas en el tratamiento de mayor deficiencia (N=50 mg/l) tuvieron una concentración promedio de 161.01 (Figura 12A).

Por su parte la quercetina 6 (QUER 6), se presentó a los 14.7 minutos (Figura 12B) con los siguientes promedios de concentración: 119.81 $\mu\text{g}/100$ g para las plántulas con N= 200 mg/l; 41.42 para N= 100 mg/l y 117.54 $\mu\text{g}/100$ g para las plántulas con 50 mg/l (Figura 12A).

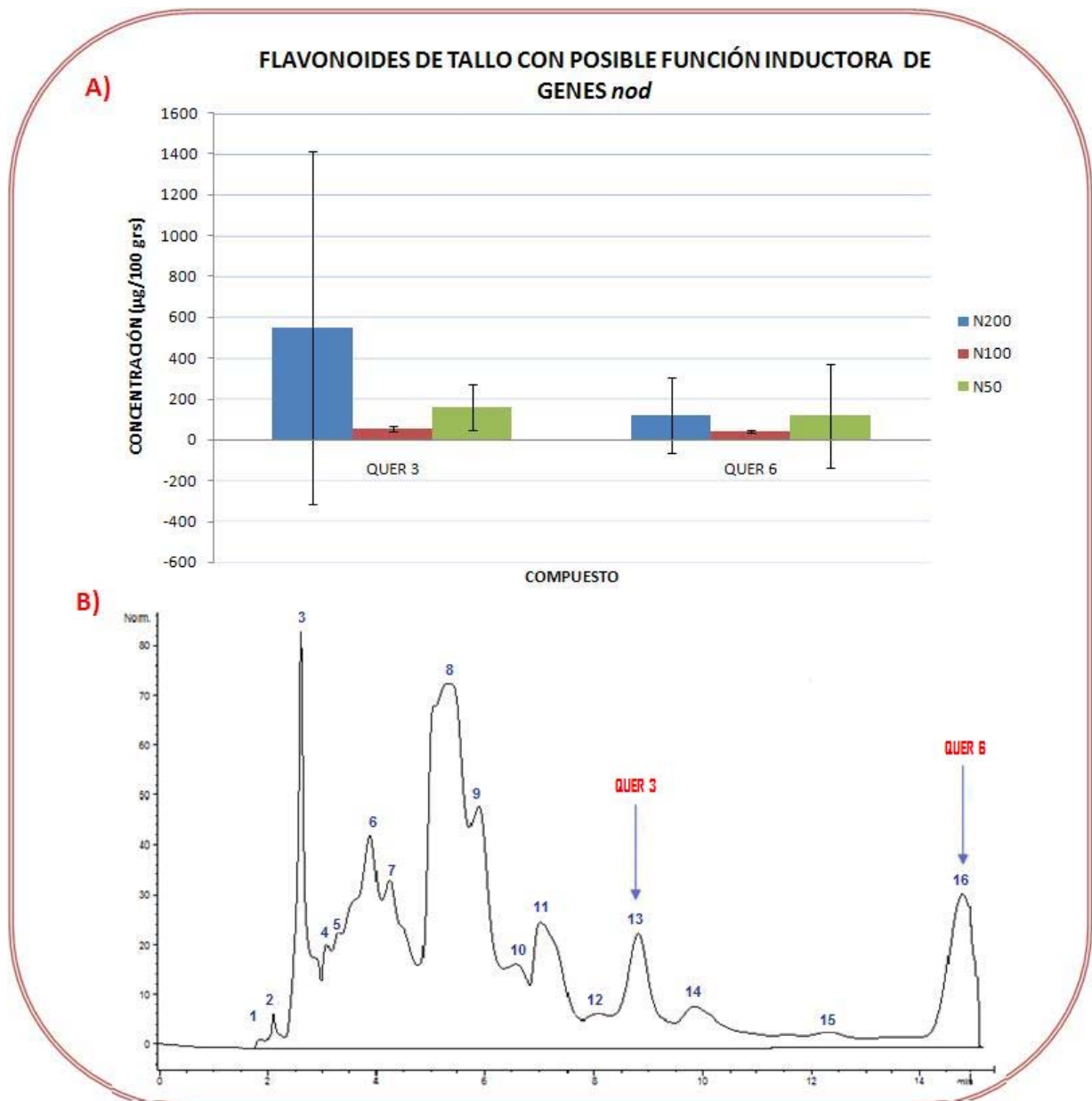


Figura 12. A) Gráficas de promedio de concentración para flavonoides de tallo con posible función inductora de genes *nod*; quercetina 3 (QUER 3) y quercetina 6 (QUER 6). B) Cromatograma de muestra de extracto de tallo, pico 13 tiempo de retención: 5.6 min. correspondiente a GE3; pico 16 tiempo de retención 145.6 min. correspondiente a QUER 3; pico 16 TR 14.7 min. correspondiente a QUER 6.

8.8. Flavonoides con posible función inductora de genes *Nod* en extractos de hojas

Se encontraron siete flavonoides inductores de genes *nod* en los extractos de hojas de *P. laevigata*: genisteina 1 (GE 1); genisteina 2 (GE 2); quercetina 1 (QUER 1); quercetina 2 (QUER 2); quercetina 3 (QUER 3); quercetina 4 (QUER 4); quercetina 5 (QUER 5). Los cuales se presentaron en las muestras de los tres tratamientos, a excepción de GE 1 y QUER 1 que no se encontraron en las muestras de N= 200 mg/l (Figura 13B).

Los tiempos de retención fueron los siguientes: GE 1: 4.4 min.; GE 2: 4.7 min.; QUER 1: 6.0 min.; QUER 2: 7.8 min.; QUER 3: 8.3 min.; QUER 4: 12.8 min y QUER 5: 13.5 min., (Figura 13C)

Los promedios de concentración fueron los siguientes:

	N= 200 mg/l	N= 100 mg/l	N= 50 mg/l $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
GE 1	0 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	2011.13 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	1021.993 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
GE 2	1743.77 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	1957.438 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	1593.559 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
QUER 1	0 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	1506.634 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	1534.456 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
QUER 2	613.61 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	858.8683 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	782.2293 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
QUER 3	641.18 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	1256.155 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	964.9821 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
QUER 4	256.81 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	269.8845 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	296.7838 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$
QUER 5	279.277 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	305.033 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$	327.7537 $\mu\text{g}/100 \text{ grs}$

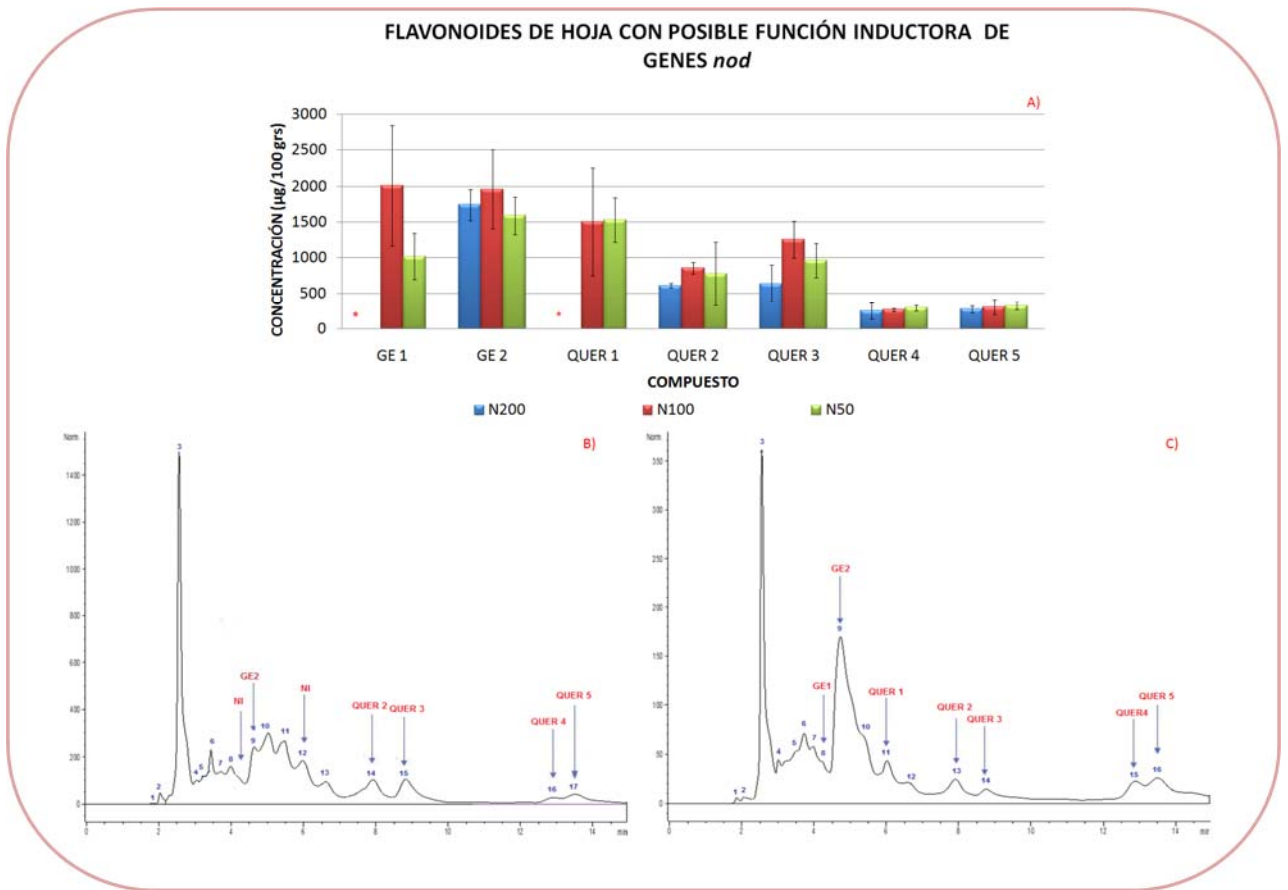


Ilustración 13. A) Concentración de flavonoides por tratamiento (N= 200, 100 y 50); B) Cromatograma de extracto de hoja con 200 mg de N; C) Cromatografía de extracto de hoja con 50 mg de Nitrógeno

9.0. DISCUSIÓN

9.1. Evaluación del crecimiento de las plántulas

En la figura 7a se aprecia que las plantas que estuvieron en tratamiento con menor disponibilidad de nitrógeno presentaron un mayor crecimiento de raíz, esto responde a una estrategia adaptativa, que ya ha sido observada en otras especies del mismo género (Imo y Timmer 1992 a y b; Aiazzi *et al.* 1996, Vilela, *et al.* 2003). las cuales al ser sometidas a condiciones limitantes de nutrientes, presentaron un mayor crecimiento de raíz y una menor proporción vástago-raíz; es decir que el tallo es más corto que la raíz. Esto es porque el incremento en el índice de crecimiento de la raíz da como resultado un mayor rango de absorción en la nueva y más activa superficie radical (Imo y Timmer, 1992a). En cuanto al crecimiento de tallo se observa un comportamiento contrario (figura 7b), esto sucedió ya que bajo estrés de nutrientes, las plantas destinan una mayor cantidad de carbohidratos para la raíz y una menor para el crecimiento aéreo; lo cual puede ser asociado con un ajuste en la planta para compensar la disminución en la disponibilidad de nutrientes en el medio de crecimiento a fin de explotar un mayor volumen de suelo (Imo y Timer, 1992a). Por el contrario, un elevado suministro de nitrógeno estimula la alocaión de carbono recientemente asimilado hacia el vástago y reduce la translocación (Haase *et al.*, 2007).

Aunque se encontraron diferencias significativas en el peso de los tallos de las plántulas en tratamiento con mayor déficit de nitrógeno (50 mg de N/l), las cuales, en promedio pesaron más que las plántulas del tratamiento control (200 mg de N/l), se sabe que a pesar de la alta biomasa que presentan los tallos sometidos a diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes, estos siempre mostraron un contenido nutrimental menor en todos los casos; lo cual, ha sido atribuido a la baja actividad fisiológica de estos órganos vegetales (Imo y Timer, 1992a). En cuanto a los resultados de peso en hojas, concuerdan con lo esperado, ya que, suponemos que las plántulas desviaron recursos hacia la raíz, por lo que el peso y área foliar fueron menores en las plántulas tratadas con menos Nitrógeno (figura 8).

9.2. Evaluación de los parámetros fotosintéticos

Los valores de fotosíntesis obtenidos indican que hasta las 7 semanas (Figura 9) la baja disponibilidad de Nitrógeno no había tenido un efecto significativo sobre el estado fisiológico de las plántulas; esto concuerda con lo encontrado por otros autores en otras especies del género *Prosopis* (*P. chilensis*, *P. alba*, *P. flexuosa*-arborea, *P.*

flexuosa-arbustiva y *P. strombulifera*) las cuales al ser tratadas con diferentes tratamientos en disponibilidad de nitrógeno no mostraron cambios significativos en la fijación de CO₂, transpiración o conductancia estomática. Indicando que estas plantas sólo disminuyen estos valores en condiciones de estrés hídrico, como respuesta de protección al mismo, ya que observaron que bajo una condición de sequía inducida, la apertura estomática se reduce significativamente con la consiguiente disminución de la tasa transpiratoria (Imo y Timer, 1992a y 1992b; Vilela *et al.*, 2003). Previamente Imo y Timer (1992a) encontraron que al inducir estrés hídrico en plántulas de *P. chilensis* con una mala condición nutrimental inicial, éstas no disminuyeron su apertura estomática ni su tasa de transpiración, lo cual indica que un estrés nutrimental prolongado afecta las respuestas fisiológicas en estas plantas. Lo anterior concuerda con los valores fotosintéticos encontrados a las 22 semanas de tratamiento (figura 9), los cuales son comparativamente menores a los previamente registrados, y esto es especialmente evidente en el tratamiento con mayor deficiencia en nitrógeno (N= 50 mg/l), el cual mostró diferencias significativas respecto al otro tratamiento con deficiencias en N (N= 100 mg/l); aunque, el estrés por N no llegó a ser tan severo al grado de inhibir las funciones fotosintéticas en ninguno de los tratamientos.

9.3 Compuestos fenólicos

En resumen, los valores de crecimiento y fotosíntesis indican que no se alcanzó un marcado estrés por falta de nitrógeno en las plántulas tratadas, esto pudo ser la razón por la cual no se encontraron concentraciones detectables de exudados fenólicos en los muestreos hechos con papel filtro, ni en los de percolados. Además, Haase, *et al.* (2007) sugiere que el aumento de exudados fenólicos de raíces de *P. vulgaris* no está relacionada directamente con una estrategia de respuesta adaptativa a la deficiencia de nitrógeno; aunque, Chishaki y Horiguchi (1997) encontraron un aumento en la acumulación intracelular de compuestos fenólicos en varias especies de plantas tratadas con nitrógeno y fósforo limitados.

Al realizar los extractos de los tejidos se encontraron 13 flavonoides endógenos diferentes (Cuadro 2), distribuidos en los diferentes tejidos. El tejido con mayor cantidad de compuestos y concentración de los mismos fue el de las hojas, esto era de esperarse ya que los flavonoides se encuentran principalmente en extractos de pétalos y follaje de arboles (March, *et al.*, 2004).

La apigenina, sólo se encontró en la raíz, observando una ligera tendencia de AP 1 a ser más concentrada en las plántulas tratadas con menor disponibilidad de nitrógeno, esto no ocurrió con el caso de la AP 2 en las cuales el tratamiento con N no parece

tener influencia sobre la concentración de esta. La Apigenina-7-O-glucosidoeriodictiol, fue aislada de exudados de semillas y de raíces de *Pisum sativum* y reportado como inductor de genes *nod* de *R. leguminosarum* *bv. viceae* por Firmien *et al.* (1986)

En el caso de la genisteína, que se encontró en tres formas (GE 1, GE 2; GE 3) fue aislada tanto en raíz como en hoja aunque la GE 3 sólo se encontró en raíz. La concentración de G1 y G 2 fue mayor en todos los casos en los extractos de hojas. En el caso de las genisteínas de raíz (GE 1, GE 2; GE 3) se observó una ligera tendencia a concentrarse más en las plántulas que crecieron con mayor deficiencia de nitrógeno. Este efecto fue más evidente en la G1 de hoja, ya que en las plántulas que crecieron en condiciones óptimas de nitrógeno, no se presentó en el cromatograma el pico correspondiente a GE 1; lo cual, nos indica que la deficiencia de nitrógeno, estimula la síntesis genisteína. La genisteína es un isoflavonoide que ha sido aislado en soya y del cual se ha verificado su función inductora de genes *nod* de *Bradyrhizobium japonicum*, pero que inhibe la expresión de estos mismos genes en *Sinorhizobium meliloti* (Peters, *et al.* 1986); así como en plántulas de *P. vulgaris* (Bolaños-Vásquez y Werner, 1997); donde además se estimuló la exudación de este compuesto al ser tratadas con deficiencia de N nutrimental y una elevada concentración de CO₂ (Haase *et al.* 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que la genisteína exhibe actividad anti micótica contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* así como *Cercospora beticola* y *Monilinia fructicola* (Dakora y Phillips, 1996), razón por la cual han sido calificadas como fitoalexinas (compuestos vegetales con actividad anti patógena). Aunque este compuesto sólo se encontró acumulado en tejidos (raíz y hoja), se sabe que en soya estos compuestos se acumulan como reserva, pero que con el estímulo de factores Nod de *Bradyrhizobium* o de algún patógeno, se desencadenan una serie de reacciones moduladas por acción enzimática, que conducen a una respuesta de interacción positiva, en el primer caso y negativa en el segundo; cuando la actividad enzimática ha sido desencadenada por factores microbianos, ésta puede asociarse con unas vesículas membranosas que se funden en la membrana plasmática y liberan genisteína o gliceolina fuera de las células vegetales (Dakora y Phillips, 1996).

Por su parte, la quercetina fue encontrada en extractos de tallo (QUER 3 y 5) y de hoja (QUER 1, 2, 3, 4 y 5). Es probable que este compuesto se presente en mayor concentración y más sustituyentes para proteger a la planta contra el herbivorismo. La acumulación de QUER 1 (en hoja), parece ser influenciada por la disponibilidad de nitrógeno, ya que en las plántulas en tratamiento control (N=200) no se presentó este compuesto (fig.6); la QUER 2 también tendió a concentrarse más en los tratamientos deficientes, y aunque, la QUER 3 se encontró más concentrada en las hojas de

plántulas con deficiencia, no ocurrió lo mismo con la QUER 3 de tallo donde se observó una tendencia contraria, (aunque la desviación estándar fue muy alta), por lo cual suponemos que la disponibilidad de nitrógeno influye en la acumulación de QUER 3 en hoja pero no en tallo. Estas tendencias parecen concordar con lo encontrado por Gershenzon (1983) el cual observó que una abundancia de N, inhibe generalmente la acumulación fenólica. Por otro lado, QUER 4 Y 5, que sólo se encontraron en hoja, no parecen ser afectadas por la disponibilidad de N, al igual que QUER 6 de tallo. La quercetina, ha sido aislada de exudados de semillas de *Phaseolus vulgaris* e identificada como inductor de genes *nod* de *R. leguminosorum* bv. *phaseoli* y *R. etlii* por Hungría y colaboradores en 1991. Los flavonoides quercetina y luteolina tienen muy definidos efectos promotores en el crecimiento de *R. meliloti* en un medio mínimo, pero los isoflavonoides daidzeina y genisteina dan resultados confusos en estudios similares con *B. japonicum* (Dakora y Phillips, 1996).

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, no es posible establecer una clara asociación entre la deficiencia de nitrógeno y la exudación de flavonoides quimioatrayentes e inductores de genes *nod*; ya que es probable que no se alcanzara un nivel de estrés significativo. Adicional a esto, cabe mencionar que la variabilidad de respuestas observadas en cada individuo tratado fue muy alta, lo cual es evidente en las desviaciones estándar obtenidas en todos los parámetros evaluados, lo que es un comportamiento común de variación en especies de zonas áridas y semiáridas.

10. CONCLUSIONES

- No se encontraron Flavonoides en los exudados de Raíz ni en las muestras de percolados, debido a que no se logró estresar a las plantas tratadas.
- El suministro de nitrógeno tiene efecto inversamente proporcional al crecimiento de raíz.
- El suministro de nitrógeno tiene efecto directamente proporcional en el crecimiento del tallo.
- Los tratamientos no tuvieron efecto sobre el área foliar y la tasa fotosintética.
- Se identificaron 13 flavonoides endógenos en extractos de tejidos, 2 derivados de la apigenina, 2 flavonas, 3 derivados de genisteina y 6 de quercetina.
- En las hojas se identificaron 7 flavonoides, 2 derivados de la genisteina y 5 derivados de la quercetina.
- El suministro de nitrógeno tiene un efecto significativo sobre la acumulación de genisteina y quercetina en la hoja.

11. PERSPECTIVAS

Con base a los resultados y discusión del presente trabajo, se propone:

- Someter a plántulas de *P. laevigata* a tratamientos con menor concentración de nitrógeno para determinar en que punto se alcanza el estrés.
- Para disminuir las variaciones en el análisis estadístico, se recomienda, aumentar la cantidad de replicas.
- Tratar a plántulas de *P. laevigata* con *Rhizobium* además de las deficiencia de nitrógeno, para verificar el efecto de comunicación entre simbioses pues también es posible que no se detectaran las respuestas esperadas en el presente trabajo, debido a que no estaban presentes los simbioses microbianos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Aiazzi M.T., Argiello J.A. y Abril A. 1996. Nodulated and non-nodulated *Prosopis chilensis* (Mel) St. seedlings: economy of carbon and nitrogen. *Forest Ecology and Management*. (89) 25-29.
2. Andersen O M. y Markham K. R. 2006. *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis Group. U. S. 1237 p.
3. Arias T. A. A. 2000. Las plantas de Zaotitlán Salinas, Puebla. Un folleto de divulgación sobre botánica y conservación. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México, D. F. 72 p.
4. Azcon-Bieto J. y Talón M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill/ Intramericana de España. Madrid. 521 p.
5. Bais H. P., Park S. W., Stermitz F. R., Halligan K. M., Vivanco, J. M. 2003. Exudation of fluorescent beta-carbolines from *Oxalis tuberosa* L. roots. *Phytochemistry* 61:539–43.
6. Bais H. P.; Park S. W.; Weir T. L.; Callaway R. M.; Vivanco, J. M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9:26–32.
7. Bais H. P., Weir L. G., Perry S. G., Vivanco J. P. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233–66.
8. Begum A. A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F. 2001. Specific flavonoids induced nod gene expression and preactivated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J Exp Bot.* 52:1537–43.
9. Bertin C., Yang X. H., Weston L. A. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67–83.
10. Bolaños-Vázquez M. C. y Werner D. 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. Etl*, and *R. Leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nod Gene-Inducing Flavonoids in Root Exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 10 (3), 889-897.
11. Brimecombe M. J., De Leij, Frans A. A. M.; Lynch J. M. 2001. Nematode community structure as a sensitive indicator of microbial perturbations induced by a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain. *Biol. Fertil. Soils* 34:270–75.
12. Cabrerizo P. M., González E.M., Aparicio-Trejo P.M., Aresse-Igor C. 2001. Continuos CO₂ enrichment leads to increased nodule biomass, carbon

- availability to nodule and activity of carbon-metabolising enzymes but does not enhance specific nitrogen fixation in pea. *Physiologic plantarum* 113:33-40.
13. Caetano-Anolles G.; Crist-Estes D. K. y Bauer W. D. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavones luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170:3164-3169.
 14. Calderon de R. G. y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Pátzcuaro (Michoacán). 1406 p.
 15. Casas A., Valiente-Banuet A., Viveros, J. L., Caballero, J., Cortes, L., Lira, R. y Rodríguez, I. 2001. Plant resources of the Tehuacan-Cuicatlán Valley, México. *Economic Botany*. 55: 129-166.
 16. Chen H. C., Feng J., Hou B. H., Li F. Q., Li Q., 2005. Hong G. F. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acid Re.* 33:2540–8.
 17. Chizhaki N. y Horiguchi T., 1997. Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* 43, 987-991.
 18. Cooper J. E. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoides during legume root infection. *Adv Bot Res.* 41:1–62.
 19. Cooper J. E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol.* 103:1355–65.
 20. Daniel W. W. 1977. Bioestadística (Base para el Análisis de las Ciencias de la salud). Editorial Limusa, México.
 21. Dakora F. D. y Phillips D. A., 1996. Diverses functions of isoflavonoids en legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexin. *Physiological and molecular Plant Pathology.* 49, 1-20.
 22. Djordjevic, M. A., Redmond, J. W., Batley, M. and Rolfe, B. G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress in *Rhizobium trifolii*. *EMBO J.* 6: 1173-1179.
 23. Dixon R.A. 1999. Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology, and biological functions. In: Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O. (Eds.), *Comprehensive Natural Product Chemistry*, vol. 1. Elsevier, New York, pp. 773–823.
 24. Dixon R. A. 2001. Natural products and disease resistance. *Nature*, 411, 843–847.
 25. Farag M. A., Huhman D. V., Lei Z., Sumner L.W. 2007. Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC–UV–ESI–MS and GC–MS. *Phytochemistry* 68 342–354

26. Franke A. A., Laurie J., Christi J., Arakaki P., Suzanne P., Murphy P. 2004. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food composition and Analysis*. 17, 1–35
27. Gaworzewska E. T. y Carlilie M. J. 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* 128: 789-798.
28. Greenham J. R., Grayer R.J., Harborne J. B., Reynolds V. (2007). Intra- and interspecific variations in vacuolar flavonoids among *Ficus* species from the Budongo Forest, Uganda. *Biochemical Systematics and Ecology* 35 81-90
29. Guedea-Fernández G., Arriaga-Frías A., De la Cruz-Guzmán G. 2001. El Efecto Maceta y el Rizotróf: una Herramienta para la Investigación y docencia. *Revista Chaingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 7 (2): 115-121 p.
30. Guerreiro N., Redmond J. W., Rolfe B. G. y Djordjevic M. A. 1997. New *Rhizobium leguminosarum* Flavonoid-Induced Proteins Revealed by Proteome Analysis of Differentially Displayed Proteins. *The American Phytopathological Society*. 10(4): 506-516.
31. Haase S., Neumann G., Kania A., Kuzyakov Y., Römheld V., Kandeler E., 2007. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology&Biochemistry* 39:2208-2221
32. Harbone J. B. Ed. 1994. *The Flavonoids, Advances in research since 1986*. Chapman & Hall. London. 676 p.
33. Harborne J. B. y Baxter H. (1999). *The Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley, Chichester.
34. Holguin Z. G. 2008. La comunicación entre bacterias y plantas. *Iemcia*. (Abril-Junio)72-78.
35. Hungria M., Joseph C. M. Phillips D. A. 1991. *Rhizobium* and Gene Inducers Exuded Naturali from Roots of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) *Plant Physiology*. 97, 759-764.
36. Hungria M. y Phillips D. A. 1993. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:418–22.
37. Hungria M. y Stacey G. 1997. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Bio/. Biochem.* Vol. 29, No. 5/6, pp. 819-830,

38. Imo M. y Timmer V.R. 1992a. Growth, nutrient allocation and water relations of mesquite (*Prosopis chilensis*) seedlings at differing fertilization schedules. *For. Ecol. Manage.*, 55: 279-294.
39. Imo y Timer V. R. 1992. Nitrogen Uptake of Seedlings at Conventional and Exponential Fertilization schedules. *Soil Soc. Am. J.* 56:927-934.
40. Jones K. M., Kobayashi H., Davies B. W., Taga M. E., Walker G. C. 2007. How symbionts invade plants: the Sinorhizobium- *Medicago* model. *Nature*. 5:619–33.
41. Kapulnik Y., Joseph C. M., Phillips D. A. 1987. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiol.* 84:1193–6.
42. Lin L. Z.; Harnly J. M. 2007. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1084–1096.
43. Lin L. Z., Harnly M. J., Pastor-Corrales M.S., Luthria D. L. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Chemistry* 107 399–410.
44. Liu J. B. C. H. y Yao S. 2007. Simultaneous analysis and identification of main bioactive constituents in extract of *Zizyphus jujuba* var. *sapinosa* (*Zizyphi spinosi* semen) by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection–electrospray mass spectrometry. *Talanta* 71 668–675.
45. López M., Martínez F., Del Valle C., Ortega O., Miró M. 2001 Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines q by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 922 359–363.
46. Maj D, . Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol Res* 2006; (2008), doi:10 1016.
47. Masa A., Vilanova M., Pomar F. 2007. Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1164 291–297.
48. Mathesius U., Schlaman H. R. M., Spaink H. P., Sauter C., Rolfe, B. G., Djordjevic M. A. 1998. Auxin transport inhibition precede root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoid and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14:23–34.
49. Morales Q. L. 1971. Ensayos de introducción de especies forestales en zonas áridas y para conocer la durabilidad de diferentes plásticos con fines de

- reforestación. Tesis. Ing. Agrónomo esp. Bosques, ENA, Chapingo, México. 112 p.
50. Olvera H. M. T. 2006. Evaluación de los reguladores auxínicos AIA, AIB y p-Nitrofenil-Indol-3-Acetato en la Rizogénesis de *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox* y *Mimosa luisana* de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Edo. Méx. 75 p
 51. Orozco V. J. 1996. Efecto de Bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el establecimiento de cultivo *in vitro* de *Prosopis laevigata* H. & B. (Fabaceae) a partir de explantes nodales. Tesis de licenciatura. Biología. UNAM. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Los Reyes Iztacala. Edo. Mex. 52 p.
 52. Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. 2001. The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant interface. Marcel Dekker, inc. New York. 424 p.
 53. Redmond J.W., Batley M., Djordjevic, M.A., Innes R.W., Kuempel, P.L., Rolfe, B.G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. Nature 323:632-635.
 54. Reyes-Quintanar C. K., Ferrera-Cerrato C. K., Alarcón, A., R., y Rodríguez, Z. S. 2000. En: Alarcón, A., R. y Ferrera-Cerrato C. K. (Eds), Ecología, fisiología y biotecnología de la Micorriza arbuscular. Mundi Prensa. México. pp. 56-68
 55. Rincón J. J., Clavero T., Razz R., Pietrosevoli S., Mendez-Castro F., Noguera N. 2000. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). Rev. Fac. Agron. (Luz). 17:342-357.
 56. Rijke de, E., Out, P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C. y Brinkman U. A. Th. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of Chromatography a, 1112, 31-63.
 57. Rodriguez-Zaragoza S., González-Ruiz T. González-Lozano E. Lozada-Rojas A., Mayzlish-Gati E., Steinberg Y. 2008. Vertical Distribution of Microbial Communities Under the canopy of two legume bushes in the Tehuacán Desert, Mexico. European Journal of Soil Biology. 44, 377-380.
 58. Roldán M. M. P. 2004. Patrones demográficos de *Prosopis laevigata* en un ambiente fragmentado del Valle de Zapotitlan Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Edo. Méx. 41 p.

59. Rossen L., Shearman C. A., Johnston A. W. B., Downie J. A. 1985. The nodD gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the the nodABC genes. *EMBO J*;4:3369–73.
60. Rovira A. D. 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* 35:35.
61. Ruiz T. G.; Zaragoza S. R. y Cerrato R. F. 2008. Fertility islands around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlán Salinas, México. *Journal of Arid Environments*.72 (2008) 1202-1212.
62. Rzedowski J. 1988. *Vegetación de México*. México. Limusa. 432 p.
63. Satoshi T. y Ragai K. I. 1995. Prenilate Isoflavonoids-an Update. *Phytochemistry*, Vol. 38, No. 5 pp, 1073-1094
64. Strack, D. V. Wray, en: Harborne, J. B. (Ed.). 1994 . *The Flavonoids*. Chapman & Hall. London.
65. Subramanian S, Stacey G, Yu O. 2006. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant J* 48:261–73.
66. Sutthanut K., Sripanidkulchai B., Yenjai C, Jayda M. 2007. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143 227–233.
67. Uren N. C. 2000. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. In *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil Interface*, ed. R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri. pp. 19–40. New York: Marcel Dekker
68. Vilela A.E., Rennellab M.J. y Ravetta D. A. 2003. Responses of tree-type and shrub-type *Prosopis* (Mimosaceae) taxa to water and nitrogen availabilities. *Forest Ecology and Management* 186 327–33.
69. Villanueva D., J. 1993. Distribución actual y características ecológicas del Mezquite (*Prosopis laevigata*) en el estado de San Luis Potosi. *Boletín divulgativo No. SARH INIFAP*. Coyoacán, México. 36 p.
70. Wasson A. P., Pellerone F. I., Mathesius U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*. 18: 1617–29.
71. STAT. 1998. Win Stat.
72. Zhang F. y Smith D. L. 1995. Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean at suboptimal root zone temperatures. *Plant Physiol*. 108:961–8.

73. Zhang F., y Smith D. L. 1996. Inoculation of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly applied into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season condition. *Plant Soil.* 179:233–41.

ANEXO 1. Esquema y diseño de rizotrones.

Se construyeron 15 rizotrones de acrílico transparente de 6 mm de espesor, las dimensiones fueron las siguientes: ventana móvil frontal y ventana posterior de 40 cm de alto por 15 cm de ancho; ventanas laterales de 40 cm de alto por 10 cm de ancho; área de muestreo de 37 cm de alto por 12 cm de ancho. Para mantener cerrada la ventana móvil, se utilizaron 6 tornillos de 1 ½ pulgadas (2 en cada lado de la ventana móvil) y tuercas mariposa. Para mantener un sello hermético de la ventana móvil, se pegó alrededor del área de muestreo un empaque de hule de ½ pulgada de ancho y 2 mm de espesor, y se colocaron en los tornillos empaque O ring (Figura 14). La construcción se realizó en el Taller de Equipo de Laboratorio de Enseñanza (TELE) con el apoyo del Ing. Armando Pineda Santa María y el técnico Daniel Candarabe Camacho.

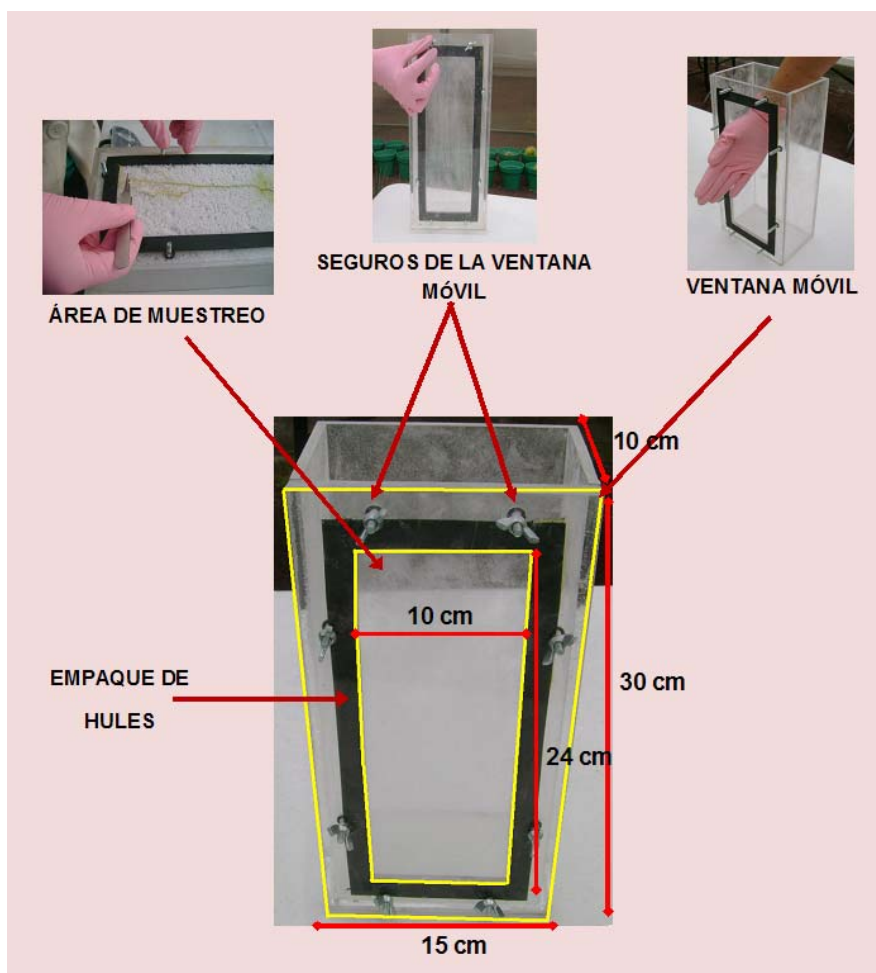


Figura 14. Medidas y especificaciones de Rizotrófono.

ANEXO 2. Resultado de la curva de Fotosíntesis a diferentes valores de PAR

En el laboratorio de Fisiología Vegetal se han realizado otros trabajos con *P. laevigata*, en los cuales se han registrado parámetros fotosintéticos tanto en campo como en laboratorio, para esos trabajos se utilizó el analizador infrarrojo de CO₂ (IRGA), usando un PAR (radiación fotosintéticamente activa) de 1000 $\mu\text{Mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$, por lo que al comienzo de este trabajo, también se utilizó este valor de PAR, pero se obtuvieron valores negativos, por lo que se concluyó que se estaba fotoinhibiendo. Tomando en cuenta lo anterior, se realizó una evaluación utilizando diferentes valores de PAR iniciando en 1000 y disminuyendo 50 unidades (1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250 y 200), encontrando valores a partir de los 500 y hasta los 300. Como se observa en la gráfica, los mejores valores se obtuvieron al calibrar la lámpara del IRGA en 300 $\mu\text{Mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$, ya que se tuvieron los valores más altos de fotosíntesis, 11.0264926; 4.45043231 y 3.30084827 $\mu\text{Mol/m}^2 \text{ s}^{-1}$ para 200, 100 y 50 mg/l respectivamente (Figura 15a) y una menor tasa de CO₂ intracelular, lo cual indica eficiencia en la fijación de CO₂ (Figura 15c); por otro lado se encontraron valores bajos de conductancia estomática (0.01473854, 0.01322675 y 0.00283972 Mol H₂O m² s⁻¹ Figura 15b) y transpiración (0.60470542, 0.50565865 y 0.06019718 mmol H₂O m² s⁻¹ Figura 15d) lo cual nos indicó que en estas condiciones hay poca pérdida de humedad a través de los estomas.

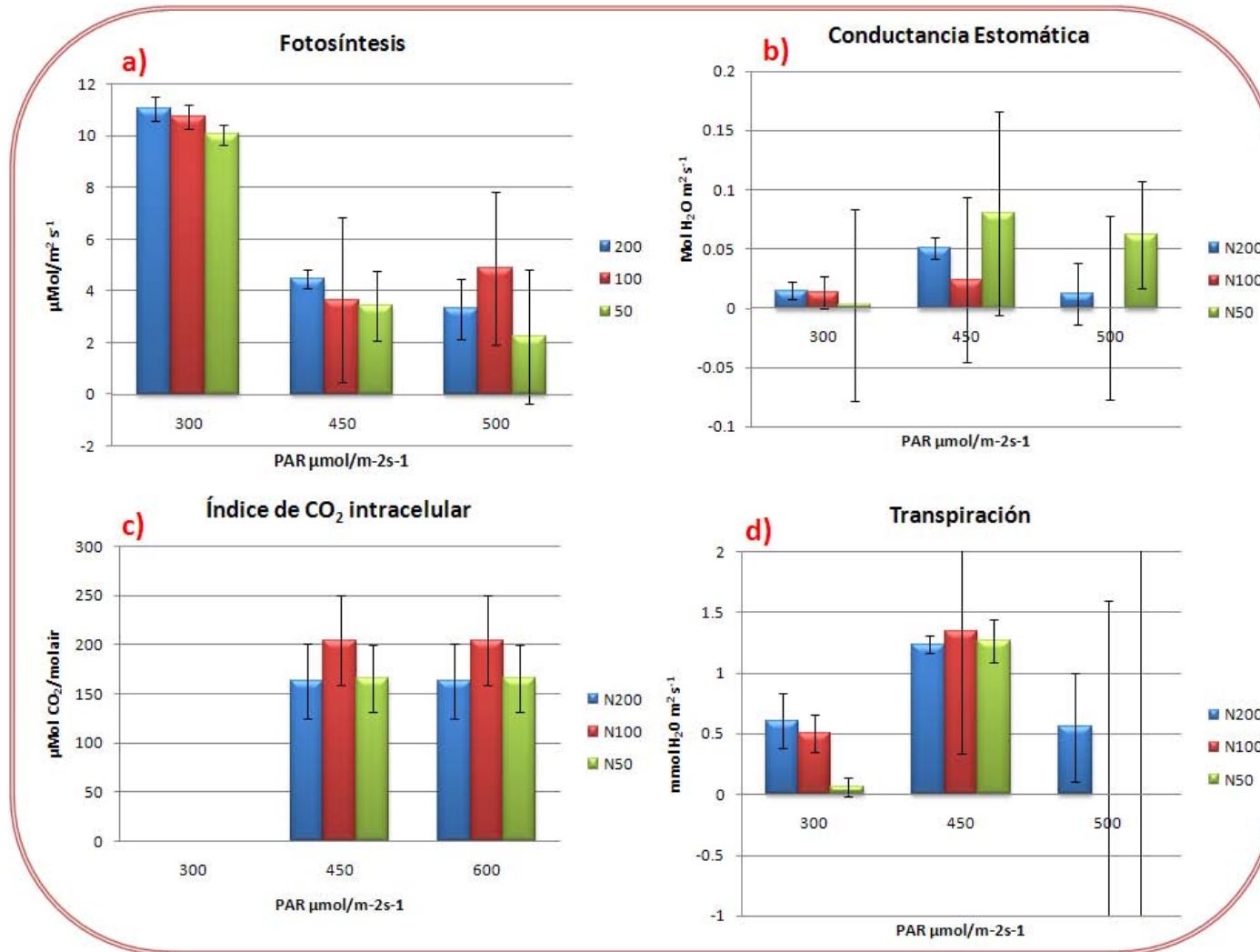


Figura 15. a) Valores de fotosíntesis por tratamiento y con diferentes valores de PAR; b) Valores de Conductancia estomática por tratamiento y con diferentes valores de PAR; c) Concentración de CO_2 intracelular por tratamiento y con diferentes valores de PAR; d) Valores de transpiración por tratamiento y con diferentes valores de PAR

ANEXO 3. Resultados del estudio preliminar

Para este diseño se cultivaron plántulas de *P. laevigata* en rizotrones, utilizando agrolita como sustrato y regadas con solución nutritiva Hoagland por 7 semanas. Semanalmente se midió la raíz y el tallo obteniendo las curvas respectivas. Se observó que a partir de la semana 6 los valores son mayores, por lo tanto se consideró que pasado ese tiempo, las plántulas habían pasado una primera etapa de establecimiento y por tanto aumentaron su Índice de crecimiento.

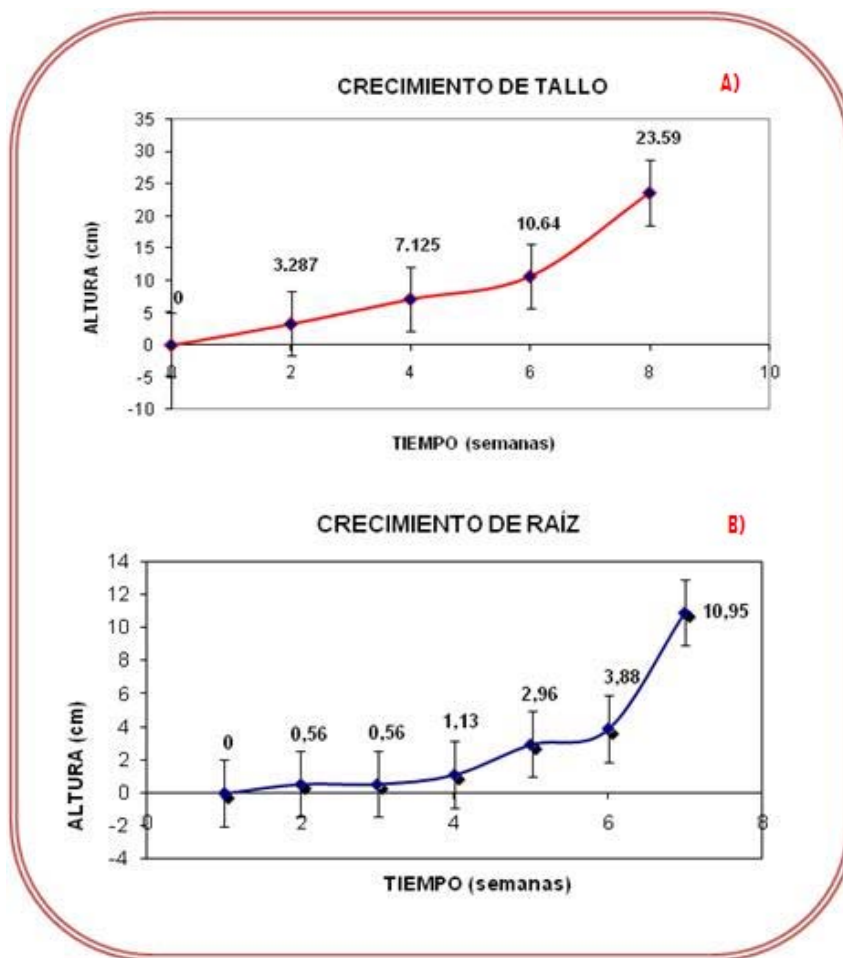


Figura 16. A) Índice de crecimiento de tallo de *P. laevigata* hasta las 8 semanas de edad; B) Índice de crecimiento de raíces de de *P. laevigata* hasta las 8 semanas.

ANEXO 4. Muestreo de exudados de raíz en papel filtro Watman

Este muestreo se realizó en todas las plántulas después de 7 semanas de tratamiento, para esto se retiró la ventana móvil del rizotrón (1) con unas pinzas finas se tomó la parte final de la raíz (2) y se le colocó el papel filtro watman número 541 procurando que éste cubriera la zona apical tanto de la raíz principal como la de las raíces secundarias (3), y se fijó a la raíz utilizando agujas del número 15 (4); el rizotrón se cerró y se dejó así por tres horas, transcurrido este tiempo el papel filtro se retiró de la raíz (5) y se sumergió en matraces Erlenmeyer que contenían 5 ml de una solución preparada con metanol y acetato de etilo en una proporción 1:1 (6), los 15 matraces con los filtros y la solución se colocaron en agitación constante a velocidad 30 rpm por 3 horas (7). Transcurrido este tiempo se retiraron los filtros de los matraces (ver Figura 17) y el solvente se evaporó a sequedad utilizando aire comprimido. El residuo se resuspendió en 1 ml de metanol y se almacenó a 4° C para su posterior análisis por HPLC.

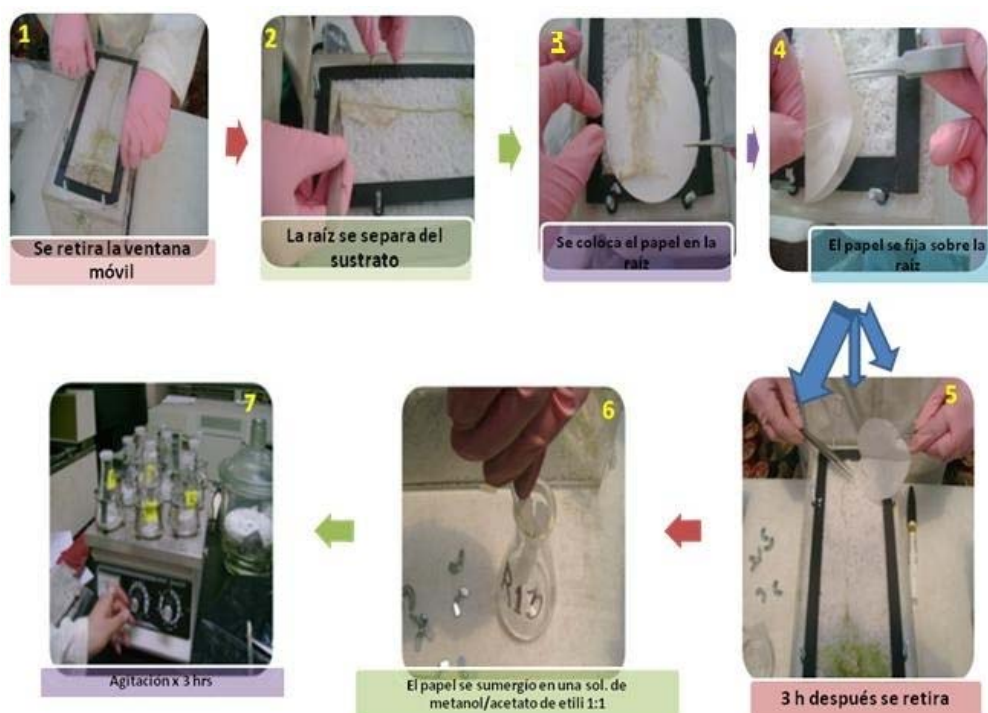


Figura 17. Pasos del muestreo de exudados usando papel filtro Watman.

ANEXO 5. Muestreo de percolados

A las 8 semanas de tratamiento, se realizó el muestreo en cada rizotrán, colectando 5 mililitros de los percolados que se acumulan en el fondo de cada rizotrán. Para esto se retiró la ventana móvil y con micro pipeta de 1000 μ l se tomaron las muestras hasta acumular en un tubo de ensayo el volumen deseado (aprox. 5 ml). Los 15 tubos de ensayo con las muestras de percolados, se transportaron al laboratorio, donde se evaporaron a sequedad utilizando aire comprimido (Figura 18). Posteriormente se resuspendió en 1 ml de metanol para ser analizado por HPLC.



Figura 18. Recolecta de percolados en rizotrones.