



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**KAREL ROMERO MUÑOZ**

**EVALUACION DE 2 ANALOGOS DE BRASINOESTEROIDES A NIVEL DE  
INVERNADERO EN UNA VARIEDAD DE FRIJOL NEGRO (*Phaseolus vulgaris*).**

**DIRECTORES:**

**DRA. MARICELA RODRÍGUEZ ACOSTA  
DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ**

**ABRIL 2015**

## INDICE GENERAL.

---

Contenido	
Capítulo	Pág.
Índice general.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de gráficas.....	VI
Índice de tablas.....	VII
Resumen.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
<b>I</b> Introducción.....	1
<b>II</b> Marco teórico.....	4
II.1 Hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.....	4
II.2 Brasinoesteroides.....	6
II.2.1 Generalidades de los brasinoesteroides.....	6
II.2.2 Descubrimiento de los brasinoesteroides.....	8
II.2.3 Localización de los brasinoesteroides.....	9
II.2.4 Regulación y expresión génica de los brasinoesteroides.....	10
II.2.5 Efectos fisiológicos de los brasinoesteroides en los cultivos.....	11
II.3 Análogos de brasinoesteroides.....	13
II.3.1 Aplicación de análogos de brasinoesteroides (aBS)...	14

II.3.2	Interacción con otras hormonas vegetales.....	14
II.3.3	Bioensayos.....	15
II.4	Generalidades del frijol.....	16
II.4.1	Composición química.....	17
II.4.2	Clasificación taxonómica.....	17
II.4.3	Descripción morfológica.....	18
<b>III</b>	Antecedentes.....	21
III.1	Evaluaciones de análogos de brasinoesteroides realizadas por nuestro grupo de trabajo.....	21
<b>IV</b>	Justificación.....	24
<b>V</b>	Hipótesis.....	25
<b>VI</b>	Objetivo general.....	26
<b>VII</b>	Objetivos particulares.....	26
<b>VIII</b>	Desarrollo experimental.....	27
VIII.1	Materiales y métodos.....	27
VIII.1.1	Material biológico.....	27
VIII.1.2	Análogos de brasinoesteroides.....	28
VIII.1.2.1	Especificaciones químicas.....	28
VIII.1.2.2	Preparación de soluciones y concentraciones de aBs.....	28
VIII.2	Diseño experimental.....	30
<b>IX</b>	Metodología.....	31

IX.1 Homogenización de las semillas.....	31
IX .2 Desinfección de las semillas.....	31
IX.3 Preparación de sustrato.....	31
IX.4 Método de aplicación de los aBS al cultivo de frijol.....	32
IX.5 Siembra.....	32
IX.6 Riegos.....	33
IX.7 Fertilización.....	33
IX. 8 Evaluación del efecto de los aBS en el cultivo de frijol.....	33
<b>X</b> Diagrama de trabajo.....	35
<b>XI</b> Análisis estadístico de resultados.....	37
<b>XII</b> Resultados.....	38
XII.1 Altura a los 40 DDS.....	38
XII.2 Área foliar.....	39
XII.3 Día de inicio de floración.....	41
XII.4 Numero de vainas.....	42
XII.5 Gramos de frijol por planta.....	43
XII.6 Numero de frijoles por planta.....	45
XII.7 Longitud de vainas.....	46
XII.8 Altura final.....	48
XII.9 Peso seco de plantas.....	49

XII.10	Peso seco de raíces.....	51
XII.11	Longitud de raíces.....	52
XII.12	Biomasa.....	52
<b>XIII</b>	Discusión de resultados.....	54
<b>XIV</b>	Conclusión.....	56
<b>XV</b>	Bibliografía.....	58
<b>XVI</b>	Anexos.....	63
	Anexo A. Preparación de concentraciones de aBS.....	63
	Anexo B. Lista de material, equipo y reactivos utilizados..	64
	Anexo C. Preparación de sustrato y método de siembra..	65
	Anexo D. Método de imbibición de las semillas.....	66
	Anexo E. Resultados de longitud de raíces.....	67
	Anexo F. Fotografías del experimento.....	68

## INDICE DE FIGURAS.

---

<b>Figura 1</b>	Funciones químicas presentes en la brasinólida.....	3
<b>Figura 2</b>	Primeros brasinoesteroides caracterizados.....	7
<b>Figura 3</b>	Estructura de un cloroplasto .....	9
<b>Figura 4</b>	Expresión génica del brasinólido.....	11
<b>Figura 5</b>	Estructura de la semilla de frijol.....	20
<b>Figura 6</b>	Frijol negro.....	27

## INDICE DE TABLAS.

---

<b>Tabla 1</b>	Bioensayos más utilizados en la evaluación de los aBS.....	15
<b>Tabla 2</b>	Concentraciones de aBs evaluadas en este experimento.....	22
<b>Tabla 3</b>	Altura de la planta a los 40 DDS .....	38
<b>Tabla 4</b>	Área foliar a los 45 DDS.....	39
<b>Tabla 5</b>	Días a floración.....	41
<b>Tabla 6</b>	Número de vainas.....	42
<b>Tabla 7</b>	Cosecha en gramos/planta.....	44
<b>Tabla 8</b>	Número de frijoles por planta.....	45
<b>Tabla 9</b>	Longitud de vainas.....	47
<b>Tabla 10</b>	Altura final.....	48
<b>Tabla 11</b>	Pesos seco de plantas.....	49
<b>Tabla 12</b>	Peso seco de raíces.....	51
<b>Tabla 13</b>	Biomasa.....	52

## INDICE DE GRAFICAS.

---

<b>Grafica 1</b>	Altura a los 40 DDS.....	38
<b>Grafica 2</b>	Área foliar.....	40
<b>Grafica 3</b>	Días a floración.....	41
<b>Grafica 4</b>	Número de vainas.....	43
<b>Grafica 5</b>	Peso de cosecha.....	44
<b>Grafica 6</b>	Numero de frijoles por planta.....	46
<b>Grafica 7</b>	Longitud de vainas.....	47
<b>Grafica 8</b>	Altura final.....	48
<b>Grafica 9</b>	Peso seco de planta.....	50
<b>Grafica 10</b>	Peso seco de raices.....	51
<b>Grafica 11</b>	Biomasa.....	53



## RESUMEN

---

Incrementar la producción agrícola es urgente y necesaria para alimentar a la creciente población mexicana; particularmente en lo que se refiere a los cultivos básicos. Para los agricultores mexicanos uno de los principales objetivos a la hora actual es tener calidad en el cultivo, producto y buen rendimiento, para lograrlo requiere de la aplicación de nuevas técnicas agrícolas, que no dañen al medio ambiente.

La producción tanto de frijol como de otros productos agrícolas depende de un buen desarrollo vegetal, mismo que se encuentra regulado por la acción de fitohormonas, que activan o reprimen determinados procesos fisiológicos. Entre estos compuestos, los brasinoesteroides existentes en plantas que han mostrado ayudan a soportar el estrés de las mismas bajo condiciones adversas, además de incrementar el rendimiento del cultivo; por ello, estos compuestos están teniendo hoy día una gran aplicación en la producción agrícola (Núñez y Mazorra, 2001). Es por ello que después del descubrimiento de la brasinólida se han sintetizado un gran número de análogos (aBS) con el objetivo de estudiar su relación estructura – actividad.

Los análogos de brasinoesteroides utilizados en este trabajo de investigación han sido evaluados anteriormente por nuestro equipo de trabajo y se han seleccionados de entre varios de ellos debido a que demostraron tener mayor actividad biológica tanto a nivel de bioensayo del ángulo de inclinación de láminas de arroz, como a nivel de invernadero. Las concentraciones utilizadas han demostrado ser más efectivas y constantes en diferentes variedades de arroz y frijol a nivel de invernadero. En este trabajo se exponen los resultados de la aplicación de aBS. Estos fueron aplicados mediante tres diferentes tratamientos para identificar principalmente cuál de ellos incrementa el rendimiento de cosecha en mayor proporción a nivel de invernadero, los tratamientos fueron: 1. Únicamente imbibición de la semilla, 2. Imbibición de la semilla y aspersión en la etapa vegetativa (20 DDS) y 3. Imbibición de la semilla, aspersión vegetativa (20DDS) y aspersión al inicio de la floración (70 DDS).

Los resultados de este experimento demuestran que el incremento del rendimiento de cosecha y biomasa sí dependen del momento en que el aBs es aplicado, además de que el estímulo de crecimiento no se presenta de manera homogénea en la planta y en la cosecha. Se encontró que los mejores resultados para incrementar el rendimiento de cosecha se presenta con el aBs4 bajo el tratamiento T1 y con el aBs18 bajo el tratamiento T2.

## **Abreviaturas.**

---

DDS. Días después de la siembra.

aBS. Análogos de brasinoesteroides.

BS. Brasinoesteroides.

## I. INTRODUCCION.

---

En el período 2010-2012 se calculó que el número de personas sub-nutridas en el mundo se situó en unos 870 millones. Esta cifra representa el 12,5 % de la población mundial, o sea, una de cada ocho personas. La gran mayoría de estas personas (852 millones) vive en países en desarrollo, donde la prevalencia de la subnutrición oscila en el 14,9 % de la población. Según las cifras actuales, se estima que el número de personas subnutridas en el mundo ha disminuido notablemente. La mayoría de los progresos contra el hambre, sin embargo, se lograron hasta 2007-2008, y desde entonces los avances a nivel mundial en la reducción se han disminuido o estabilizado (FAO 2012).

El crecimiento agrícola es particularmente eficaz para reducir el hambre y la malnutrición, la mayoría de los pobres extremos dependen de la agricultura y las actividades conexas para una parte significativa de sus medios de vida. El crecimiento agrícola, junto con la participación de los pequeños agricultores, puede ser más eficaz para reducir la pobreza extrema y el hambre, que permita aumentar los ingresos de los trabajadores y generar empleo para los pobres (FAO 2012).

Para los agricultores mexicanos uno de los principales objetivos es tener calidad en el cultivo, producto y rendimiento, y para lograrlo requiere de nuevas técnicas agrícolas, preferentemente, que no dañen al medio ambiente.

Actualmente el campo mexicano enfrenta varios retos que debe urgentemente remediar; entre éstos se pueden mencionar: el cambio climático, la erosión de los suelos y la ausencia de política práctica gubernamental para atender a corto plazo la falta de agua. A consecuencia de lo anterior se ha producido una baja en la producción agrícola y el empobrecimiento de los suelos que ha llevado a casos catastróficos en los cultivos de maíz, frijol y chile, que son los principales alimentos para la dieta tradicional del campesino. No es fácil prever

que éstos se puedan sustituir por uno que soporte mejor las condiciones adversas y les asegure una mejor cosecha. Una opción a la que se enfrentan los campesinos mexicanos es la de emigrar y abandonar sus tierras. La ausencia de lineamientos claros para mejorar el aseguramiento de su autosuficiencia alimentaria de México es obvia y producto de ello es la constante dependencia del extranjero al importar granos básicos en proporciones crecientes y precios ascendentes (FAO, 2009).

Como consecuencia encontramos que la producción de frijol ha variado mucho en los últimos diez años, por ejemplo mientras que en 2002 se obtuvieron 1.5 millones de toneladas, tres años después, el volumen de producción se redujo 47%, a 827 mil toneladas.

La importancia recae en que el frijol es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para ese sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con algún otro. Es uno de los cultivos de gran importancia, por ser la leguminosa más cultivada a nivel mundial y en México se ubica como la segunda actividad agrícola más importante después del maíz. Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) muestran que para el año 2008 la superficie sembrada de este cultivo en México fue de 1,626,021 ha.

La producción tanto de frijol como de otros productos agrícolas se basa en el desarrollo vegetal y se encuentra regulado por la acción de fitohormonas, que activan o reprimen determinados procesos fisiológicos, interactuando entre sí. Dentro de este contexto, los brasinoesteroides existentes en plantas han mostrado que ayudan a soportar el estrés de las mismas bajo condiciones adversas; por ello, estos compuestos están teniendo hoy día una gran aplicación en la producción agrícola (Núñez y Mazorra, 2001).

Se ha observado una amplia variedad de respuestas fisiológicas con el empleo de estos compuestos, incluyendo los efectos sobre la elongación, división celular, el desarrollo vascular, reproductivo y la modulación del estrés (Costales *et*

*al.*, 2008). Los BS han sido encontrados en casi todos los órganos de un gran número de diferentes familias del reino vegetal, en concentraciones muy bajas, de nanogramos por planta, por ello su extracción de fuentes naturales implica elevados costos y complejas técnicas, costos que no están al alcance de muchos agricultores, lo que provocó que se opinara que estos compuestos tendrían poca aplicabilidad. Este problema fue resuelto con la obtención de los aBS, los cuales resultaron más económicos y con efectos equiparables con los naturales (Arrieta L., 2011).

Los BS son esteroides colestánicos, campestánicos, estigmastánicos, polihidroxilados; por su modo de acción se consideran actualmente la sexta clase de hormonas vegetales (Teixeira y Günter, 2002). Dado que los BS son de origen natural y se utilizan a muy bajas concentraciones, tienen una gran importancia ecológica ya que no producen daños fisiológicos sobre el material vegetal ni son dañinos para la salud (Pérez *et al.*, 2002).

Los BS y sus aBS son considerados hormonas antiestrés, debido al papel protector que ejercen sobre los cultivos sometidos a diferentes estrés, como la deficiencia hídrica, las altas temperaturas, salinidad y acumulación de metales pesados, además de promover el crecimiento e incrementar la biomasa en los vegetales también influyen en otros procesos de desarrollo como la germinación de la semilla, rizogénesis, floración, senescencia, abscisión y maduración (Núñez *et al.*, 2007).

Es por ello que después del descubrimiento de la brasinólida se han sintetizado un gran número de aBS con el objetivo de estudiar su relación estructura–actividad. Actualmente se conocen alrededor de 60 sustancias consideradas como brasinoesteroides naturales y se tiene a disposición varias centenas de análogos (Ram *et al.* 2002).

Los análogos de brasinoesteroides utilizados en este trabajo de investigación han sido evaluados anteriormente por nuestro equipo de trabajo y se han seleccionados de entre varios de ellos debido a que demostraron tener mayor

actividad biológica tanto a nivel de bioensayo como a nivel de invernadero, las concentraciones utilizadas han demostrado ser más efectivas y constantes en diferentes variedades de arroz utilizadas en la prueba de inclinación del ángulo de la lámina de arroz y en frijol a nivel de invernadero. En este trabajo fueron aplicados por tres diferentes tratamientos para identificar principalmente cuál de ellos incrementa el porcentaje de cosecha en mayor proporción a nivel de invernadero, los tratamientos fueron: 1.Únicamente imbibición de la semilla, 2.Imbibicion de la semilla y aspersion en la etapa vegetativa (20 DDS) y 3. Imbibición de la semilla, aspersion vegetativa (20DDS) y aspersion al inicio de la floración (70 DDS).

## **II. MARCO TEORICO.**

---

### II.1 Hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.

Las funciones de regulación permiten a los seres vivos ajustar su funcionamiento a las condiciones ambientales y a su propia condición fisiológica, en los animales, esto ocurre gracias a la actividad del sistema neuroendocrino. Como es bien sabido, las plantas carecen de sistema nervioso, a pesar de lo cual consiguen mantener una respuesta coordinada a las condiciones que les afectan. Los mecanismos que suelen utilizar los vegetales suelen ser cambios en su crecimiento (puede activarse o detenerse, en toda la planta o en ciertas estructuras, o incluso en ciertas zonas de una misma estructura) o procesos de diferenciación que dan lugar a la aparición de nuevas estructuras o a la maduración de otras. El mecanismo fundamental que las plantas utilizan para regular el desarrollo de estos procesos es la producción y secreción de sustancias químicas que actúan sobre tejidos y órganos diana y que, por similitud con los animales, reciben el nombre de hormonas vegetales (Alda 2011).

Para diferenciarlos de las hormonas vegetales de origen natural, los compuestos que producen efectos fisiológicos pero que son de origen sintético se denominan “reguladores del crecimiento vegetal” (Sáenz *et al.*, 2006).

Se reconocen en la actualidad por diferentes autores a los brasinoesteroides como una clase importante de reguladores de crecimiento de las plantas, junto a las hormonas clásicas, como las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Izquierdo 2011).

En general, las hormonas vegetales desempeñan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de los vegetales.

Según Francisco Luis Alda (2011) existen otros 4 grupos hormonales que pueden actuar como reguladores:

1. Los jasmonatos, inicialmente aislados y reconocidos como hormonas inhibitoras en 1971, ya que inhiben la germinación y el crecimiento de las semillas y la elongación de las raíces. En el mismo sentido, promueven la degradación de la clorofila, la senescencia y abscisión de las hojas y la síntesis de etileno además de provocar el cierre de estomas en condiciones adversas. Por otra parte, también mejoran la capacidad de la planta de resistir a los patógenos. Son derivados de ácidos grasos y generalmente utilizados en la industria cosmética (aceites esenciales de *Jasminum grandiflorum*). Se sintetizan a partir del ácido  $\alpha$ -linolénico, encontrándose presentes en todos los órganos de las plantas.
2. El ácido salicílico, que induce la floración e incrementa la resistencia a patógenos.
3. Las poliaminas (putrescina, cadaverina), presentes en células vegetales, animales y bacterias, promueven la formación de tubérculos, ejercen influencia en la resistencia y desarrollo floral, estimulan la senescencia en hojas cortadas, inducen la división celular e incrementan la tolerancia al estrés.

4. A todas estas sustancias reguladoras también hay que agregar a los brasinoesteroides los cuales favorecen el crecimiento de los tubos polínicos, la germinación, el desenrollamiento de las hojas, el crecimiento del tallo (elongación y división celular) y la diferenciación del xilema, al tiempo que inhiben el crecimiento de las raíces y retardan la abscisión de las hojas (Alda, 2011).

## **II.2 BRASINOESTEROIDES (BS)**

### **II.2.1 Generalidades de los brasinoesteroides**

El desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de fitohormonas, que activan o reprimen determinados procesos fisiológicos, interactuando entre sí (Costales *et al.*, 2008).

Las plantas poseen la capacidad de sintetizar una gran variedad de esteroides con una función hormonal similar a la que ocurre en animales. Varios son los esteroides de origen vegetal que han sido identificados, pero solamente una clase de ellos, los llamados brasinoesteroides, tienen una amplia distribución en el reino vegetal ya que han sido encontrados en todos los órganos de un gran número de representantes de diferentes familias del reino vegetal marino y terrestre (Malíková *et al.*, 2008).

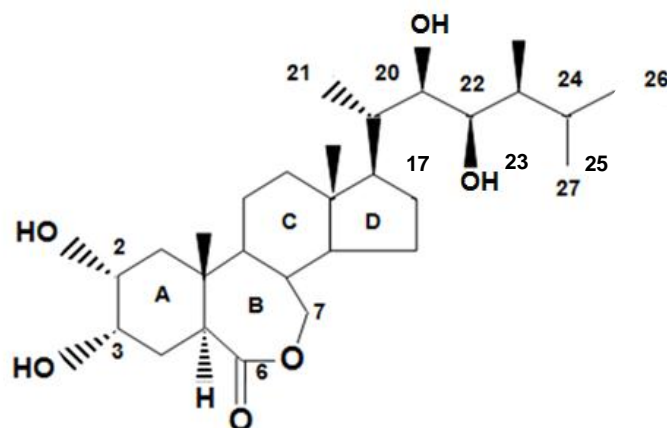
Este grupo de esteroides de las plantas incluye poco más de 70 compuestos que parecen estar distribuidos ampliamente en el reino vegetal. Se les ha detectado y aislado de semillas, frutos, hojas, agallas y el polen. Están implicados en la regulación de diversos procesos, incluyendo la foto-morfogénesis y la expansión de células de una pared celular potencialmente limitante de crecimiento (Malíková *et al.*, 2008).

Los BS son una familia de compuestos naturales que poseen una fuerte actividad promotora del crecimiento vegetal, con estructura esteroideal y son



derivados polihidroxilados del 5 $\alpha$ -colestano y pueden presentar desde veintisiete hasta veintinueve átomos de carbono (Figura 1). Su actividad biológica está relacionada con la aceleración del crecimiento de las plantas y en el incremento del rendimiento y la calidad de las cosechas (Izquierdo, 2011).

La gran importancia de los BS puede valorarse del hecho de que a pesar de estar presentes en muy bajas concentraciones promueven fuertemente la elongación, la división celular (Acosta, 2005), aumento de biomasa, y la curvatura del entrenudo tratado: estas alteraciones morfológicas son dependiente de la concentración (Teixeira y Günter, 2002). Por su modo de acción, se consideran actualmente la sexta clase de hormonas vegetales (Costales *et al.*, 2008). También sugieren un papel en la diferenciación vascular, la senectud, la fertilidad, la morfología de las hojas y de la regulación luz-oscuridad implicada en el desarrollo de la planta (Clouse, 2001).



**Figura 1. Funciones químicas presentes en la brasinólida.** Los más importantes están ubicados en los anillos A, B y en la cadena lateral (Back y Pharis, 2003).

En diferentes cultivos de importancia económica los BS se caracterizan por estimular el crecimiento vegetal, aumentar el rendimiento de la producción de biomasa y acelerar la maduración de frutos. Además fortalecen la resistencia de las plantas a las plagas y a factores de estrés abiótico como la salinidad, la sequía y los cambios bruscos de temperatura, así como a agentes químicos agresivos

como plaguicidas y herbicidas, por lo que son considerados hormonas anti-estrés por su papel protector (Salgado *et al.*, 2008). Además, muestran una inusual actividad promotora del crecimiento cuando son aplicados exógenamente.

Una evidencia muestra que los BS estimulan la producción de una cinasa dependiente de ciclina y de la ciclina D; ambas enzimas forman parte de un complejo proteico que activa la división celular. De esta manera se sugiere que éste es otro mecanismo por el que los brasinoesteroides inducen el crecimiento de los tejidos vegetales (Sáenz *et al.*, 2006).

### **II.2.2 Descubrimiento de los brasinoesteroides.**

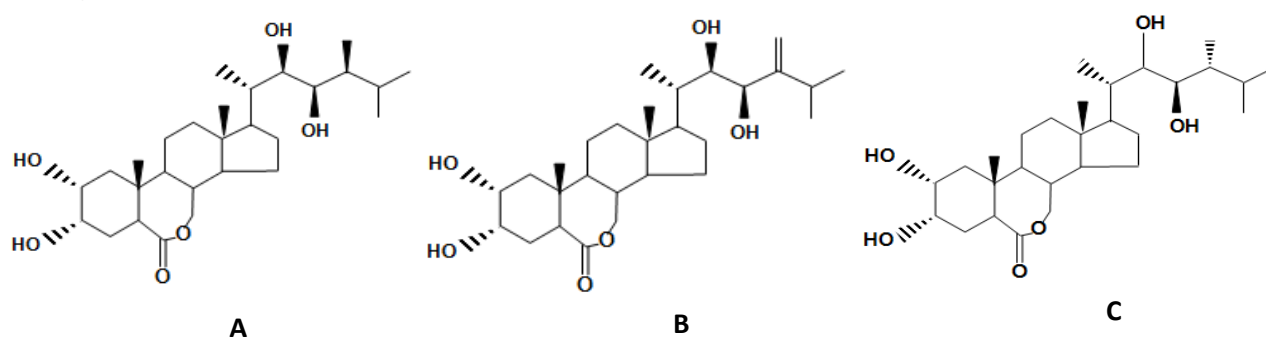
En 1968, Marumo y colaboradores observaron que tres fracciones de un extracto metanólico de una planta conocida en Japón como "Isunoki" (*Distylium racemosum*), presentaban una inusual actividad promotora del crecimiento vegetal (Salgado *et al.*, 2008).

Posteriormente en 1970, Mitchell y colaboradores reportaron que un extracto lipídico obtenido del polen del nabo (*Brassica napus*) mostraba también una sorprendente actividad estimuladora del crecimiento vegetal en hipocotilos de frijol. Estudios espectroscópicos y de difracción de rayos-X revelaron la estructura del compuesto responsable de este efecto, como la (22*R*, 23*R*)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahidroxi-7-oxa-7 $\alpha$ -homo-5 $\alpha$ -campestan-6-ona (Figura 1). Esta sustancia, a la que se denominó brasinólida, se distingue de otros compuestos esteroidales por poseer una estructura con dos *cis*-dioles, en las posiciones dos y tres del anillo A y en 22 y 23 de la cadena lateral, además de una 7-oxa-lactona de 7 miembros en el anillo B. De forma remarcable, se debe indicar la presencia de cuatro centros quirales contiguos: 20*S*, 22*R*, 23*R*, 24*S* (Salgado *et al.*, 2008).

Desde el aislamiento e identificación de la brasinólida en 1979, por un grupo de investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), numerosos recursos se dedicaron a la síntesis de los BS y a la evaluación de sus actividades biológicas (Núñez y Arsuaga, 1999).

En Japón, se sintetizó por primera vez la brasinólida en 1980, pero su proceso de síntesis requiere de múltiples pasos, indicando que su preparación es muy costosa para ser utilizado en la agricultura. Esta situación no se modificó aún después del descubrimiento de muchas rutas sintéticas (Núñez y Arsuaga, 1999).

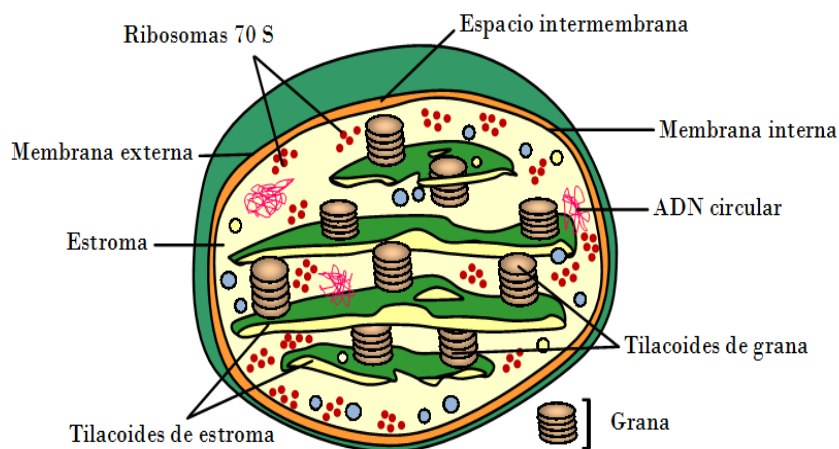
En la actualidad han sido aislados y caracterizados decenas de compuestos con características estructurales semejantes, como la dolicólida y la epibrasinólida (Figura 2).



**Figura 2. Primeros brasinoesteroides naturales caracterizados. A) brasinólida, B) dolicólida, C) epibrasinólida (Salgado *et al.*, 2008).**

### II.2.3 Localización de los brasinoesteroides

En cuanto a la localización intracelular de los BS (véase Figura 3), se ha indicado que los plastidios (cloroplastos, cromoplastos, leucoplastos, oleoplastos) son orgánulos importantes para estos compuestos.



**Figura 3. Estructura de un cloroplasto (CNICE, 2006).**

El estroma puede ser el sitio de síntesis mientras que se asume que los gránulos de almidón actúan como sitios de almacenaje. Se ha descubierto que los tejidos de crecimiento nuevos contienen una cantidad mayor de BS, en comparación a los tejidos viejos (Salgado *et al.*, 2008) y estudios realizados en diferentes plantas han demostrado que las semillas inmaduras son una fuente rica de BS (Delgadillo, 2002). Por otra parte, se ha reportado la presencia de brasinólida y castasterona en el polen de naranjo (*Citrus sinensis*), girasol (*Helianthus annuus*), pino (*Pinus silvestris*) y en semillas de rábano (*Raphanus sativus*) (Salgado *et al.*, 2008).

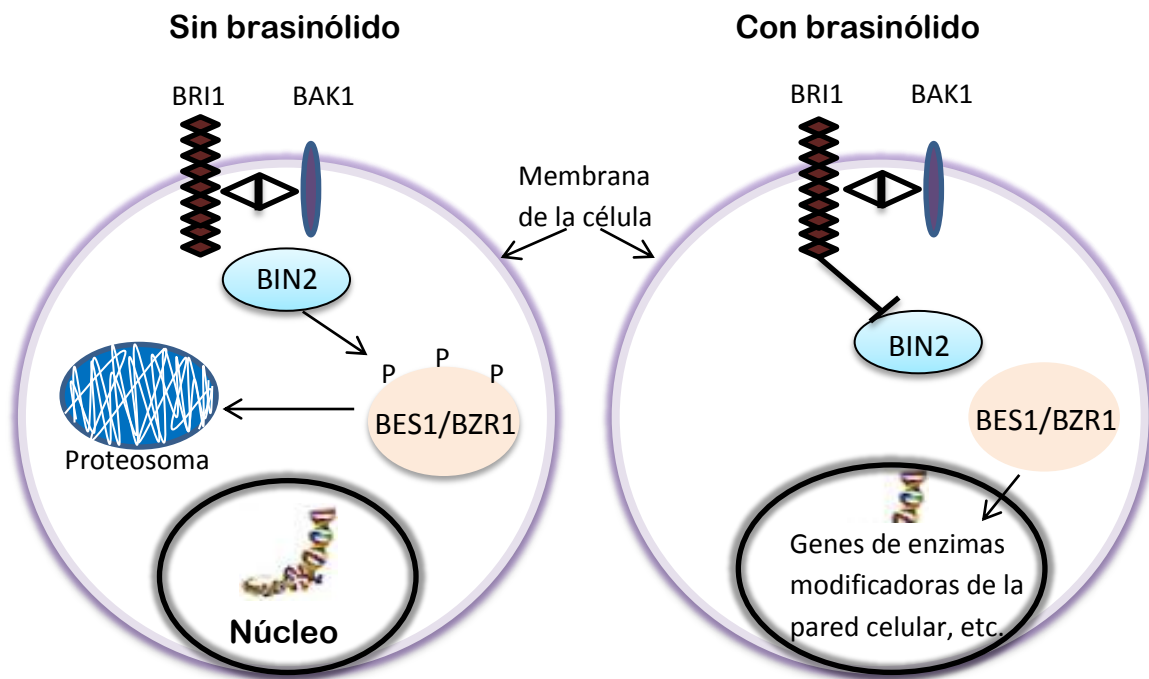
#### **II.2.4 Regulación y expresión génica de los brasinoesteroides**

La regulación de la expresión génica de los BS es un aspecto fundamental en su mecanismo de acción. Las primeras investigaciones sobre los genes que los regulan se realizaron en la década del 90. Estos resultados se evidenciaron en epicotilos de plantas de soya (*Glycine max* L. Merrill.), donde la aplicación de la 24-epibrasinólida (24-EBL) incrementó los niveles de ARNm del gen *bru1*, el cual codifica para una enzima xiloglucano-endotransglicosilasa (XET). Al gen lo regulan los BS durante las etapas tempranas del alargamiento celular (Izquierdo, 2012).

El mecanismo molecular de acción de BS no es totalmente conocido, aunque se podría argumentar a partir de las consideraciones estructurales, que dichos BS son propensos a trabajar por un mecanismo similar al de las hormonas esteroidales animales, que generalmente actúan a través de un complejo soluble receptor-ligando que se une a los sitios nucleares para regular la expresión de genes específicos (Clouse, 1996).

Por otro lado, para ejercer su función el receptor debe interactuar con otros componentes proteicos. Tal es el caso de un componente denominado BIN2 (Figura 4), el cual en ausencia del brasinólido le agrega un grupo fosfato a otros componentes conocidos como BES/BRZ1, los cuales al ser fosforilados son degradados por un complejo proteosómico. Por otra parte, si hay presencia del

brasinólido, el componente BIN2 no actúa: los componentes BES1/BRZ1 no se fosforilan y por lo tanto no se degradan, y de esta manera estos componentes se acumulan en el núcleo induciendo la expresión de ciertos genes descritos anteriormente, cuyo resultado final es producir una respuesta fisiológica específica (Sáenz *et al.*, 2006).



**Figura 4. Expresión génica del Brasinólido.**

### II.2.5 Efectos fisiológicos de los brasinoesteroides en los cultivos

- ∞ Regulan el metabolismo de los ácidos nucleicos.
- ∞ Actúan en la síntesis de proteínas aumentando el nivel de proteínas solubles y azúcares reductores.
- ∞ Promueven el desarrollo de las plantas acelerando la elongación y división celular.
- ∞ Aumentan la fijación de dióxido de carbono.

- ∞ Permiten el desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés (temperatura, hídrico y el efecto negativo de las diferentes plagas).
- ∞ Aumentan la tolerancia a la salinidad.
- ∞ Mejoran la calidad de las cosechas y aumentan la producción de la biomasa Incrementan entre 10% y 30% el rendimiento de diferentes cultivos de importancia económica, tales como: la papa, trigo, maíz, arroz y el tabaco (Góngora *et al.*, 2010).

Según Núñez, (1999) al comparar los efectos de los BS con los de otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, se deben destacar las siguientes características:

- ◆ Los brasinoesteroides son activos a concentraciones extremadamente bajas, generalmente soluciones de 0.1 – 0.001 ppm, que es un rango 100 veces inferior que el de los otros reguladores del crecimiento vegetal.
- ◆ El efecto de los brasinoesteroides en el crecimiento vegetal es particularmente fuerte en condiciones de crecimiento adversas (temperatura, salinidad), por lo que los brasinoesteroides pueden ser llamados “hormonas del estrés”.
- ◆ Los brasinoesteroides no causan deformaciones en las plantas.
- ◆ Los brasinoesteroides estimulan el crecimiento de la raíz.
- ◆ Los brasinoesteroides tienen baja toxicidad. (Núñez, 1999).

La dirección de la expansión celular está regulada por la orientación de las microfibrillas de celulosa de la pared celular. Ésta a su vez es controlada por la orientación de microtúbulos corticales. Existen evidencias de que los BS promueven la orientación de los microtúbulos, y de esta manera se acelera la elongación celular.

### **II.3 Análogos de brasinoesteroides (aBS)**

Dado que los BS se han encontrado en bajas concentraciones en las plantas, la única fuente de estos compuestos para estudios biológicos y propósitos prácticos es la síntesis química, con la cual se han producido aBS, los cuales ejercen efectos cualitativamente similares a los naturales (Yokota 1997), que son más fáciles de sintetizar y tienen similar o mayor actividad que los BS naturales (Malíková *et al.*, 2008).

En la actualidad se emplean los aBS en Cuba para mejorar la propagación *in vitro* y la aclimatización de los cultivos, ya que se consideran sustancias anti-estrés (Izquierdo *et al.*, 2012), debido al papel protector que ejercen sobre los cultivos sometidos a diferentes tipos de estrés, como la deficiencia hídrica, las altas temperaturas, salinidad y acumulación de metales pesados. Por otra parte, mejoran el vigor de las semillas y aceleran su proceso germinativo (Costales *et al.*, 2008).

En Cuba, se han sintetizado químicamente a partir de esteroides naturales, diferentes aBS, que han sido probados en el cultivo *in vitro*. Además, se han obtenido resultados satisfactorios en la estimulación del enraizamiento y los rendimientos de diferentes cultivos (Costales *et al.*, 2008).

Los aBS actúan eficientemente en plantas como inmunomoduladores cuando son aplicados a la concentración apropiada y en la etapa correcta del desarrollo de la planta (Bajguz y Hayat, 2009).

#### **II.3.1 Aplicación de los análogos de brasinoesteroides**

Los aBS se puede mezclar con excipientes sólidos (tales como talco, mica, tierra de diatomeas, arcilla), pastas (tales como lanolina) o líquidos (generalmente agua o mezclas hidroalcohólicas) para su aplicación como polvos, gránulos, comprimidos, pastas, suspensiones, soluciones, en presencia o no de

emulsionantes que ayudan a homogeneizar la preparación. La aplicación puede realizarse por pulverización, esparcimiento, recubrimiento o inmersión de la plantas o de sus órganos o en el suelo.

La cantidad de brasinoesteroide a aplicar varía con la estructura, la formulación empleada, el tipo de planta a ser tratada y el efecto deseado. Normalmente, la concentración de los BS en la preparación varía de 0,01 a 100 ppm, y se puede aplicar con otros productos químicos agrícolas, tales como otras hormonas vegetales o reguladores del crecimiento, fertilizantes, herbicidas, insecticidas y otros adyuvantes (Teixeira y Günter, 2002).

### **II.3.2 Interacción con otras hormonas vegetales**

Los BS controlan una amplia gama de respuestas en plantas. Curiosamente, cada una de estas respuestas también está controlada por una segunda hormona. La hormona vegetal con la que parecen tener más relación son las auxinas, principalmente en los efectos fisiológicos de crecimiento, elongación, crecimiento de raíces, etc. lo que sugiere que puede haber interacción considerable entre estas dos hormonas en el control de los desarrollo (Halliday, 2004).

Se ha demostrado que los BS actúan de forma sinérgica con las auxinas, en la elongación de los hipocotilos en una variedad de especies. Nemhauser *et al.* mostró evidencia de que los BS y las auxinas convergen en las rutas de señalización a nivel de la regulación de la transcripción de los genes comunes diana (Halliday, 2004).

También han demostrado controlar varios otros procesos en las plantas, tales como la inducción del ácido nucleico y la síntesis de proteínas, activación de varias actividades enzimáticas, la fotosíntesis, el aumento de frutos (Hasan *et al.*, 2011).



### II.3.3 Bioensayos

Los bioensayos más comúnmente empleados para detectar BS y evaluar su actividad promotora de crecimiento vegetal (Cuadro 2) son: inclinación de la lámina de arroz (Wada *et al.*, 1985) y el segundo entrenudo del frijol (Mitchell *et al.*, 1970).

La detección biológica de los BS se realizó inicialmente por el bioensayo del segundo entrenudo del frijol. Esta prueba ha sido sustituida gradualmente por el bioensayo de inclinación de lámina arroz y el bioensayo del desenrollamiento de la hoja de trigo, mientras que los métodos radio-inmunológicos son menos utilizados (Teixeira y Günter, 2002).

Bioensayos
Inclinación de la lámina de arroz
Curvatura del primer entrenudo del frijol
Segundo entrenudo del frijol
Mesocótilo del maíz
Epicótilo del frijol Azuki
Epicótilo de guisante enano
Desenrollamiento de la hoja de trigo
Inhibición de la acumulación de betacianina en <i>Amaranthus</i>
Longitud del hipocótilo y peso de cotiledones de <i>Raphanus sativus</i>
Enraizamiento del tomate

**Tabla 1. Bioensayos más utilizados en la evaluación de los BS** (Autor: Marquardt y Adam, 1991, tomada de Soria, 2011).

Otros bioensayos son también útiles, como el de la curvatura del primer entrenudo del frijol, los ensayos de planta completa con tomate o *Raphanus sativus*, así como el ensayo de desenrollamiento de la hoja de trigo, descrito por Wang (2000). El ensayo del primer entrenudo del frijol, se utiliza para evaluar la auxina inductora del crecimiento, se empleó también para probar las relaciones estructura-actividad de los BS (Soria, 2011).

Recientemente, Kauschman en el 2006 (mencionado por Soria, 2011) utilizó los bioensayos del alargamiento de hipocotilos de plántulas de *Lactuca sativa* L., el del crecimiento recto de coleoptilos de *Triticum aestivum* L. y el del crecimiento de callos de cotiledones de *Glycine max* L., para evaluar la actividad biológica de distintos BS.

#### **II.4 Generalidades del Frijol.**

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una de las especies más importantes en el mundo, pues forma parte del grupo de plantas en las cuales la humanidad encuentra la principal fuente de proteína para su alimentación. La mayor parte de su producción se presenta en los países de bajos recursos, como los pertenecientes a los continentes Americano y Africano (Broughton et al., 2003).

El género *Phaseolus* se caracteriza por la presencia de la faseolina, una proteína de almacenamiento en el tejido cotiledonal de la semilla; determina la cantidad y calidad nutricional de las proteínas en la semilla de frijol; existen diferentes tipos de faseolinas asociados con el tamaño de la semilla, por ejemplo la de tipo “S” (Sanilac) se relaciona con semilla pequeña, mientras que la “T” (Tendergreen) y “C” (Chile) con mediana y grande.

Se pueden identificar 4 tipos de hábitos de crecimiento según la terminación apical del tallo y de las ramas, dependiendo de si se forma un racimo o un meristema apical, respectivamente (Betancour & Dávila, 2002): los dos primeros tipos corresponden a los arbustivos, TIPO I: determinado arbustivo, sus

ramas terminan en racimos; la inflorescencia desarrollada es terminal, es decir detiene el crecimiento de la rama; carecen de la habilidad de trepar. TIPO II: indeterminado arbustivo, tienen tallos cortos erectos de 30 a 50 internodos y ramas; las plantas terminan en guías cortas y son semi-trepadoras (Beebe et al., 2000). Los otros dos son: TIPO III indeterminado postrado, con ramificación bien desarrollada y altura superior a los 80 cm; el hábito TIPO IV, se le conoce como indeterminado trepador, el cual desarrolla la capacidad de torsión, sus ramas son poco desarrolladas, pueden alcanzar alturas de más de dos metros

#### **II.4.1 Composición química**

Al 11 % del contenido de humedad, la semilla tiene 17-30% de proteína, generalmente bajos en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) pero alto en lisina. También tiene 57.8% del complejo de azúcares, 1.6% de grasa, 4% de fibra y grandes cantidades de ácido fólico; en cuanto a los micronutrientes esenciales, presenta cerca de 34-89 ppm de hierro y 21-54 ppm de zinc (Beebe et al., 2000).

#### **II.4.2 Clasificación Taxonómica.**

Reino: Plantae

División: Magnoliopsida

Clase: Dicotyledoneas

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae.

Subfamilia: Papilionoideae.

Tribu: Phaseolae.

Subtribu: Phascolinae

Género Phaseolus.

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

### II.4.3 Descripción morfológica.

Es una planta herbácea de ciclo anual, con un ciclo de vida relativamente corto, a lo largo del cual, se producen numerosos cambios morfológicos dividiéndose así, en dos etapas conocidas como fase vegetativa y reproductiva. Se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas. El ciclo vegetativo del frijol puede variar entre 80 (variedades precoces) y 180 días (variedades trepadoras). Dicho lapso se encuentra determinado sobre todo por el genotipo de la variedad, hábito de crecimiento, clima, suelo, radiación solar y fotoperiodo.

**Raíz:** El sistema radical está formado por la raíz primaria o principal que se desarrolla a partir de la radícula del embrión. Sobre ésta y en disposición de corona se forman la secundaria y terciarias y otras subdivisiones; los pelos absorbentes, órganos epidérmicos especializados en la absorción de agua y nutrimentos, se localizan en las partes jóvenes de las raíces laterales. Aunque generalmente se distingue la raíz primaria, el sistema radicular tiende a ser fasciculado, fibroso en algunos casos, pero con una amplia variación incluso dentro de una misma variedad. Las raíces presentan nódulos distribuidos en la raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical; estos nódulos son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico.

**Tallo:** El tallo joven es herbáceo y semi-leñoso al final del ciclo; es una sucesión de nudos y entrenudos donde se insertan las hojas y los diversos complejos axilares, el tallo o eje principal es de mayor diámetro que las ramas laterales, de color verde rosa o morado, glabro o pubescente, determinado si termina en inflorescencia ó indeterminado si su yema apical es vegetativa. Se indica en la inserción de las raíces y el primer nudo corresponde al de los cotiledones, esta primera parte del tallo se denomina hipocotilo, el segundo nudo es el de las hojas primarias, las cuales son simples entre el nudo de los cotiledones y el de las hojas primarias se encuentra un entrenudo real llamado epicotilo.

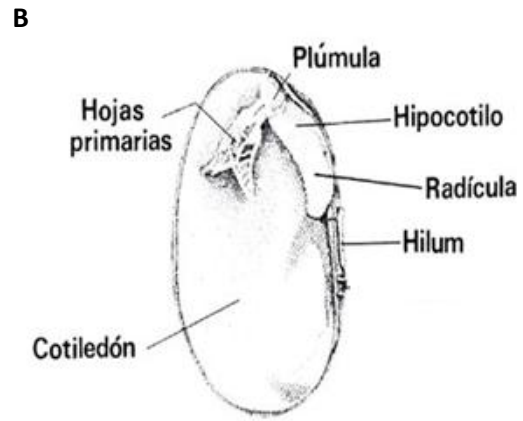
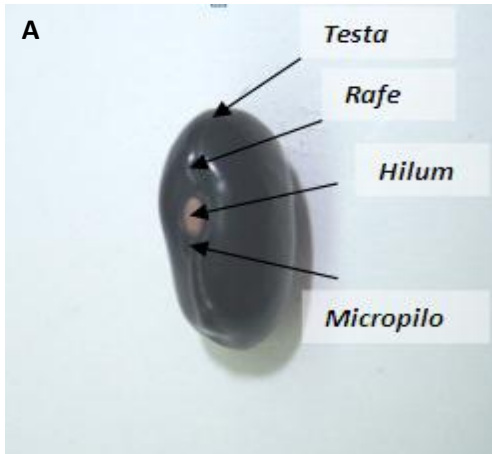
**Hojas:** Son de dos tipos: simples y compuestas. Los cotiledones constituyen el primer par de hojas, proveen de sustancias de reserva a la planta durante la germinación y emergencia, elaboran los primeros carbohidratos a través de la fotosíntesis en sus cloroplastos y son de poca duración. El segundo par y primeras hojas verdaderas, se desarrollan en el segundo nudo, son simples, opuestas y cortadas. A partir del tercer nudo se desarrollan las hojas compuestas, las cuales son alternas, de tres folíolos, un peciolo y un raquis. Presentan variación en cuanto a tamaño, color y pilosidad, variación que está relacionada, con la variedad y con las condiciones ambientales de luz y humedad.

**Inflorescencia:** Las inflorescencias pueden ser terminales o axilares. En las inflorescencias se pueden distinguir tres componentes principales: el eje de la inflorescencia que se compone de pedúnculo y de raquis, las brácteas primarias y los botones florales.

**Flor:** Las flores de frijol desarrollan en una inflorescencia de racimo, la cual puede ser terminal como sucede en las variedades de hábito determinado o lateral en las indeterminadas. Posee simetría bilateral y esta constituida por el pedicelo, el cáliz, corona, estandarte y dos alas que van del color blanco al rojo.

**Fruto:** Es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Las vainas pueden ser de diversos colores uniformes o con rayas dependiendo de la variedad. Dos suturas aparecen en la unión de las vainas: la sutura dorsal, llamada placentar, y la sutura ventral.

**Semillas:** La semilla no posee albumen, por tanto las reservas nutritivas se concentra en los cotiledones. Puede tener varias formas: ovalada, redonda, cilíndrica, arriñonada. Las partes externas más importantes son: la testa, el hilum, el micrópilo y el rafe. Internamente esta constituida por el embrión, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula (Figura 5).



**Figura 5. Estructura de Semilla de frijol.** Composición externa (a) e interna (b) de la semilla del frijol (a-Manual Técnico Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de frijol voluble 2009; b-fotografía tomada por Blanca Fabiola Pérez López).

### III. ANTECEDENTES.

---

#### III.1 Evaluaciones de análogos de brasionoesteroides realizadas por nuestro equipo de trabajo.

Fernández (2010), sintetiza y presenta el efecto de 7 aBS (aBS-1, aBS-2, aBS-3, aBS-4, aBS-5, aBS-6 y aBS-7) en la variedad de arroz Morelos A-06 a 8 diferentes concentraciones (5.0 mg/L, 2.5 mg/L, 0.5 mg/L, 0.25 mg/L, 0.05 mg/L, 0.005 mg/L, 0.0005 mg/L, 0.00005 mg/L) y lo comparó con el obtenido de la homobrasinólida (HBL), concluyendo que para el aBS-1 hay actividad desde la concentración 0.005 mg/L con ángulo de 55°, en el aBS-2 y aBS-3 la mejor actividad es a la concentración 0.05 mg/L con ángulos 70° y 50° respectivamente, el aBS-4 es más activo a la concentración 0.005 mg/L con ángulo de 75°.

La concentración 0.05 mg/L es la más activa del aBS-5. En el aBS-6 la mejor concentración con ángulo de 80° a la concentración de 0.0005 mg/L. En el aBS-7 hay dos concentraciones que tiene el mejor ángulo 65° y por lo tanto la mejor actividad en las concentraciones 0.00005 mg/L y la 0.005 mg/L. De esta forma se demostró la actividad de los aBS a 8 diferentes concentraciones y se observó que tanto en concentraciones menores y mayores hay una fuerte actividad de incremento con los siete aBS estudiados.

Moreno (2010), evaluó 4 aBS (aBS-1, aBS-2, aBS-3 y aBS-4) en maíz criollos y lo comparó con el obtenido con el de la homobrasinólida (HBL), empleando concentraciones de 0.1 mg/L, 1.0 mg/L y 10.0 mg/L, concluyendo que el aBS-1 y aBS-4 favorecieron incrementos en la mayoría de los parámetros evaluados en invernadero. Reportó incrementos del 60% con el aBS1 en la concentración 10.0 mg/L y del 86% con el aBS4 con la concentración 0.1 mg/l, en la biomasa del maíz cremoso cultivado en invernadero. En el maíz amarillo, el aBS-1 incrementó la biomasa en un 3% y con el aBS-4 en un 35%. Resalta también que el aBS-4 es el aBS que mayores efectos tuvo en menores concentraciones.

Pérez (2010), estudio el efecto de aBS evaluando la biomasa de plantas de maíz híbrido y frijol; las concentraciones que resultaron ser las más efectivas para el maíz fueron 0.1 mg/L para el aBS-4, 1.0 mg/L para el aBS-3 y aBS-2 y 0.01 mg/L para el aBS-1. La concentración más alta 10.0 mg/L no favorece en el incremento. Para el frijol el aBS4 ejerció el mayor efecto a la concentración 1.0 mg/L. Concluyo que el aBS-4 tuvo una respuesta consistente en el incremento de biomasa tanto para el maíz como para el frijol.

Hidalgo (2012), estudio el efecto de aBS en frijol y resultando así que el análogo aBS-4 fue el que presentó mayor actividad promotora del crecimiento vegetal. Mientras que en el caso del AG25, recomienda probarlo como herbicida, por la actividad tan grande que mostró como un inhibidor del crecimiento.

Gómez (2013), utilizó la variedad de arroz Morelos A-92 y la variedad A-06, las mejores respuestas se obtuvieron con los aBS-5 y aBS-9. Para la variedad de arroz Morelos A-98 los aBS más activos fueron aBS-6 y aBS-10. El aBS-4 obtuvo sus mayores respuestas a  $1 \times 10^{-2}$  mg/L lo que significa que dicho análogo conserva su actividad sin importar el cambio de variedad de arroz. La consistencia observada en el aBS-4 permite proponer a este compuesto como uno de los candidatos a utilizarse en pruebas a mayor escala.

Andrade (2013) reportó que el aBS-4 y la epibrasinólida mostraron mejor respuesta en la apertura de la inclinación de la lámina de la variedad de arroz Morelos A-98 y A-06 que el control. La epibrasinólida mostró su pico máximo a la concentración de 0.1 mg/L. La mayor actividad se presentó cuando se aplicó el aBS4 a las concentraciones de 1 mg/L y 0.1 mg/L. También empleó frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) criollo, donde concluye que el aBS-4 ejerce efectos a concentraciones de 1 mg/L y 0.1 mg/L, ya que estas concentraciones ayudaron a la planta de frijol a soportar el estrés hídrico, lo que significa que el análogo promovió el crecimiento de la planta y por lo tanto el aumento de la biomasa.



Rivera (2013) evaluó la actividad de cuatro aBs, que fueron aBS-16, aBS-17, aBS-18 y aBS-19 frente a la epibrasinolida, realizó su evaluación mediante el bioensayo de la inclinación de la lámina de arroz usando las variedades de arroz A-92, A-98 y A-2006, determinó que el aBS-18 mostró tener una mejor respuesta promoviendo un mayor ángulo de inclinación que el resto de los análogos, lo cual se manifestó en las tres variedades de arroz. Propuso que este análogo es promisorio ya que se busca un producto que tenga una actividad sin importar el cambio de variedad de arroz, por lo cual indico a este compuesto como un candidato a emplearse en pruebas a mayor escala.

#### IV. JUSTIFICACION.

---

Ante la preocupante problemática actual de desnutrición y pobreza no solo en México si no en el mundo, es necesario buscar alternativas para garantizar la producción de alimentos a la misma velocidad con que crece la población, haciendo uso de la misma cantidad de terrenos de cultivo disponibles y sin incrementar disparadamente los costos de producción, una de las tecnologías que se están utilizando para este problema en diferentes países es el uso de análogos de brasinoesteroides, que se obtienen de manera sintética a partir de diversos sustratos esteroidales. Los resultados que se han obtenido indican que algunos de estos compuestos ejercen un efecto positivo en el incremento de la biomasa y mejoran el rendimiento de cultivos.

Teniendo antecedentes, de que los análogos de brasinoesteroides aBS-4 y aBS18, tienen mayor actividad biológica que el resto de los aBs evaluados se plantea usar las concentraciones a las que han demostrado tener mejores resultados a nivel de bioensayo para ser llevados a nivel de invernadero usando como control positivo la epibrasinolida, estos se aplicaran por 3 diferentes tipos de tratamientos para así determinar cuál de ellos es el más efectivo para su posterior estudio en condiciones de campo abierto.

## V. HIPÓTESIS.

---

Como los resultados de los bioensayos de los análogos de brasinoesteroides 4 y 18 lo indican, estos incrementaran el rendimiento del cultivo y biomasa a las concentraciones que han demostrado mayor actividad biológica, este dependerá del método de aplicación que se utilice en una variedad de frijol en condiciones de invernadero.

## **VI. OBJETIVO GENERAL.**

---

Evaluar el efecto de los análogos de brasinoesteroides 4 y 18 en una variedad de frijol negro, bajo condiciones de invernadero, utilizando 3 diferentes tipos de tratamientos y concentraciones.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES.**

---

- Evaluar los efectos de los análogos de brasinoesteroides 4 y 18 en concentraciones que han demostrado mayor actividad biológica comparándolos con la epibrasinólida.
- Evaluar área foliar, altura, peso seco, número de vainas, longitud de vaina y número de granos por vaina.
- Determinar cuál de los 3 diferentes tipos de tratamientos muestra mayor actividad biológica.
- Contribuir al estudio de la correlación estructura - actividad de los análogos de brasinoesteroides.

## viii. Desarrollo experimental.

---

### VIII.1 Materiales y métodos.

La evaluación de los dos análogos de brasinoesteroides se llevó a cabo en el Laboratorio y el invernadero de investigación del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de abril de 2013 a marzo del 2014.

#### VIII.1.1 Material biológico.

Para este experimento se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad negro del área de Tepeaca Puebla correspondientes a la cosecha 2013.



**Figura 6. Frijol negro.** Variedad de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*).

Las semillas a utilizar en este experimento se seleccionaron eliminando las semillas que presentaban algún daño físico como: estar incompletas, deformes o picadas, con presencia de hongo o vanas así como aquellas de coloración distinta, aquellas que no presentaron ninguno de los defectos mencionados se emplearon en el experimento.

### **VIII.1.2 Análogos de brasinoesteroides.**

Se utilizaron los análogos de brasinoesteroides aBS4, aBS18 para experimentación debido a que son los que han presentado mejores resultados a nivel de bioensayo y se usó la epibrasinólida como control positivo. Los análogos de brasinoesteroides fueron sintetizados por el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

#### **VIII.1.2.1 Especificaciones químicas.**

Claves de identificación: aBs-4 y aBs-18.

Ingrediente activo: Cetona esteroideal polihidroxilada (sólido).

Tipo de formulación: sólido (polvo, cristales); muy poco soluble en agua.

pH: Neutro.

Pf: 222-224 °C.

Es estable bajo almacenamiento en el refrigerador, en frasco ámbar bien cerrado y protegido de la luz.

#### **VIII.1.2.2 Preparación de soluciones y concentraciones de aBS**

Los análogos de brasinoesteroides utilizados en este estudio no son fácilmente solubles en agua, por lo cual se utilizó como co-disolvente acetona.

**Solución de acetona.** Para disolver los aBS se utilizó una solución de acetona al 2% esta se obtuvo agregando 2 ml de acetona y aforando a 100 mL con agua destilada.

**Solución patrón (0.01 mg/ml).** Se disolvió 1 mg de aBS correspondiente (aBS-4, aBS18 y epibrasinólida) en 2 mL de la solución de acetona (homogenizando hasta que se disuelva perfectamente) y se aforó a 100 mL de agua destilada a una

temperatura de  $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Por observación de gotas en el microscopio se asegura la formación de una solución.

**Diluciones seriadas al 10%.** Se tomó una alícuota de 10 mL de la solución patrón y se aforó a 100 ml de agua destilada para obtener una concentración de 1 mg/l. El procedimiento de dilución se repitió como se especifica en el **anexo A**, hasta obtener las concentraciones utilizadas en este experimento.

Las concentraciones usadas en este experimento son las que han demostrado mejores resultados en evaluaciones anteriores de nuestro equipo de trabajo. Las concentraciones empleadas se presentan en la tabla 1.

aBS	Concentración (mg/L)
aBS-4	$1 \times 10^{-2}$
aBS-18	$1 \times 10^{-3}$
Epibrasinólida	$1 \times 10^{-1}$

Tabla 1. Concentraciones de aBS evaluadas en este experimento.

## VIII.2 Diseño experimental.

El diseño experimental usado en este trabajo de investigación fue factorial  $2^4$  con 5 repeticiones por nivel de cada factor dando un total de 80 individuos de experimentación. Los 2 factores evaluados fueron 1.Tipo de aplicación y 2.Análogo de brasinoesteroide aplicado. Los 4 niveles del tipo de aplicación fueron: 1. Sin aplicación (T0), 2 imbibición (T1), 3 imbibición más aspersion vegetativa (T2) y 4.Imbibición más aspersion vegetativa más aspersion al inicio de la floración (T3). Por otra parte los niveles del análogo de brasinoesteroide aplicado fueron: 1.agua, 2. aBS-4, 3. aBS-18 y epibrasinólida. (Diagrama 1).





## **IX. Metodología.**

---

### **IX.1 Homogenización de semillas.**

Se determinó un rango específico de masa de las semillas, con el propósito de reducir las variaciones por masa por cada individuo en los resultados experimentales. Para ello y de acuerdo a Moreno (2010), se tomó una muestra aleatoria de 100 semillas, las cuales se pesaron individualmente y mediante la fórmula de Sturges (ecuación 1) se definió el número de clases o intervalos y se calculó el número de celdas en que se divide la muestra para finalmente determinar el rango más abundante y se trabajó con el rango obtenido.

#### **Ecuación 1:**

$$K= 1 + 3.322 \log(N)$$

Donde N: tamaño de muestra (100).

El rango para las semillas utilizadas fue de 0.2261g- 0.2533g.

### **IX.2 Desinfección de las semillas.**

Con el fin de prevenir o disminuir la aparición de hongos en las se llevó a cabo el proceso de desinfección; para ello se realizó lo siguiente: en una solución al 33% de hipoclorito comercial (Cloralex®) se sumergieron las semillas durante 30 segundos.

### **IX.3 Preparación del sustrato.**

El sustrato se preparó en una proporción de 3:2:1 de arena, grow-mix y cacahuatillo. Para la siembra se utilizaron macetas de 30 cm de diámetro superior externo, 20 cm de diámetro inferior y 30 cm de altura. A cada maceta se le agregó 7.5 kg del sustrato. Se optó por la mezcla de este sustrato ya que según experimentos anteriores de nuestro equipo de trabajo han llegado a la conclusión de que esta proporción retiene la humedad necesaria, mantiene un pH de 7.0 y las condiciones idóneas para el desarrollo de las plantas.

#### **IX.4 Método de aplicación de los aBS al cultivo de frijol.**

Para los tratamientos T1, T2 y T3 las semillas de frijol se sometieron a imbibición antes de la siembra con los aBS, la epibrasinolida y el agua destilada, esta se realizó a 25°C de temperatura constante. El tiempo de imbibición para las semillas de frijol fue de 3 horas.

La imbibición se realizó en vasos de plástico con capacidad de 100 mL, colocando en cada uno de los vasos por separado 30 mL de las concentraciones utilizadas, y las 15 semillas correspondientes a cada solución.

Para el caso de los tratamientos T2 y T3 se realizó la aspersión con los aBS y el agua a los 20 DDS, esta se llevó a cabo con un atomizador manual, asperjando hasta que el follaje de las plantas quedara bien humedecido. Se realizaron de 3 a 4 disparos por planta, al momento de asperjarlas se rodeó con cartón cada planta para evitar la contaminación a plantas vecinas.

En el tratamiento T3 se realizó otra aspersión al momento de aparición de la primera flor de cada una de las plantas correspondientes a este tratamiento utilizando la misma técnica que para la aspersión anterior pero esta vez realizando de 8 a 12 disparos dependiendo del tamaño de cada planta para asegurar que el follaje quedara bien humedecido.

#### **IX.5 Siembra.**

Después de haber transcurrido el tiempo de imbibición se procedió a realizar la siembra, la cual se realizó de manera manual enterrando la semilla a una profundidad de 3 cm (Domínguez *et al.*, 2001). El procedimiento fue el mismo para las dos semillas de estudio.

## **IX.6 Riegos.**

Se aplicó un riego a saturación antes de la siembra y posteriormente se monitoreó la humedad todos los días, lo que determinó que el riego fuese cada tercer día, manteniendo una humedad de 50 al 60 % (Pérez 2010). Los riegos variaron durante las diferentes etapas de crecimiento de la planta comenzó con 500 ml para la etapa de germinación y alcanzo un volumen de 3 L cuando la planta alcanzo su tamaño máximo.

## **IX.7 Fertilización.**

Durante este experimento no se realizó ninguna fertilización con el objetivo de evaluar directamente la actividad biológica de cada análogo aplicada y de cada tratamiento. Además esta no es necesaria en cultivo de frijol debido a la función simbiótica de las raíces con bacterias del género *Rhizobium* fijadoras del nitrógeno.

## **IX.8 Evaluación del efecto de los aBS en el cultivo de frijol.**

En este experimento se eligieron 3 características de la planta a evaluar que son: Vigor de crecimiento, cuantificación de cosecha y tamaño alcanzado por la planta. Para el caso de vigor de crecimiento los parámetros medidos fueron: área foliar, Altura a los 40 DDS y días de aparición de la primera flor. Para determinar la cosecha obtenida los parámetros fueron: Numero de vainas por planta, longitud de vainas, Gramos de frijol por planta y granos de frijol por planta y finalmente para el tamaño de la planta se determinó: peso seco de tallos y raíces, altura final y longitud de las raíces.

La obtención de resultados comenzó a los 40 DDS midiendo la altura que hasta ese momento había alcanzado cada individuo de experimentación, La altura se midió con un flexómetro desde la unión raíz-tallo hasta el ápice.

El área foliar se midió a los 55 DDS, esta se realizó cortando una hoja trifoliada de la parte media de la planta, la hoja cortada se fotografió sobre una cartulina blanca, para posteriormente realizar la medición de área foliar con el software analizador de imágenes ImageJ (Núñez, 1999).

Para determinar los días a floración se registraron los días tomando como inicio el día de la siembra y hasta el día de aparición de la primera flor en cada una de las unidades experimentales.

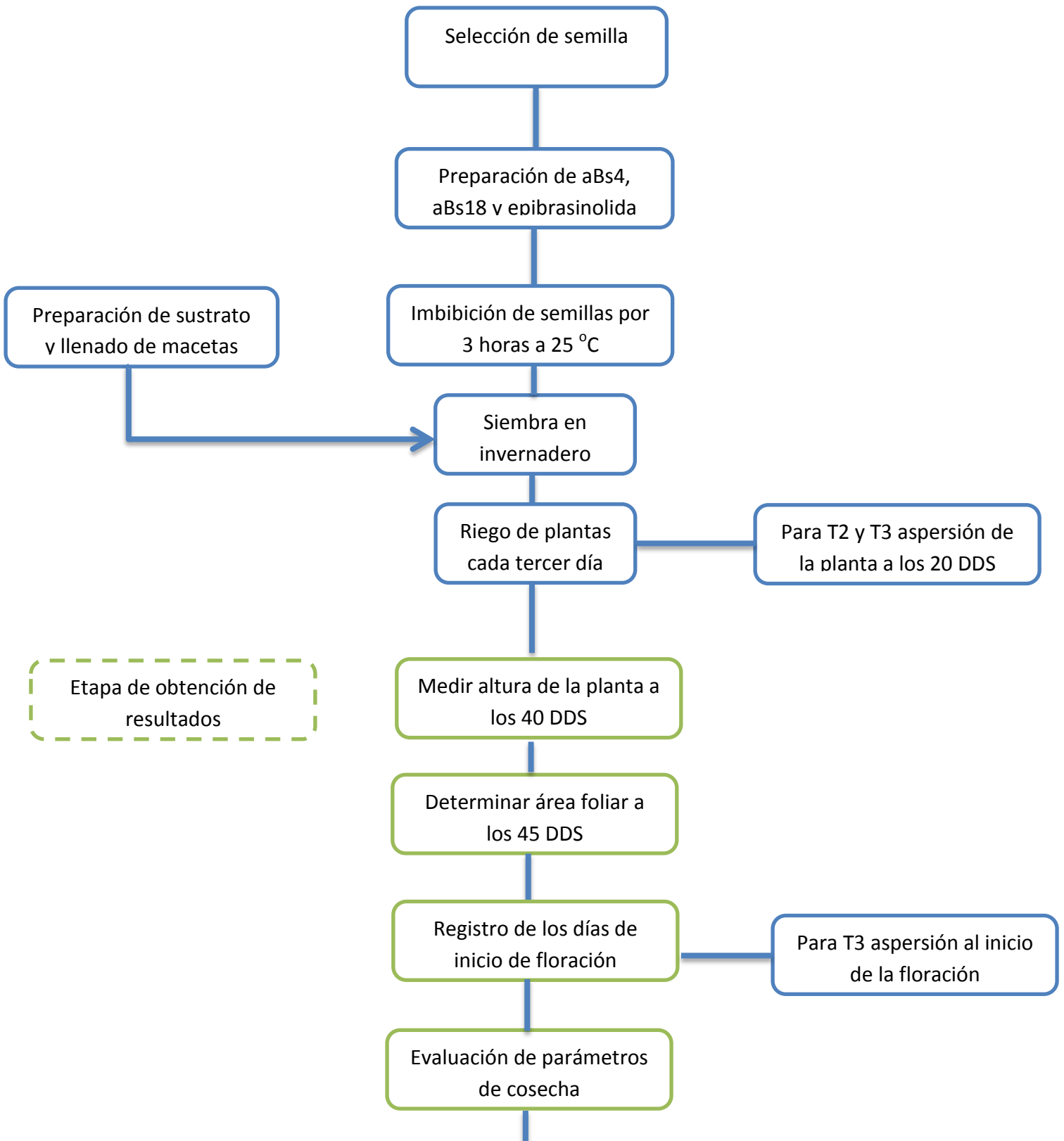
Para evaluar el número de vainas por planta, gramos de frijol por planta y granos de frijol por planta el procedimiento fue registrar el número de vainas totales que dio cada planta, contar el número de frijoles obtenido por cada planta y pesar en la balanza los gramos de frijol obtenido por cada planta. Para medir la longitud de las vainas se tomó una muestra al azar de 7 vainas por cada planta y estas fueron medidas con el vernier.

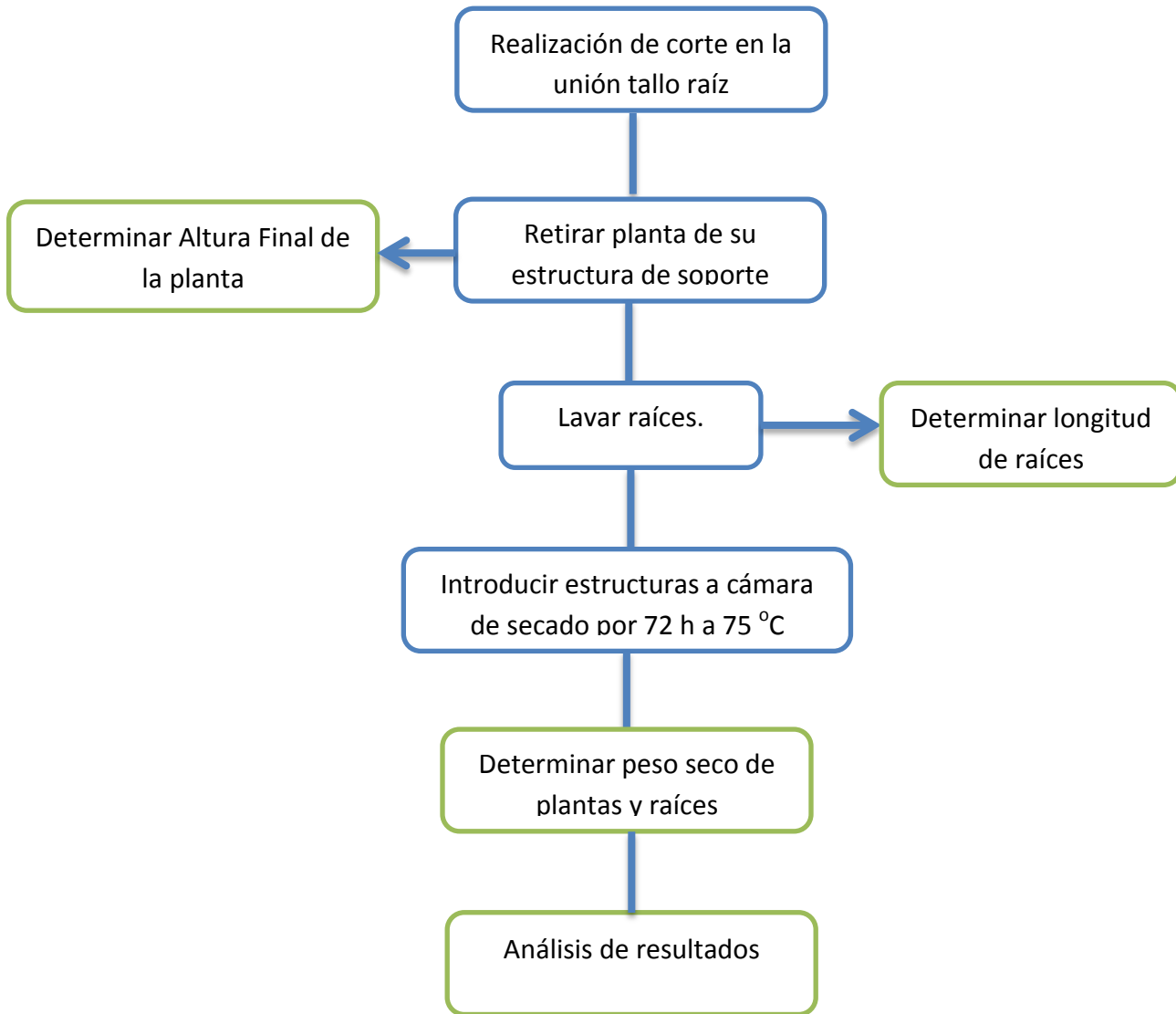
La altura final fue medida con un flexómetro inmediatamente después de bajar la planta de su estructura original y esto ocurrió cuando la planta perdió por completo su follaje, se realizó un corte en la unión tallo raíz, se desenredo de la estructura de sostén y se colocó sobre la mesa para ser medida.

Para obtener el peso seco de tallos estos fueron enredados y depositados en bolsas de papel estraza perfectamente bien identificadas y fueron colocados en una cámara de secado por 72 h a 75 °C. Una vez que se sacaron de la cámara de secado fueron pesados en una balanza granataria.

En el caso de las raíces estas se lavaron con abundante agua hasta que quedaron libres de tierra, se pusieron a secar a temperatura ambiente por 24 horas, después cada estructura se depositó en bolsas de papel estraza previamente etiquetadas para colocarlas dentro de una cámara secadora por 72 h, a 75 °C, cuando se sacaron de la cámara de secado fue medida su longitud con un flexómetro y fueron pesadas en una balanza granataria.

## X. DIAGRAMA DE TRABAJO.





## **XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS**

---

Una vez obtenidos los datos de todos los parámetros evaluados, los resultados fueron ordenados para poder elaborar promedios y desviaciones estándar. Los resultados obtenidos en cada parámetro se evaluaron mediante la prueba ANOVA ( $P < 0.05$ ), que se realizó con el programa estadístico Minitab14 Software® para determinar qué aBS presentó mayor actividad y bajo que tratamiento. Los gráficos y tablas explican los resultados finales.

## XII. RESULTADOS.

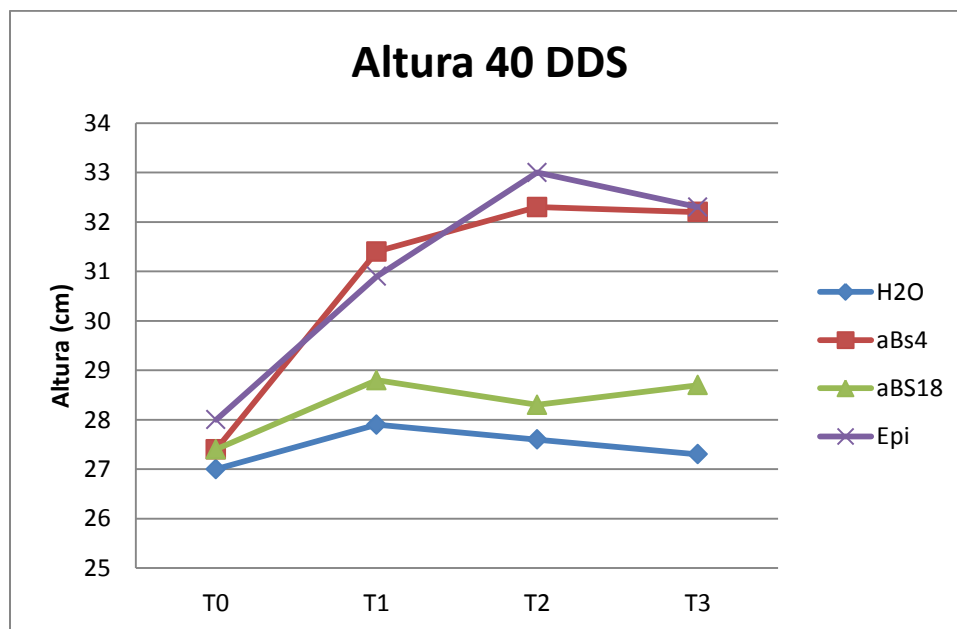
Los resultados se obtuvieron durante diferentes etapas del crecimiento de la planta, se presentan divididos en cada uno de los parámetros evaluados.

### XII.1 Altura a los 40 DDS.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para la altura alcanzada a los 40 DDS de cada unidad de experimentación bajo los 4 tratamientos, la gráfica 1 muestra las tendencias de estos resultados.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	27±2.1	27.9±0.66	27.6±1.36	27.3±0.98
aBs4	27.4±1.39	31.4±1.46	32.3±2.36	31.2±1.94
aBS18	27.4±0.97	28.8±1.72	28.3±2.27	28.7±1.17
Epi	28±2.61	30.9±2.15	33±0.89	31.1±1.02

**Tabla 3. Altura de la planta a los 40 DDS.** Se muestran los promedios y desviación estándar de la altura de la planta alcanzada con los cuatro tratamientos aplicados.



**Grafica 1. Altura a los 40 DDS.** Efecto en la altura de la planta a los 40 DDS con la aplicación de 2 aBS bajo cuatro tratamientos en una variedad de frijol negro.



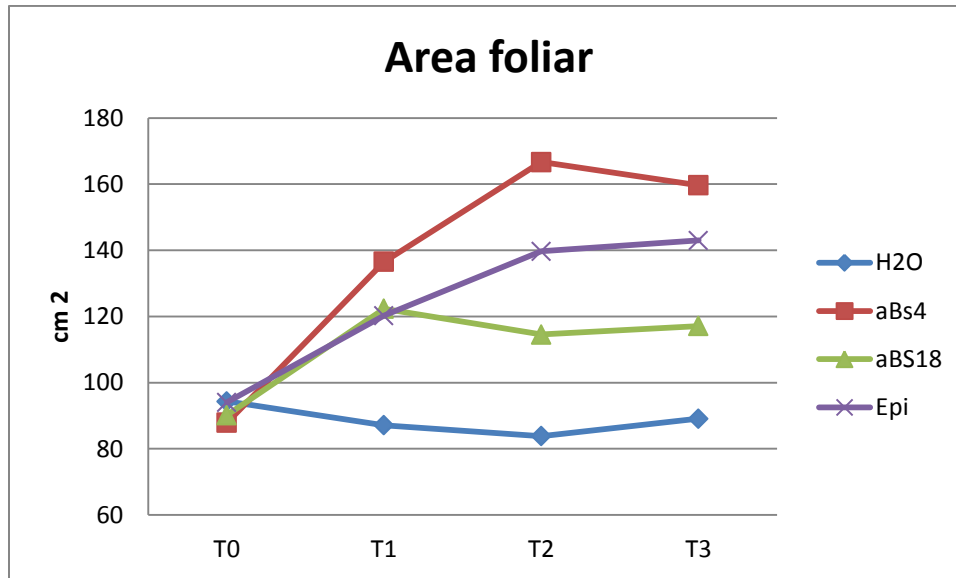
En la gráfica 1 podemos observar como para el tratamiento T0 es decir sin aplicación tanto el control como los 2 aBS y la epibrasinolida parten prácticamente del mismo punto a los 27- 28 cm. de altura. Para el tratamiento T1 observamos que el control de agua se mantuvo sin diferencia significativa, el aBS18 incremento ligeramente el tamaño promedio de las plantas y el aBS4 y la epibrasinolida incrementaron notablemente la altura alcanzando de 31-32 cm. de altura. Para el caso del tratamiento T2 el control nuevamente permanece sin cambios, el aBS18 presenta un pequeño decremento con respecto al tratamiento anterior y tanto el aBS4 como la epibrasinolida alcanzan su altura máxima a los 32.3 cm. y 33 cm. respectivamente. Finalmente para el tratamiento T3 los dos aBS, la epibrasinolida y el control se mantienen sin cambios significativos con respecto a T2 esto se debe a que hasta este momento únicamente se había aplicado la aspersión vegetativa a los 20 DDS.

## XII.2 Área foliar

Los resultados de los efectos que ejercieron los análogos sobre el área foliar se muestran en la tabla 4 donde podemos observar que el área foliar más grande se obtuvo en las plántulas tratadas con el aBS4 usando el tratamiento T2.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	94.34±6.92	87.12±10.85	83.86±11.01	89.1±10.52
aBs4	87.89±8.93	136.58±10	166.7±9.16	159.68±9.05
aBS18	90.16±6.89	122.34±8.05	114.57±4.06	117.11±3.27
Epi	94.04±8.6	120.27±10.79	139.71±10.67	143±9.88

**Tabla 4. Área foliar a los 45 DDS.** Se muestran los promedios y desviación estándar del área foliar de la planta en cm<sup>2</sup> con los cuatro tratamientos aplicados.



**Grafica 2. Área foliar.** Efecto en el área foliar de la planta evaluada a los 45 DDS con la aplicación de 2 aBS bajo cuatro diferentes tratamientos en una variedad de frijol negro.

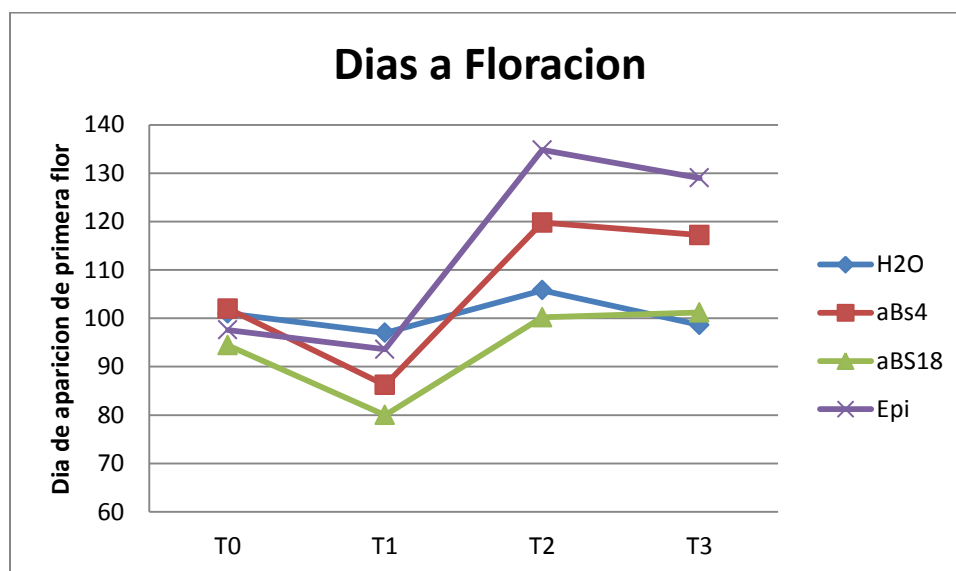
Los resultados del efecto de los aBS ejercido sobre el área foliar es mostrado en el grafico 2 donde podemos observar como para T0 todos los tratamiento parten aproximadamente del mismo punto, posteriormente para T1 el control se mantiene sin cambio significativo, aBS18 y epibrasinólida demostraron prácticamente el mismo incremento  $122.34 \text{ cm}^2$  y  $120.27 \text{ cm}^2$ , mostrando el aBS-4 el mayor incremento para este tratamiento con  $136.58 \text{ cm}^2$ . Para T2 el control se mantiene sin cambios, el aBS-18 no presentó cambio significativo con respecto a T1, la epibrasinólida incrementó a  $139.71 \text{ cm}^2$  y el aBS-4 incrementó a  $166.7 \text{ cm}^2$  alcanzando la mayor área foliar para este aBS y para este parámetro evaluado. En el caso de T3 el control y el aBS-18 no mostraron diferencia significativa con respecto a T2, la epibrasinolida mostró un ligero incremento a  $143 \text{ cm}^2$  y el aBS-4 mostro un ligero decremento con respecto a T2 pero ambos sin diferencia significativa.

### XII.3 Días a floración.

Los resultados obtenidos para los días a floración se muestran en la tabla 5, estos fueron los días registrados desde el día de la siembra hasta el día de aparición de la primera flor en cada unidad de experimentación, podemos observar que el aBS-18 bajo el tratamiento T1 fue el aBS que más aceleró el periodo de floración.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	102±6.75	97±10.81	105.8±5.64	98.6±4.88
aBs4	102.2±10.51	86.2±4.12	119.8±5.64	113.2±10.05
aBS18	94.4±10.05	80±7.72	100.2±7.57	101.2±10.46
Epi	97.6±8.55	93.6±8.50	137.8±11.46	126.6±9.58

**Tabla 5. Días a floración.** Se muestran los promedios y desviación estándar de los días a floración registrados desde el día de la siembra hasta el día de aparición de la primera flor.



**Grafica 3. Días a floración.** Efecto de los aBs sobre el periodo de floración de la planta evaluada desde el día de la siembra hasta la aparición de la primera flor.

En la gráfica 3 podemos observar la tendencia que tuvieron los periodos de floración de este trabajo de investigación, para T0 los cuatro compuestos se

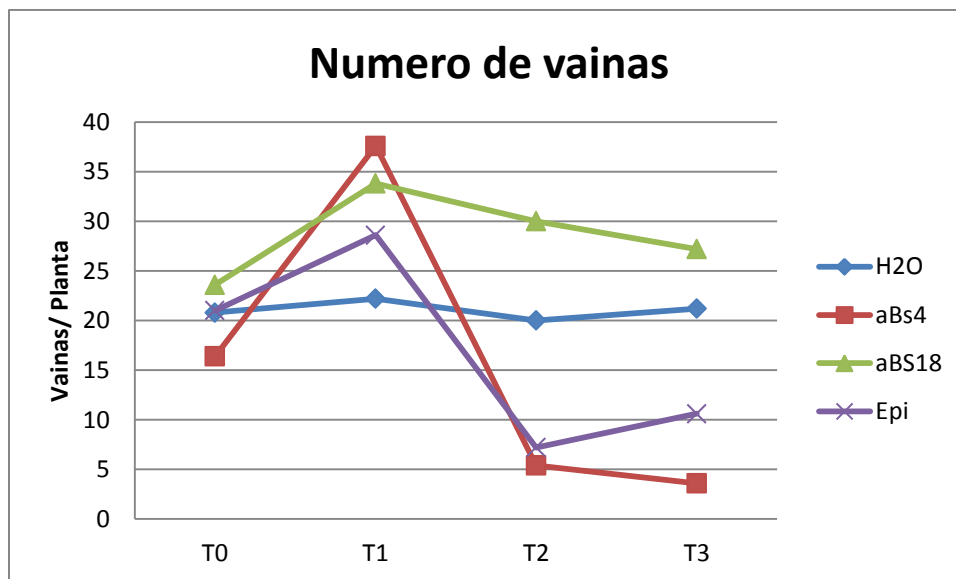
mantienen en el rango de los  $94.4 \pm 10.05$  a los  $102.2 \pm 10.51$  días de aparición de la primera flor, para T1 prácticamente los 3 compuestos evaluados disminuyeron el periodo de floración sin embargo el aBS18 fue quien demostró reducir de forma significativa reduciéndolo a  $80 \pm 7.72$  días siendo este resultado el periodo más corto de este trabajo de investigación, por el contrario para T2 los periodos de floración incrementaron llegando a un máximo de  $119.8 \pm 5.64$  alcanzado por la epibrasinolida. Para el caso de T3 los periodos de floración se mantuvieron prácticamente sin cambios significativos con respecto a T2.

#### XII.4 Número de vainas.

Los resultados que se obtuvieron en el número de vainas por planta se muestran en la tabla 6, este dato se obtuvo registrando el número total que produjo cada planta desde el inicio de aparición de estas hasta el final del periodo de producción. En la tabla se observa como el mayor número de vainas se obtuvo para el tratamiento T1 del aBS-4. En la gráfica 4 se muestra la actividad de cada uno de los aBS.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	20.8±3.71	22.2±3.66	20±4.69	21.2±2.48
aBs4	16.4±2.06	37.6±3.67	5.4±2.65	3.6±0.80
aBS18	23.6±2.15	33.8±1.72	30±4.43	27.2±3.37
Epi	21±3.41	28.6±3.88	7.2±1.72	10.6±2.80

**Tabla 6. Numero de vainas.** Se muestran los promedios y desviación estándar del número de vainas que produjo cada planta desde el inicio de la producción hasta el final del experimento.



**Grafica 4. Numero de vainas.** Actividad de producción de vainas por planta bajo la influencia de los 2 aBs con sus respectivos controles bajo 4 diferentes tratamientos.

Los efectos para la producción de vainas por planta son mostrados en la gráfica 4 donde observamos como en el tratamiento T0 prácticamente no hay variación tomando en cuenta la variación que existe en un cultivo sin aplicación de ningún tipo de hormona o estimulante de crecimiento, para el tratamiento T1 los 2 aBS y la epibrasinolida incrementaron la producción de vainas, el mejor resultado obtenido para este tratamiento y que también fue el más alto de este trabajo experimental fue el aBS-4 con una producción de  $37.6 \pm 3.67$  vainas por planta, para el caso de T2 los tres compuestos disminuyeron significativamente la producción con respecto a T1 aunque el aBS-18 en menor proporción siendo el aBS-4 quien mostró el mayor decremento llegando hasta una cantidad de  $5.4 \pm 2.65$  vainas por planta, para T3 tanto los 2 aBS como los controles se mantuvieron en el mismo rango de resultados sin mostrar cambios significativos.

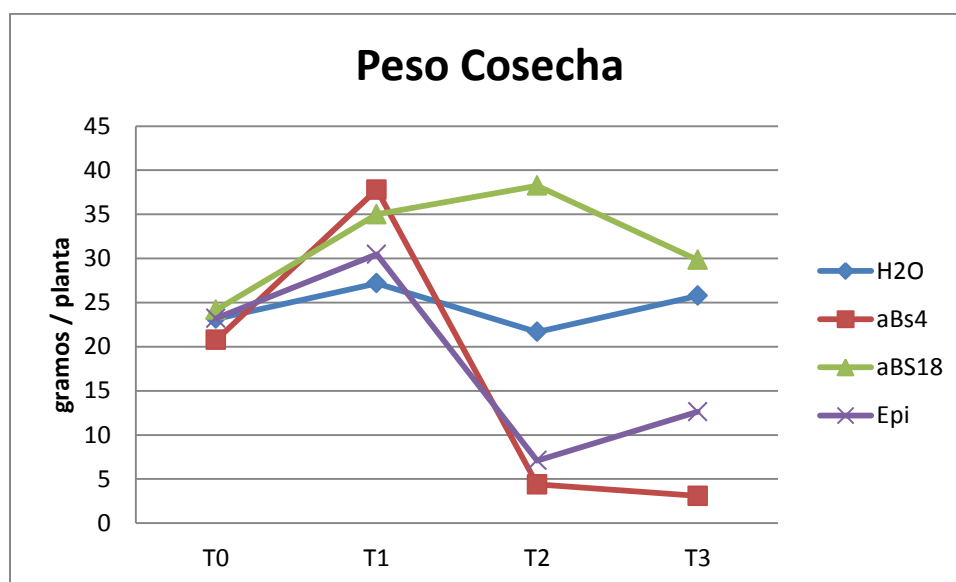
## XII.5 Gramos de frijol por planta.

La cosecha obtenida fue registrada en los gramos de frijol que produjo cada planta, estos resultados se muestran en la tabla 7. En ella podemos observar

cómo el tratamiento T2 para el aBS-18 fue quien produjo la mayor cantidad de gramos por planta, las tendencias del resto de los aBs se muestran en la gráfica X.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	23.16±2.03	27.18±2.48	21.66±3.76	25.77±2.92
aBs4	20.77±3.45	37.798±5.53	4.39±1.78	3.08±0.97
aBS18	24.17±3.85	34.99±3.67	38.26±5.46	29.83±2.83
Epi	23.21±3.56	30.47±4.69	7.08±1.98	12.62±2.87

**Tabla 7. Cosecha gramos/planta.** Se muestran los promedios y desviación estándar de la cosecha de cada planta representada en gramos/planta bajo los 4 tratamientos de los aBS y el control.



**Gráfica 5. Peso de cosecha.** Se observa el comportamiento de la producción de cosecha evaluada en gramos/planta, obtenidos de la aplicación de aBS y sus controles bajo cuatro tratamientos en una variedad de frijol negro.

En la gráfica 5 se distingue como para el tratamiento T0 los tres compuestos y el control parten del mismo punto. Para el tratamiento T1 los 3 aBS mostraron incremento en la producción aunque el mejor resultado lo obtuvo el aBS-4 con un promedio de 34.99±3.67 g por planta siendo este el segundo mejor

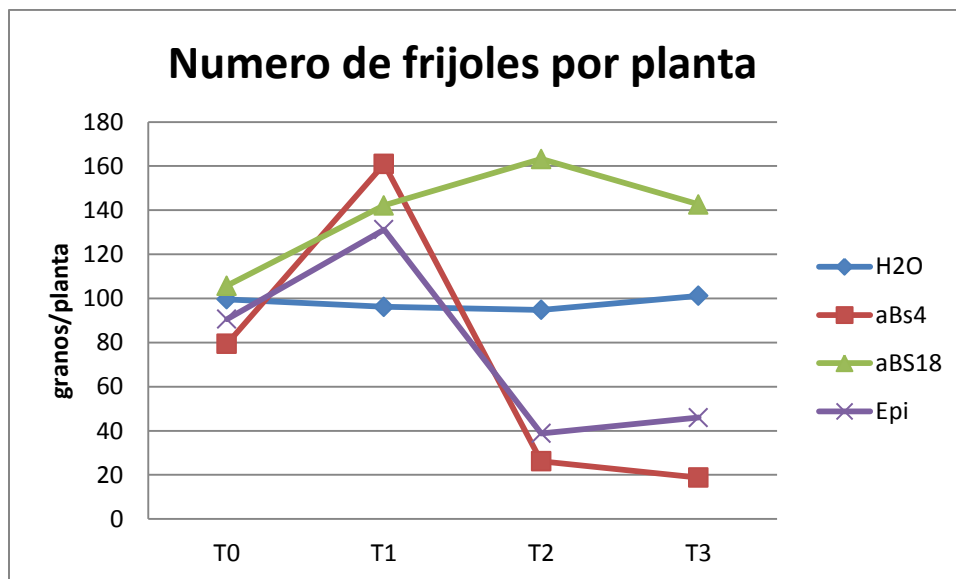
resultado del experimento en general, para este mismo tratamiento el aBS-18 obtuvo un promedio de  $34.99 \pm 3.67$  g por planta y la epibrasinólida mostró menor incremento. En el tratamiento T2 el aBS-4 mostró una caída de producción llegando hasta  $4.39 \pm 1.78$  g por planta, para el aBS-18 la producción incrementó a  $38.26 \pm 5.46$  que fue la mayor cosecha obtenida. La epibrasinólida también mostró un decremento llegando a  $7.08 \pm 1.98$ . Para T3 aBS-18 mostró un ligero decremento, epibrasinólida incremento ligeramente, aBS-4 mantuvo la baja producción y el control no presentó cambios significativos como en el resto de los tratamientos.

## XII.6 Número de frijoles por planta.

La cosecha obtenida también fue evaluada en número de frijoles que se obtuvo por cada planta, en la tabla 8 se observan los resultados de los cuatro tratamientos, en esta se puede observar como el mayor número de frijoles por planta lo obtuvo el tratamiento T2 con el aBS-18, en la gráfica X se observa el comportamiento del resto de los aBS con sus diferentes tratamientos.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	99.6±3.50	96.2±8.57	94.8±9.74	101.2±10.83
aBs4	79.4±10.71	161±9.27	26.2±10.57	18.8±6.52
aBS18	105.8±11.05	142.2±8.38	163.2±10.91	142.6±11.45
Epi	90.6±11.76	131.2±10.15	38.8±5.88	46±10.56

**Tabla 8. Numero de frijoles por planta.** Se muestran los promedios y desviación estándar del número de frijoles que se obtuvo por cada planta con los cuatro tratamientos aplicados de los dos análogos de brasinoesteroides, la epibrasinólida y el control de agua destilada.



**Grafica 6. Numero de frijoles por planta.** Efecto de los aBS sobre la cosecha evaluada en número de frijoles que se obtuvo por cada planta, muestra las tendencias de los cuatro tratamientos en una variedad de frijol negro.

En la gráfica 6 se observa como para el tratamiento T0 parten los 3 aBS y el control del mismo rango que va de los  $79.4 \pm 10.71$  a los  $105.8 \pm 11.05$  frijoles por planta, para el tratamiento T1 los 2 aBS y la epibrasinólida mostraron incremento siendo el aBs4 el que obtuvo mayor número de frijoles para este tratamiento alcanzando los  $161 \pm 9.27$  frijoles por planta. Para el tratamiento T2 el aBS-18 mostró un incremento siendo este el mayor número de frijoles alcanzado en el experimento con una cantidad de  $163.2 \pm 10.91$ , por el contrario la epibrasinólida y el aBS-4 mostraron amplios decrementos llegando hasta el  $38.8 \pm 5.88$  y el  $26.2 \pm 10.57$  respectivamente. En el tratamiento T3 el aBS-18 mostró un muy ligero decremento, el control negativo se mantuvo sin cambio significativo y la epibrasinólida y el aBS-4 mantuvieron el decremento que mostraron en T2.

### XII.7 Longitud de vainas.

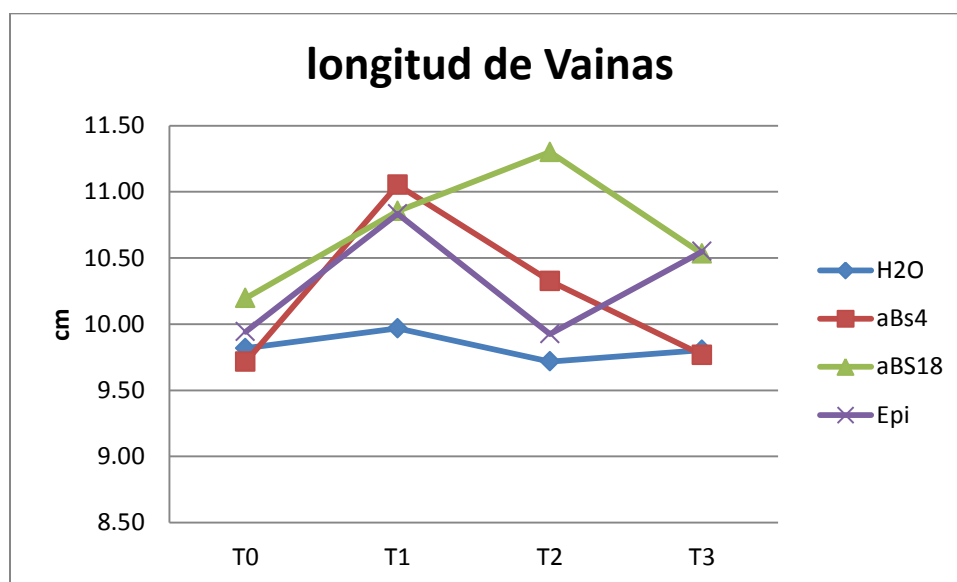
Los resultados que se obtuvieron de las longitudes de las vainas se muestran en la tabla 9, estos datos se obtuvieron tomando una muestra al azar de 7 vainas por cada planta. En la tabla se observa como las vainas más largas se obtuvieron



para el tratamiento T2 y el aBS-18. El comportamiento del resto de tratamientos y aBS se muestran en la gráfica 7.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	9.82±1.40	9.97±0.92	9.72±1.32	9.8±0.48
aBs4	9.71±0.76	11.05±0.66	10.32±0.96	9.77±0.50
aBS18	10.2±0.73	10.85±1.30	11.3±2.11	10.53±0.44
Epi	9.94±1.07	10.83±0.55	9.93±0.82	10.55±0.80

**Tabla 9. Longitud de vainas.** Se muestran los promedios y desviación estándar de la longitud de una muestra de 7 vainas por cada planta de cada uno de los tratamientos.



**Grafica 7. Longitud de vainas.** Efecto de los aBs sobre la longitud de las vainas representada en cm en una variedad de frijol negro bajo cuatro diferentes tratamientos.

Las longitudes de las vainas fueron influenciadas por los aBs en los distintos tratamientos, podemos observar como para T0 los cuatro compuestos parten del mismo punto que va de los  $9.71 \pm 0.76$  a los  $10.2 \pm 0.73$ , para el tratamiento T1 el aBS 18, aBS-4 y la epibrasinólida muestran un incremento significativo en la longitud, siendo el aBS-4 quien alcanza la mayor longitud con  $11.05 \pm 0.66$  cm.

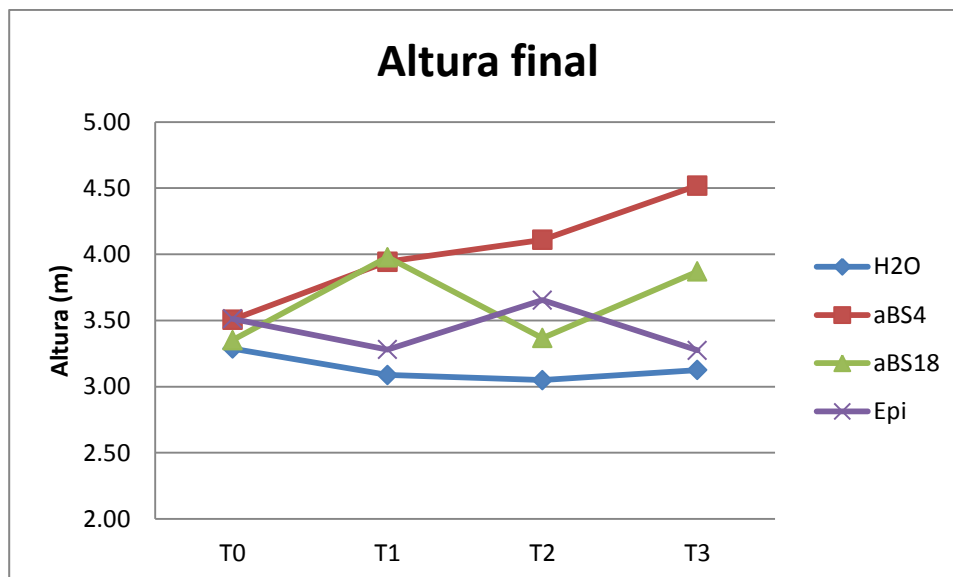
Para este tratamiento Por otro lado para el tratamiento T2 mientras que al aBS-4 y la epibrasinólida mostraron decrementos en la longitud el aBS-18 continuó incrementando hasta llegar a los  $11.3\pm 2.11$  cm que fueron las vainas de mayor longitud en el experimento, finalmente para el tratamiento T3 el aBS-18 mostró un decremento marcado con respecto a T2 llegando a los  $10.53\pm 0.44$  cm, el aBS-4 continuó con su patrón de decremento y la epibrasinólida mostró un incremento con respecto a T2 alcanzando los  $10.55\pm 0.80$  cm. por otra parte el control se mantuvo sin cambio significativo en los cuatro tratamientos en un rango de  $9.72\pm 1.32$  a  $9.97\pm 0.92$  cm.

## XII.8 Altura final.

Los resultados obtenidos para la altura final de las plantas se muestran en la tabla 10 expresada en metros (m), esta altura fue registrada al termino del experimento una vez que las plantas fueron retiradas de su estructura original, en la tabla se observa como la planta que obtuvo mayor altura fue con el tratamiento T3 y el aBS-4.

	T0	T1	T2	T3
H2O	$3.29\pm 0.12$	$3.09\pm 0.31$	$3.05\pm 0.25$	$3.13\pm 0.29$
aBS4	$3.51\pm 0.28$	$3.94\pm 0.28$	$4.11\pm 0.23$	$4.52\pm 0.28$
aBS18	$3.35\pm 0.26$	$3.98\pm 0.54$	$3.37\pm 0.32$	$3.87\pm 0.37$
Epi	$3.51\pm 0.24$	$3.28\pm 0.58$	$3.65\pm 0.25$	$3.27\pm 0.21$

**Tabla 10. Altura final.** Se muestran los promedios y desviación estándar en metros (m) de la altura que alcanzaron las plantas desde la siembra hasta el día en que se retiraron de sus macetas.



**Grafica 8. Altura final.** Efecto de los aBs sobre la altura que alcanzaron las plantas representada en metros (m), bajo los cuatro tratamientos.

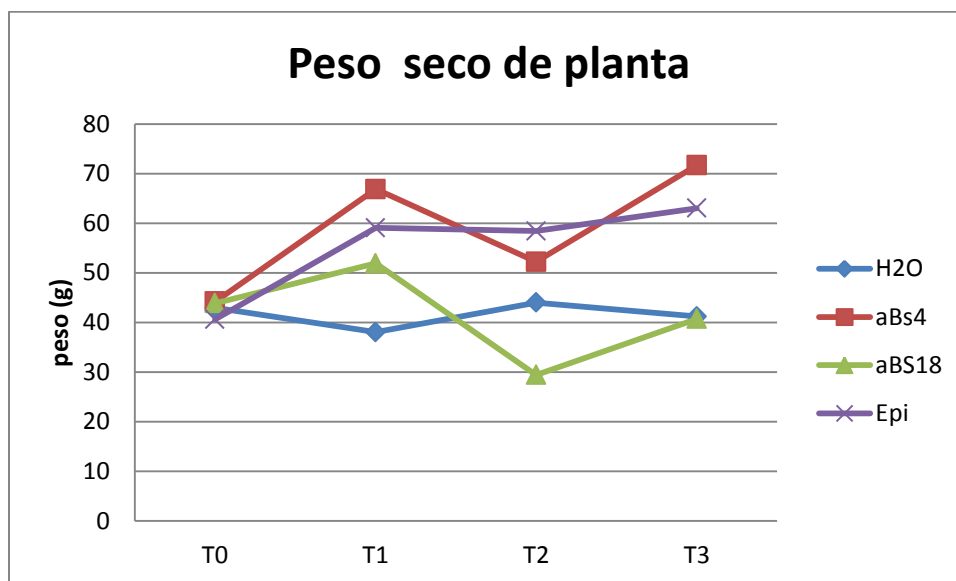
La altura final de las plantas partió de T0 en un rango de  $3.29 \pm 0.12$  a  $3.51 \pm 0.28$  m, en el tratamiento T1 aBS-4 y aBS-18 mostraron un incremento a casi 4 m, mientras que la epibrasinólida no mostro cambio significativo, para T2 el aBS-4 siguió incrementando hasta rebasar los 4 m de altura, por el contrario aBS-18 cayó a  $3.37 \pm 0.32$  m, mientras que la epibrasinólida llegó a  $3.65 \pm 0.25$  m. En el tratamiento T3 aBS-4 continuó con su incremento hasta llegar a  $4.52 \pm 0.28$  m. siendo ésta la mayor altura alcanzada de todos los tratamientos, el aBS-18 llegó a los  $3.87 \pm 0.37$  m. y la epibrasinólida presentó un decremento. El control negativo se mantuvo en los 4 tratamientos sin cambios significativos

## XII.9 Peso seco de Plantas

El peso seco de las plantas fue registrado al final del experimento después de estar 72 h en la cámara de secado, en la tabla 11 se observa como el mayor peso se obtuvo con el aBS-4 en tratamiento T3.

	T0	T1	T2	T3
H2O	42.96±4.92	38.06±2.16	44.02±2.50	41.22±2.64
aBs4	44.22±3.97	66.86±3.06	52.24±4.54	71.66±3.53
aBS18	43.88±2.68	51.9±3.08	29.44±4.57	40.72±5.11
Epi	40.62±3.88	59.08±4.49	58.42±4.31	63.02±3.83

**Tabla 11. Peso seco de plantas.** Se muestran los promedios y desviación estándar del peso seco final alcanzado por la planta.



**Gráfica 9. Peso seco de planta.** Efecto de los aBS sobre el peso seco del tallo, representado en gramos (g) muestra las tendencias de los cuatro tratamientos en una variedad de frijol negro.

Los resultados obtenidos en el peso seco de la estructura de la planta se muestran en la gráfica 9, esta nos muestra como para T0 parten los cuatro compuestos del mismo punto de  $40.62 \pm 3.88$  a  $44.22 \pm 3.97$  m, el control de agua se mantuvo en los cuatro tratamientos sin cambios significativos, sin embargo para el tratamiento T1 tanto aBS-18 como aBS-4 y epibrasinólida mostraron incremento en el peso siendo aBS-4 quien alcanzo el mayor peso para este tratamiento con  $66.86 \pm 3.06$  gramos, en el tratamiento T2 aBS mostró una caída de peso hasta los  $52.24 \pm 4.54$ , epibrasinólida se mantuvo sin cambios significativos y aBS-18 también mostró decremento llegando a los  $29.44 \pm 4.57$  g siendo éste el peso más bajo del experimento. Por otro lado en el tratamiento T3 aBS-4 nuevamente

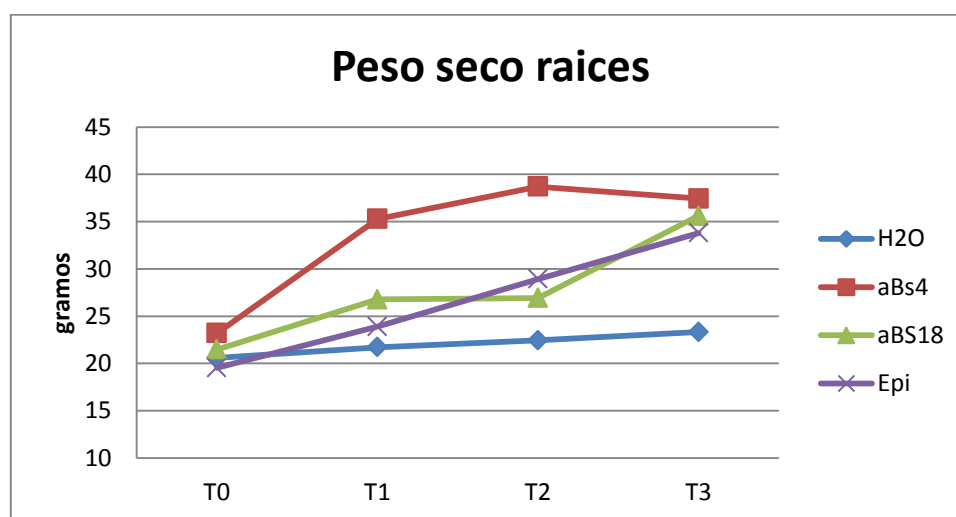
mostró un incremento hasta los  $71.66 \pm 3.53$  g que fue el mayor peso alcanzado por la planta de este trabajo de investigación. La epibrasinólida llegó a los  $63.02 \pm 3.83$ g, que fue el mayor peso alcanzado para este compuesto, finalmente aBS-18 mostró un ligero incremento con respecto al tratamiento T2 llegando a  $40.72 \pm 5.11$ g.

## XII.10 Peso seco de raíces.

En la tabla 12 se presentan los resultados obtenidos para el peso seco de las raíces, en ella podemos observar como el mayor peso alcanzado fue para el tratamiento T2 y el aBS-4.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	20.58±3.12	21.72±2.80	22.44±6.47	23.32±3.53
aBs4	23.2±5.31	35.28±1.63	38.7±3.25	37.44±5.55
aBS18	21.48±5.13	26.78±6.90	26.92±6.93	35.6±2.24
Epi	19.54±3.37	23.9±6.94	28.92±1.88	33.8±4.29

**Tabla 12. Peso seco de raíces.** Se muestran los promedios y desviación estándar del peso seco de la raíz de las plantas evaluadas bajo los cuatro tratamientos aplicados de los dos análogos de brasinoesteroides, la epibrasinólida y el control de agua destilada.



**Grafica 10. Peso seco de raíces.** Efecto de los aBS sobre el peso seco de la raíz de los individuos de experimentación representada en g, muestra las tendencias de los cuatro tratamientos en una variedad de frijol negro.

En la gráfica 10 podemos observar como para el tratamiento T0 parten los cuatro compuestos del mismo punto que va de los  $20.58 \pm 3.12$  a los  $23.2 \pm 5.31$ , en el tratamiento T1 abs18 y epibrasinólida muestran un ligero incremento, aBs4 mostro un incremento alcanzando los  $35.28 \pm 1.63$  g. Para el caso de tratamiento T2 aBS-4 continuó incrementando hasta llegar a los  $38.7 \pm 3.25$  g siendo este peso de raíz el máximo alcanzado en este trabajo de investigación, aBS-18 llegó a  $26.92 \pm 6.93$  g y epibrasinólida a  $28.92 \pm 1.88$  g. Finalmente para tratamiento T3 aBS-4 se mantuvo sin cambios significativos, aBS-18 y epibrasinólida continuaron incrementando hasta llegar a los  $35.6 \pm 2.24$  g y  $33.8 \pm 4.29$  g respectivamente. El control de agua se mantuvo en los 4 tratamientos sin cambios significativos.

### XII.11 Longitud de raíces.

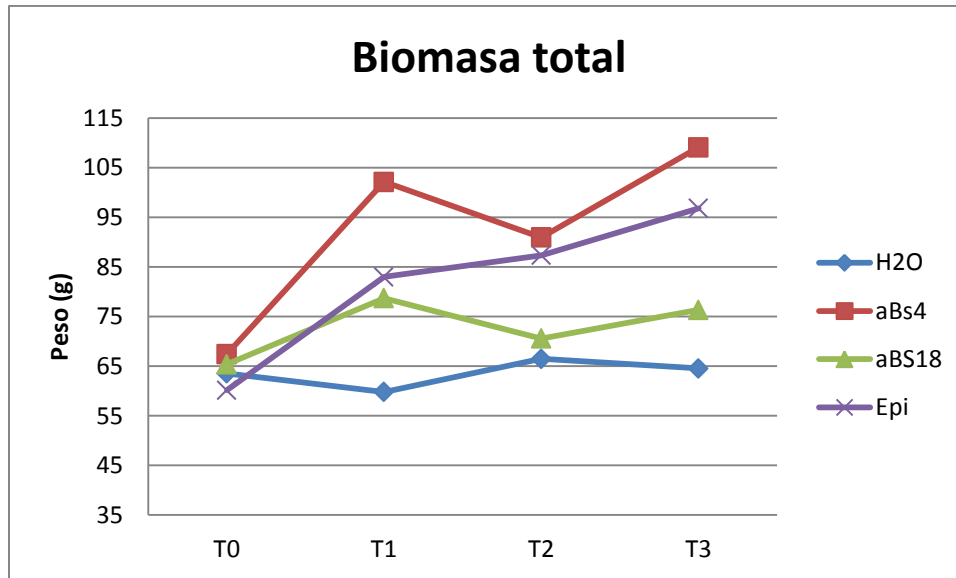
Los resultados obtenidos para la longitud de raíces fue muy similar para todos los cuatro compuestos y los cuatro tratamientos, estos se mantuvieron sin cambios significativos, alcanzaron longitudes de los  $29.5 \pm 0.63$  a los  $30.28 \pm 0.87$  centímetros como se puede observar en el **anexo E**.

### XII.12 Biomasa total.

Para la obtención de la biomasa total de la planta se sumó el peso seco de raíz más el peso seco del tallo, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 13.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	$63.54 \pm 5.75$	$59.78 \pm 4.58$	$66.46 \pm 7.57$	$64.54 \pm 5.17$
aBs4	$67.42 \pm 6.99$	$102.14 \pm 3.46$	$90.94 \pm 5.62$	<b><math>109.1 \pm 3.28</math></b>
aBS18	$65.36 \pm 5.96$	$78.68 \pm 9.54$	$70.56 \pm 5.12$	$76.32 \pm 7.44$
Epi	$60.16 \pm 6.52$	$82.98 \pm 11.95$	$87.34 \pm 5.38$	$96.82 \pm 8.72$

**Tabla 13. Biomasa.** Se muestran los promedios y desviación estándar de los resultados de la biomasa alcanzada por la planta representado en gramos (g).



**Grafica 12. Biomasa.** Efecto de los aBs sobre la biomasa de los individuos de experimentación representada en gramos (g), muestra las tendencias de los cuatro tratamientos en una variedad de frijol negro.

Se puede observar en la gráfica 11 como los 4 compuestos parten del mismo punto de T0, para tratamiento T1 los análogos y el control positivo incrementaron la biomasa siendo el aBs4 quien alcanzo el máximo para este tratamiento llegando a los  $102.14 \pm 3.46$  g, para el tratamiento T2 los 2 aBs mostraron un ligero decremento pero sin diferencia significativa, mientras que el control positivo mantuvo un incremento gradual, finalmente para el tratamiento T3 el aBs alcanzo la biomasa mas alta alcanzando los  $109.1 \pm 3.28$  g, seguido de epibrasinolida, aBs18 y finalmente control negativo respectivamente demostrando de esta manera que el aBs4 bajo el tratamiento T3 es el que tuvo mayor incremento en la biomasa.

### **XIII. Discusión de Resultados.**

---

Los aBS evaluados en términos generales presentaron buena estimulación de crecimiento vegetal, sin embargo este crecimiento depende del momento en el que se aplique, observándose que el estímulo de crecimiento de la planta no siempre va acompañado del incremento de la cosecha.

#### **Efectos del aBS4 sobre el cultivo de frijol.**

El aBS4 mostro muy buena respuesta para T1 obteniendo los valores más altos en los siguientes parámetros evaluados en este tratamiento: Área foliar, número de vainas, gramos de frijol por planta, número de frijoles por planta, longitud de vainas, altura final de la planta, peso seco de tallos , peso seco de raíces y biomasa. Presento el estímulo de crecimiento tanto en la planta como en la cosecha. En cuanto a los días de inicio de floración si redujo el tiempo sin embargo no pudo mejorar la acción del aBS18.

Por otra parte el mismo aBS4 para el tratamiento T2 obtuvo el mejor resultado de todo el experimento para el parámetro de área foliar, es decir que con aBS4 bajo el tratamiento de imbibición de la semilla más aspersion en la etapa vegetativa se obtuvieron las plantas con mayor follaje, también mostro incremento para la altura final, sin embargo no fue así para el resto de los parámetros evaluados ya que para el caso de longitud de vainas, numero de vainas, gramos de frijol por planta y numero de frijoles por planta mostro un sorprendente decremento lo que nos indica que para tratamiento T2 se incrementó de manera sorprendente el tamaño y follaje de la planta pero al mismo tiempo disminuyo la cosecha obtenida por planta.

Finalmente para el aBS4 bajo el tratamiento T3 las evaluaciones que a obtención de cosecha se refieren continuaron con el decremento siendo estos los



valores más escasos de cosecha para este experimento, sin embargo para los valores con respecto al tamaño de la planta incrementaron aún más y se obtuvieron las plantas con mayor altura, mayor peso seco del tallo, mayor incremento de biomasa y mayor área foliar de este trabajo de investigación, considerando al aBs4 bajo este tratamiento como un excelente promotor de la parte vegetativa de la planta.

### **Efectos del aBs 18 sobre el cultivo de frijol.**

El aBs18 también mostro actividad para el tratamiento T1, aunque sin alcanzar los valores logrados por el aBs4, sin embargo logro disminuir los días de inicio de floración llegando a  $80 \pm 7.72$  días , siendo este el periodo más corto desde la siembra hasta la aparición de la primera flor.

Al analizar el tratamiento T2 se observó que a diferencia del aBs4 bajo este tratamiento, el aBs18 obtuvo mejores resultados en el incremento de rendimiento del cultivo, obtuvo los valores más altos para gramos de frijol por planta de , número de frijoles por planta y longitud de vainas, pero en número de vainas disminuyo con respecto a T1 lo que nos indica que tuvo menos número de vainas pero de mayor tamaño y con más frijoles de todo el experimento Se observó también que en cuanto a tamaño de la planta se refiere no estimulo el crecimiento, se obtuvieron plantas no tan altas, con menor peso seco, sin mucha biomasa y área foliar, con días de inicio de floración muy similares a los del control negativo.

El aBs18 mostro que para el tratamiento T3 disminuyo sus niveles de producción de cosecha con respecto a T2, el único parámetro que incremento fue la altura final de la planta aunque esta no alcanzo los valores obtenidos por el aBs4.

## **XIV. Conclusión**

---

Los 2 análogos de brasinosteroides evaluados presentaron una actividad biológica muy considerable según sus promedios y desviaciones estándar, se determinó que ésta sí depende del momento o los momentos en los que se aplique al cultivo y que el estímulo de crecimiento no se presenta de igual manera en la parte vegetativa y en su rendimiento, incluso en algunos casos comenzó a ser inversamente proporcional el estímulo de crecimiento en la planta y el rendimiento obtenido.

El aBS-4 bajo el tratamiento denominado como T1 en este trabajo de investigación si incrementa el rendimiento de cultivo, este tratamiento consistió en la aplicación del aBs únicamente en la semilla antes de la siembra, esto se demuestra debido a que fue quien presento los valores más altos en cuanto a la obtención de cosecha se refiere, y de manera homogénea tanto en la planta como en la cosecha, aunque no obtuvo el tiempo más corto desde la siembra hasta el inicio de la floración si quedo por debajo del control negativo, es decir que si redujo el tiempo de floración de un cultivo normal de frijol.

Por otra parte el aBs-18 también incrementa el rendimiento del cultivo, sin embargo lo hace bajo el tratamiento denominado en este trabajo de investigación como T2 que consistió en la aplicación del aBs en la semilla antes de la siembra y una aspersión durante el crecimiento vegetativo de la planta, para este aBS el estímulo de crecimiento no se presentó de manera homogénea en la cosecha y en la planta esto se determinó debido a que los parámetros que a la estructura de la planta se refieren no se incrementan, lo que nos indica que se obtuvieron plantas más pequeñas pero con similar incremento en el rendimiento del cultivo que el aBS-4.

Tanto el aBs4 como el aBs18 según su promedio y desviaciones estándar demostraron ser consistentes en la actividad biológica de los bioensayos realizados por nuestro equipo de trabajo a pesar de las diferentes variedades de

arroz con los que se trabajó. Por lo tanto el aBs4 aplicado únicamente en la imbibición de la semilla y el aBS-18 aplicado en la semilla antes de la siembra y una aspersion en la etapa vegetativa de la planta son candidatos idóneos para ser evaluado en condiciones de campo abierto.

Como dato adicional se sugiere hacer estudios de aBs 4 bajo el tratamiento T3, en plantas o vegetales en las que el consumo o principal objetivo sea el crecimiento de la estructura de la planta debido a los excelentes resultados que presento en estos parámetros evaluados.

## **XV. Bibliografía.**

---

**Acosta**, A.W., 2005, Evaluación de diferentes dosis de Biobras-16, en el cultivo de tomate variedad “vita” en las condiciones edafoclimáticas de la provincia Granma. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, pp. 89-95.

**Andrade**, R. M. L., 2013, Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la inclinación de la lámina de arroz y en los cultivos de frijol, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp.35-36.

**Arrieta**, L., 2011, Revisión de literatura brasinoesteroides, Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía., Vol. II, pp. 1-11.

**Bajguz**, A. y Hayat, S., 2009, Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 47, pp. 1–8.

**Beebe**, S.; González, A.V. y J. Rengifo. 2000. Research on trace minerals in the common bean. *Food and Nutrition Bull.* 21:387-391.

**Betancour**, M.J. y Davila, J. E., 2002. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): Cultivo, beneficio y variedades. FENALLCO., Medellín, Colombia.

**Broughton**, W.J.; Hernandez, G.; Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil.* 252: 55-128.

**Costales**, D.; Nápoles, M. C.; Falcón, A. y Núñez, M., 2008, Influencia de un análogo de brasinoesteroide sobre la nodulación de plántulas de soya (*Glycine max (L) Merril*), *Cultivos Tropicales*, Vol. 29, No. 2, pp. 65-69.

**Clouse**, S. D., 1996, Plant hormones: Brassinosteroids in the spotlight, *Current Biology*, Vol. 6, pp. 658-661.

**Clouse**, S., 2001, Brassinosteroids, *Current Biology*, Vol. 11, No. 22, pp. R904.

**Delgadillo**, S. F., 2002, Validación de los efectos de los brasinoesteroides en el rendimiento del frijol en Guanajuato, Informe de avances del Proyecto 171/01, Fundación Guanajuato produce A. C., pp. 1-14.

**FAO**, La FAO en México, 2009, Representación de la FAO en México, pp.37.

**FAO**, 2012, El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación, ISBN 978-92-5-307317-7pp. 39-47.

**Fernández**, H. M. A., 2010, Síntesis de derivados esteroidales con actividad biológica: anticancerígenos y promotores del crecimiento vegetal, Tesis Doctorado, BUAP, pp. 273-283.

**Gómez**, S. D. M., 2013, Efecto de análogos de brasinoesteroides en la lámina de arroz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, pp. 39-52.

**Halliday**, K. J., 2004, Plant hormones: The interplay of brassinosteroids and auxin. *Current Biology*, Vol. 14, pp. R1008–R1010.

**Hasan**, S. A.; Haestructurayat, S.; Ahmad, A., 2011, Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars, *Chemosphere*, Vol. 84, pp. 1446-1451.

**Hidalgo**, P. N., 2012, Efecto de análogos de brasinoesteroides en frijol (*phaseolus vulgaris*), Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, pp. 44-55.

**Izquierdo**, O. H., 2011, Actividad biológica de los brasinoesteroides y sus análogos en las plantas, Instituto Nacional de ciencias Agrícolas, Temas de Ciencia y Tecnología, Vol. 15, No. 43, pp. 45-50.

**Izquierdo**, O. H.; González, C. M.C.; Núñez, V. M.; Álvarez, B. R., 2012, Efectos de la aplicación de un análogo espiroestano de brasinoesteroides en vitroplantas de banano (*Musa spp.*) durante la fase de climatización. Ministerio de educación superior, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Vol. 33, No. 1, pp. 71-76.

**Malíková, J.;** Swaczynová, J.; Kolár, Z.; Strnad, M., 2008, Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids, *Phytochemistry*, Vol. 69, pp. 418-426.

**Mitchell, J. W.;** Mandava, N.; Worley J. F.; Plimmer, J. R.; Smith, M. V., 1970, Brassins a New Family of Plant Hormones From Rape Pollen, *Nature*, pp. 1065-1066.

**Moreno, C. A.,** 2010, Efecto de análogos de brasinoesteroides en diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L.) criollo, Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, BUAP, pp. 79

**Núñez, M.,** 1999, Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura, *Cultivos Tropicales*, Vol. 20, No. 3, pp. 63-72.

**Núñez, M. y Arsuaga, J.,** 1999, Influencia de análogos de brasinoesteroides cubanos en el rendimiento de diferentes variedades de papa en condiciones de producción, pp. 1-9.

**Núñez, M. y Mazorra, L.,** 2001, Revisión bibliográfica, los brasinoesteroides y la respuesta a las plantas al estrés, *Cultivos Tropicales*, Vol. 22, No. 3, pp. 19-26.

**Núñez M., Mazorra L.M, Martínez L., González C.M. y Robaina C.** 2007. Análogos de brasinoesteroides revierten parcialmente el impacto del estrés salino en el crecimiento inicial de las plántulas de dos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*. 28(2):95-99.

**Pérez, L. B. F.,** 2010, Efecto de análogos de brasinoesteroides en monocotiledoneas y dicotiledóneas, Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. BUAP, pp. 71-78.

**Pérez D.G., Restrepo M.R., Serrano G.M., Martínez S.G., Coll M.F. y León F.O.S.** 2002. Efectos ecotoxicológicos de un brasinoesteroide en bioindicadores de aguas dulces. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 21 (1): 13-20.

**Ram**, R. S. S.; Vidya, V. B.; Sujatha, E.; Anuradha, S., 2002, Brassinosteroids: A new class of phytohormones. *Current Science*, Vol. 82, No. 10, pp. 1239-1245.

**Rivera**, E. V., 2013, Efecto de análogos de brasinoesteroides en el bioensayo de la inclinación de la lámina de arroz (*Oryza sativa L.*). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. BUAP, pp. 29-49

**Sáenz**, C. L.; Córdova, L. I.; Rodríguez, P. F., 2006, Los brasinoesteroides. Una nueva clase de hormonas vegetales, *Academia Mexicana de Ciencias*, Vol. 57, No. 4, pp. 1-9.

**Salgado**, G. R.; Cortés, R. M. A.; Del Río, R. E., 2008, Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura, Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, No. 10, pp. 18-27.

**Soria**, L. N. G., 2011, Evaluación de Brasinoesteroides en el Cultivo del Rosal (*Rosa Spp.*) Variedad Freedom en el Cantón Patate Provincia Del Tungurahua. Universidad Técnica De Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica, pp.5-41.

**Teixeira**, Z. M. A.; Günter, A., 2002, Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications, *Journal of Plant Physiology*, Vol. 14, No. 3, pp. 83-121.

**Wada**, K.; Kondo, H.; Marumo, S., 1985, A simple bioassay for brassinosteroids: A wheat leaf-unrolling test, *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 49, No. 7, pp. 2249-2251.

**Yokota**, T., 1997, The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids, *Trends in Plant Science*, Vol. 2, pp. 137-143.

Páginas web consultadas:

**Estructura de un cloroplasto**, Disponible en <http://www.educarchile.cl>.

**Alda**, F. L., 2011, Regulación de la fisiología vegetal I: Las hormonas vegetales, disponible en: <http://b-log-ia20.blogspot.mx/>

**SIAP** (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2012. Cierre de la producción agrícola por estado. En: [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351).



## **XVI. Anexos.**

---

### **Anexo A. Preparación de las concentraciones de aBs**

1. Pesar 1 mg de aBS en balanza analítica y colocar en un matraz aforado de 100 mL previamente desinfectado.
2. Disolver el aBS en el matraz agregándose 2 mL de la acetona preparada al 2 %, comprobar que se ha disuelto completamente observando gotas al microscopio.
3. Calentar agua hasta llegar a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y mantenerla a esta temperatura para todas las soluciones.
4. Aforar a 100 mL con el agua caliente ( $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) al matraz que contiene el aBS disuelto en acetona. Esta será la solución madre al 10.0 mg/L de la cual derivarán las concentraciones necesarias siguientes.
5. De la solución madre del aBS a una concentración de 10.0 mg/L se toman 10 mL y se colocan en otro matraz de 100 mL y se aforan con agua a  $38^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  obteniendo una concentración del aBS de 1.0 mg/L.
6. A continuación del aBs a 1.0 mg/L se toman 10 mL colocándolos en un nuevo matraz se afora a 100 mL con el agua a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Con ello se obtienen 100 mL de aBS a una concentración de 0.1 mg/l
7. Posteriormente de la solución de aBs a 0.1 mg/L se toman 10 mL colocándolos en otro matraz de 100 mL, se afora con el agua caliente a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  obteniendo de esta manera 100 mL de aBS a una concentración de  $0.01\text{ mg/L} = 1 \times 10^{-2}$ .
8. Finalmente del aBs a una concentración de 0.01 mg/L se toman 10 mL colocándolos en un nuevo matraz de 100 mL, se afora con el agua caliente a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  obteniendo de esta manera 100 mL de aBS a una concentración de  $0.001\text{ mg/L} = 1 \times 10^{-3}$ .

## **Anexo B. Lista de material, equipos y reactivos utilizados.**

- Semillas de frijol de la zona de Tepeaca correspondiente a la cosecha 2013
- Análogos de brasinoesteroides: aBs4 y aBs18
- Epibrasinólida.
- Acetona al 2%.
- Hipoclorito de sodio (Cloralex®).
- Vasos de precipitados de 100 ml.
- Matraces aforados de 100 ml.
- Cámara de secado
- Balanza analítica (precisión 0.001 g).
- Balanza granataria
- Agua para riego
- Vernier
- Macetas de 30 cm de diámetro superior externo, 20 cm de diámetro inferior y 30 cm de altura
- Hilo tipo rafia.
- Bolsas de papel estraza # 25
- Mesas de soporte para invernadero.
- Vasos colectores de plástico de 100 ml.
- Cinta métrica (Truper®)
- Cartulina Blanca
- Pala
- Carretilla
- Manguera
- Escalera
- Parilla de calentamiento
- Pipeta de 1 mL.
- Pipeta de 10 mL

## Anexo C. Preparación de sustrato y método de siembra

El sustrato se preparó en las proporciones 3:2:1 de arena, grow-mix y cacahuatillo, se realizó agregando primero 3 carretilladas de arena, posteriormente se agregaron 2 carretilladas de grow-mix. Una vez que se tuvo estos dos componentes, se fue humectando el sustrato con agua y realizando la mezcla hasta tener un sustrato homogéneo.

Posteriormente se agregó el cacahuatillo y se realizó el proceso de mezclado manualmente con la pala hasta obtener un sustrato homogéneo y bien humectado al grado de poderse manipular para el llenado de macetas.



Una vez obtenido el sustrato se procedió al llenado de macetas. Primero se colocó una cama de aproximadamente 5 cm de cacahuatillo de mayor tamaño al utilizado en el sustrato para retener la humedad y una vez que la planta creciera las raíces quedarán bien sujetas. Después se colocó aproximadamente 7.5 kg. de sustrato a cada maceta y estas fueron colocadas en las mesas de soporte del invernadero.



Una vez que todas las macetas quedaron en su lugar se procedió a realizar un riego a saturación. Finalmente se realizó la siembra de la semilla a una profundidad de 3 cm. Realizando el orificio únicamente con un lápiz y posteriormente cubriendo la semilla con el mismo sustrato sin dejar a la semilla muy apretada en el sustrato.

#### Anexo D. Método de imbibición de las semillas.

Para realizar la imbibición de las semillas se utilizaron vasos colectores de 100 mL.

Se colocaron 30 ml del aBS a las concentraciones especificadas y en el caso del control negativo únicamente se agregaron 30 mL de agua destilada.



Posteriormente se depositaron las semillas de frijol durante 3 h a una temperatura constante de 25 °C, al retirarlas se colocaron sobre papel absorbente para retirar el exceso y finalmente se procedió a la siembra.

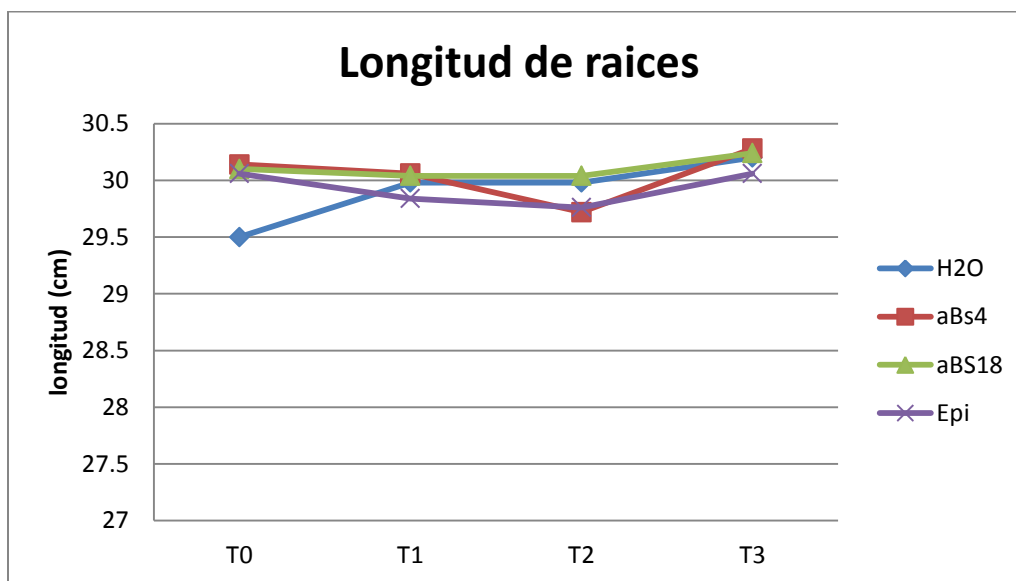


## Anexo E. Resultados de longitud de raíces.

Los resultados obtenidos para la longitud de las raíces de la planta se mostraron sin cambios significativos como se puede observar en la tabla.

	T0	T1	T2	T3
H <sub>2</sub> O	29.5±0.63	29.98±0.75	29.98±0.57	30.2±0.70
aBS-4	30.14±1.17	30.06±0.88	29.72±0.94	30.28±0.87
aBS-18	30.1±0.80	30.04±0.80	30.04±0.86	30.24±0.45
EpiBS	30.06±1.12	29.84±0.80	29.76±0.99	30.06±0.27

**Longitud de raíces.** Muestra los promedios y desviación estándar de los resultados obtenidos en la longitud de las raíces expresada en cm.



**Gráfico de longitud de raíces.** Muestra los resultados obtenidos de la longitud de raíces.

En el gráfico de longitud de raíces se puede observar cómo los resultados se mantuvieron sin cambios significativos; alcanzaron longitudes de 30.28±0.87 cm, esto indica que las raíces del experimento crecieron hasta encontrar las paredes de la maceta y la cama de cacahuatillo que se colocó al fondo de cada maceta. Esto ocurrió de manera similar en los aBs y los controles sin presentar cambios en sus longitudes.

## Anexo F. Fotografías del experimento.



Macetas con riego a saturación minutos antes de la siembra.



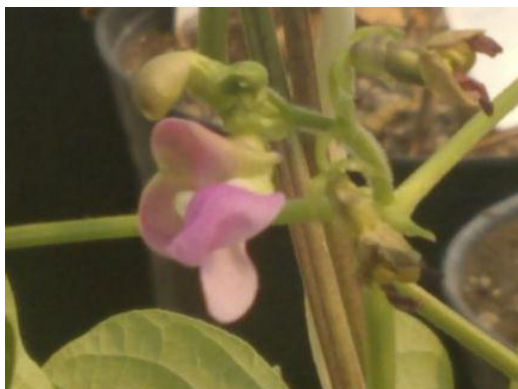
Plántula de frijol tratada con aBS-4 bajo tratamiento T1 a los 7 DDS



Plántula de frijol tratada con aBS-18 bajo tratamiento T1 a los 14 DDS



Planta de frijol tratada con aBS-18 bajo tratamiento T2 a los 50 DDS



Aparición de primera flor en planta de frijol tratada con aBS-18 bajo el tratamiento T1.



Vaina de frijol de planta tratada con aBS-18 bajo el tratamiento T2