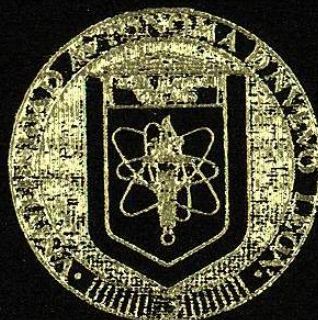


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



GIBERELINAS: EFECTO DE LA FUENTE DE
CARBONO SOBRE SU PRODUCCION EN
GIBBERELLA FUJIKUROI ATCC-12616
UTILIZANDO UN SISTEMA DE FERMENTACION
SOLIDO POR LOTES PREPARADO A BASE DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN:
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA

MARTHA ALICIA SUAREZ HERRERA

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1993

TM

Z5521

FCQ

1993

S9



1020074482

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



GIBERELINAS: EFECTO DE LA FUENTE DE
CARBONO SOBRE SU PRODUCCION EN
GIBBERELLA FUJIKURU ATCC-12616
UTILIZANDO UN SISTEMA DE FERMENTACION
SOLIDO POR LOTES PREPARADO A BASE DE
RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN:
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

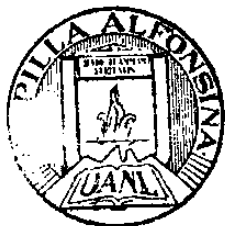
P R E S E N T A

MARTHA ALICIA SUAREZ HERRERA

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1993

TM
Z5521
FCQ
1993
S9

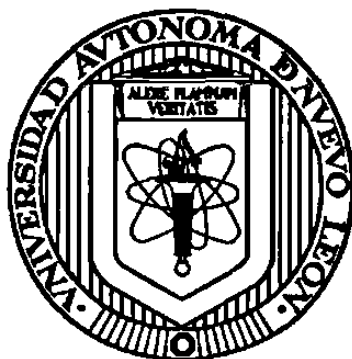


FONDO TESIS

24282

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



GIBERELINAS; Efecto de la fuente de carbono sobre su producción en *Gibberella Fujikuroi* ATCC-12616 Utilizando un sistema de fermentación sólido por lotes, preparado a base de residuos agroindustriales.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA
MARTHA ALICIA SUAREZ HERRERA

Q.I. ANDRES CERDA ONOFRE
Director de la Facultad de
Ciencias Químicas, U.A.N.L.
P r e s e n t e . -

Mediante este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis elaborada por la Q.F.B. Martha Alicia Suárez Herrera, titulada:

"GIBERELINAS: EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE SU PRODUCCION POR *Gibberella fujikuroi* ATCC-12616 UTILIZANDO UN SISTEMA DE FERMENTACION SOLIDA POR LOTES PREPARADO A BASE DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES."

ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado académico de:
MAESTRO EN CIENCIAS, ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL en virtud de haber cumplido integralmente con el reglamento de tesis vigente.


A T E N T A M E N T E
El Comité Dictaminador:


M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo
Asesor


Dr. Benito Pereyra Alferez
Sinodal


MC. Gabriel Gallegos Morales
Sinodal

Vo. Bo.


Dra. Maribel Suárez Cárdenas
Coordinadora de la Escuela de Graduados
en Ciencias

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo. Con el apoyo de la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la Secretaría de Educación Pública bajo el Convenio No. 090-01-0343-568-01.

DEDICATORIA

A Jesús: sin palabras.

A mis padres: Arturo y Ma. Elena que con su ejemplo me supieron transmitir el espíritu de trabajo y constancia para alcanzar un ideal.

A mis hermanos: Humberto, Blanca, Juanita, Arturo, María del Rosario, José Angel, Martín y Alejandro por su comprensión y cariño.

A mi esposo, Bruno Manuel: porque con su amor y apoyo profesional y moral, me ha ayudado a alcanzar varias metas de mi vida.

A mi hija, María Lourdes: por la motivación, cariño y alegría recibidos de su parte al compartir el tiempo que le pertenece para llegar al final de esta tesis.

A mi maestra: Q.F.B. Célida Luz Hinojosa Caballero por haber confiado en mis capacidades y por el honor de contar con su amistad.

A mis amigos y compañeros de trabajo, cuyos nombres no hace falta decir, que con su lealtad, cariño, espíritu de servicio y apoyo incondicional me han ayudado a mantenerme de pie, o a levantarme cada vez que caigo.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mi asesor, el M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo por su apoyo y entusiasmo, que fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Al Q.I. Andrés Cerda Onofre, Director de la Facultad de Ciencias Químicas, por el apoyo proporcionado para el desarrollo de esta trabajo.

Al Dr. Erardo M. Elizondo Villarreal y a la Dra. Maribel Suárez Cárdenas, por la asesoría brindada en diferentes aspectos de esta tesis.

A la Q.F.B. Hilda Corina Garza González por las facilidades que me otorgó para el cumplimiento de esta meta.

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a que alcanzara esta meta de mi vida profesional.

Giberelinas: Efecto de la fuente de carbono sobre su producción por *Gibberella fujikuroi* ATCC-12616 utilizando un sistema de fermentación sólida por lotes preparado a base de residuos agroindustriales.

RESUMEN:

Se desarrollaron cultivos de *Gibberella fujikuroi* en agar dextrosa y papa, incubándolos a 28°C. Se procedió a probar diversos medios de cultivo para inducir a la esporulación del hongo.

Se desarrolló una fermentación en estado sólido por lotes durante 7 días a 28°C. Se comparó el crecimiento, y la producción de ácido giberélico utilizando como medio de soporte salvado de trigo y masilla (grano agotado del proceso de maceración de la malta) suplementando el medio con almidón soluble, almidón de maíz o glucosa como fuente de carbono.

Se eligió la determinación de glucosamina para estimar los rendimientos de biomasa durante la fermentación.

Durante las primeras 48 h. de fermentación se presentaron diferencias significativas en el crecimiento al variar tanto la fuente de carbono como el soporte, pero al final de la fermentación el crecimiento alcanzado se igualó en todos los casos.

Simultáneamente, durante el proceso se hicieron extracciones con solventes para tratar de separar las

giberelinas de los medios de cultivo.

Para determinar la presencia de GA₉, se hicieron cromatografías en placa delgada y bioensayos con semillas de cebada.

Analizando los resultados obtenidos, puede observarse que con almidón de maíz o glucosa como fuente de carbono la producción de ácido giberélico fué mayor que con almidón, independientemente del soporte utilizado. Así mismo la masilla resultó ser el mejor soporte, ya que permite la producción más alta de ácido giberélico con las fuentes de carbono probadas.

Por consiguiente, la producción mayor se presentó en el medio con masilla como soporte y almidón de maíz como fuente de carbono.

Se recomienda continuar con la investigación en esta línea ya que los resultados sugieren que la producción de ácido giberélico pueden lograrse buenos rendimientos con sustratos muy económicos.

INDICE GENERAL

	PAGINA
Resumen.	
Indice General.	
1.0 Introducción.	1
1.1 Generalidades.	3
1.1.1 Giberelinas.	3
1.1.2. Mercado Nacional.	4
1.1.3 Las giberelinas como metabolitos secundarios.	4
1.1.4 Biosíntesis de giberelinas en <i>Gibberella fujikuroi</i> .	5
1.1.5 Tipos de fermentaciones reportadas para la producción de GAs.	6
1.1.5.1 Fermentación sumergida.	6
1.1.5.2 Fermentación semisólida.	7
1.1.6 Influencia de las condiciones de fermentación en la producción de giberelinas.	10
1.1.7 Métodos reportados para la purificación e identificación de GAs.	13
1.2. Objetivos.	20

2.0	Material y Métodos.	21
2.1	Microorganismo.	21
2.2	Inóculo.	21
2.2.1	Producción del cultivo esporulado.	21
2.2.2	Determinación de la población en el inóculo.	22
2.3	Procedimiento fermentativo	22
2.4	Muestreo.	23
2.5	Medios de cultivo.	23
2.6	Métodos analíticos.	24
2.6.1	Crecimiento.	24
2.6.1.1	Hidrólisis ácida.	24
2.6.1.2	Determinación de glucosamina.	25
2.6.2	Determinación de ácido giberélico	26
2.6.2.1	Extracción.	26
2.6.2.2	Bioensayo	27
2.6.2.3	Cromatografía en placa fina.	28
3.0	Resultados y discusión.	30
4.0	Conclusiones.	37
5.0	Bibliografía	39
6.0	Apéndice	51

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
Tabla #1: Datos físicos y químicos de algunas giberelinas importantes.	52
Tabla #2: Actividad biológica del ácido giberélico.	53
Tabla #3: Usos comerciales del ácido giberélico en agricultura y horticultura.	54
Tabla #4: Distribución del consumo de ácido giberélico en México en 1989.	55
Tabla #5: Principales compañías productoras de giberelinas.	56
Tabla #6: Composición de los medios de cultivo sólidos.	57
Tabla #7: Composición de la solución de sales minerales.	58

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Fig. #1: Efecto del ácido giberélico sobre la producción de amilazas y liberación de azúcares reductores.	59
Fig. #2: Origen y valor comercial de las importaciones de ácido giberélico en México, 1991 y 1992.	60
Fig. #3: Importaciones de ácido giberélico en México, 1978 - 1988.	61
Fig. #4: Biosíntesis.	62
Fig. #5: Corte longitudinal de un grano de cebada.	63
Fig. #6: Morfología microscópica de <i>Gibberella fujikuroi</i> (macroconidios y microconidios).	64
Fig. #7: Curva patrón de glucosamina para la determinación de	65

crecimiento.

- Fig. #8: Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en salvado de trigo. 66
- Fig. #9: Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en masilla. 67
- Fig. #10: Cromatografía en placa fina de GAs y muestras problema. 68
- Fig. #11: Efecto de la fuente de carbono (salvado de trigo-almidón) en la producción de giberelinas. 69
- Fig. #12: Efecto de la fuente de carbono (salvado de trigo-glucosa) en la producción de giberelinas. 70
- Fig. #13: Efecto de la fuente de carbono (salvado de trigo-almidón de maíz) en la producción de giberelinas. 71
- Fig. #14: Efecto de la fuente de carbono (masilla-almidón) en la produc 72

ción de giberelinas.

- Fig. #15: Efecto de la fuente de carbono (masilla-glucosa) en la producción de giberelinas. 73
- Fig. #16: Efecto de la fuente de carbono (masilla-almidón de maíz) en la producción de giberelinas. 74
- Fig. #17: Efecto de la fuente de carbono en la producción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi*. 75
- Fig. #18: Efecto de la fuente de carbono en la producción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi*. 76
- Fig. #19: Producción de giberelinas y crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en trigo-almidón de maíz en un cultivo batch. 77
- Fig. #20: Producción de giberelinas y crecimiento en *Gibberella fujikuroi* en masilla-almidón de maíz en un cultivo batch. 78

1.0. INTRODUCCION:

El ácido giberélico es un regulador de crecimiento vegetal. El mercado nacional es creciente, y dado que en su totalidad se importa, causó una erogación superior a un millón de dólares en 1991, por lo que es importante que se optimice un proceso para la producción del mismo, aprovechando la capacidad que tienen algunos microorganismos de producirlo. Por otro lado la producción de ácido giberélico representa una opción atractiva al ser un metabolito secundario de origen microbiano de alto valor agregado.

El ácido giberélico puede producirse por fermentación sumergida o sólida. La fermentación en estado sólido por lotes es un proceso sencillo y ofrece rendimientos superiores a los obtenidos por fermentación sumergida (38).

Varios residuos agroindustriales sirven como sustrato en la fermentación sólida, lo que constituye un atractivo económico importante, ejemplos de ellos son el salvado de trigo y el grano agotado del proceso de maceración de la malta en la industria cervecera (masilla) (19). Dado que su contenido de nutrientes es incompleto con un suplemento adecuado de sales minerales y carbohidratos la masilla podría constituir un medio de

un medio de cultivo con las características deseables para soportar crecimiento microbiano y producir giberelinas. El uso potencial de la masilla es relevante ya que se produce en grandes volúmenes y no hay reportes de su reutilización en fermentación.

El objetivo de esta investigación es probar la capacidad del hongo *Gibberella fujikuroi* para producir ácido gibrélico a partir de salvado de trigo y masilla.

Se pretende que este estudio, de pie a una serie de proyectos encaminados a la producción de giberelinas en México.

1.1. GENERALIDADES:

1.1.1 Giberelinas.

Las giberelinas son hormonas vegetales, que pueden ser producidas directamente por el hongo filamentosos *Gibberella fujikuroi*. Naturalmente, este hongo causa la enfermedad "bakanae" del arroz, cuyos síntomas son semejantes a muchas otras enfermedades producidas por hongos del género *Fusarium* (33, 64). En general, *G. fujikuroi* produce una mezcla compleja de sustancias estructuralmente relacionadas. Ciertas cepas producen únicamente la giberelina A₃, conocida comúnmente como ácido giberélico.

La estructura del GAs y otras giberelinas se muestra en la Tabla 1 (12).

El GAs es el compuesto más importante del grupo de las giberelinas, este ácido es sólido cristalino blanco, soluble en agua cuando no excede de 5g/l. Es fácilmente soluble en solventes orgánicos tales como etanol, metanol, acetato de etilo, acetato de butilo y acetona. Es estable cuando se seca pero inestable en soluciones acuosas. La vida media de las soluciones acuosas, es del orden de 14 días a 20°C y 2h a 50°C. En soluciones acuosas, el GAs tiene un pH de 3.0 o 4.0

La producción de ácido giberélico por fermentación

es un proceso industrial importante, ya que el GAs presenta un espectro de actividades biológicas muy variado (Tabla 2 y Figura 1). Su uso principal es como estimulante del crecimiento de plantas (Tabla 3). (1, 3, 4, 17, 18, 23, 32).

1.1.2 Mercado nacional.

El ácido giberélico que se utiliza actualmente en México, es importado de Estados Unidos, Reino Unido, Hong Kong y China (Figura 2 y Tabla 4).

Las principales compañías productoras de giberelinas se citan en la tabla 4.

En nuestro país, el ácido giberélico es utilizado, principalmente en la industria cervecera y agrícola (Tabla 5). El volumen de consumo es evidentemente creciente ya que en una década aumentó más de un 600 % (figura 3).

1.1.3 Las giberelinas como metabolitos secundarios.

La biosíntesis de muchos productos fúngicos, entre los que se encuentra el GAs, no esta correlacionada con el crecimiento del microorganismo, a tales productos se les conoce como metabolitos secundarios (49).

La producción por fermentación de giberelinas es un

ejemplo clásico de producción de metabolitos secundarios (62). La producción económica de metabolitos secundarios requiere, que una proporción máxima de los nutrientes disponibles esté dirigida a la formación del producto y un mínimo a la formación de biomasa. Así, en el caso de la fermentación giberelínica, la producción tiene lugar una vez que el micelio ha alcanzado su máximo crecimiento (24, 33).

1.1.4 Biosíntesis.

La mayoría de estudios dirigidos a esclarecer las rutas biosintéticas del ácido giberélico se han basado en el aislamiento y caracterización de productos finales de fermentaciones. En otros estudios se emplearon precursores marcados, y así, se elucidaron las rutas metabólicas.

Ahora se conocen las principales etapas de la ruta biosintética. Como puede verse en la Figura 4, dicha ruta consta de tres etapas principales.

La primera etapa es común a la biosíntesis de diterpenos y consiste en la condensación de unidades de acetato, vía acetil-Co-A, a través de mevalonato a geranilpirofosfato y posteriormente vía farnesilpirofosfato a geranilpirofosfato.

En la segunda etapa, hay ciclización del geranilgeranilpirofosfato para dar lugar al ent-kaureno.

En la tercera etapa, los compuestos derivados del kaureno se modifican por contracción del anillo seguido por varias hidroxilaciones y oxidaciones para formar el ácido giberélico (33, 59).

1.1.5 Tipos de fermentación reportadas para la producción de GA₃.

1.1.5.1 Fermentación sumergida.

El primitivo método japonés, de producción se basa en el cultivo superficial de *G. fujikuroi* en medio líquido, pero los resultados obtenidos por este método no eran muy alentadores, ya que, después de períodos prolongados de incubación, se producía una gran variedad de compuestos, generalmente con bajo rendimiento en giberelinas (64).

Posteriormente, el desarrollo de técnicas de fermentación sumergida con agitación y aireación para la producción de antibióticos, sugirió su aplicación para la obtención del ácido giberélico. Los científicos japoneses e ingleses emplearon la fermentación por agitación en una sola etapa y los norteamericanos el procedimiento de

fermentación en tres.

Posteriormente, se mejoraron las cepas e hicieron cambios en las condiciones de fermentación, tales como modificar los constituyentes del medio de cultivo, con el fin de optimizar la fermentación. En 1965, Hole y Zacharias describieron la producción de GAs por fermentación sumergida en continuo, y reportaron niveles de producción específicos tan altos como aquellos obtenidos en condiciones semejantes de fermentación sumergida por lote (29).

En 1979, se hizo hincapié en que la técnica de fermentación sumergida, para la producción de GAs, estaba aproximándose al punto de saturación, más allá del cual la mejora económica del proceso era difícil, de tal manera que resultó conveniente explorar otros caminos para mejorar la economía en la producción de GAs (35).

El obstáculo económico más grande en la producción de GAs por fermentación sumergida, es el hecho de que el producto se encuentra muy diluido, lo que conlleva a altos costos de procesamiento para la separación del producto y la eliminación de grandes volúmenes de agua de desecho (37).

1.1.5.2 Fermentación en estado sólido.

En años recientes, en todo el mundo se ha generado un gran interés por las fermentaciones en estado sólido. Comparando la producción de GAs por sustrato sólido y fermentación sumergida, se indica que hay un mayor rendimiento por el último método (38). Además de la mayor productividad, la fermentación en sustrato sólido ofrece muchas otras ventajas económicas y prácticas.

Entre las económicas está el costo más bajo del medio de cultivo y de operación del proceso industrial (20,38,48).

Las fermentaciones en estado sólido, son aquellas en las cuales el crecimiento microbiano y la formación de producto se llevan a cabo en las superficies de sustratos sólidos que incluyen productos agrícolas como arroz, trigo, mijo, cebada, maíz, soya, etc. con contenidos de baja humedad (65). La fase sólida puede proporcionar una fuente rica y compleja de nutrientes y además un soporte para el crecimiento microbiano.

En las fermentaciones en estado sólido, se pueden obtener condiciones selectivas para el crecimiento fúngico humedeciendo los sólidos con medio a bajo pH y con alta densidad de inóculo de esporas (28).

Las ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido respecto al cultivo sumergido se resumen a continuación:

- Ventajas de la fermentación en estado sólido sobre el cultivo sumergido.

- Los sustratos sólidos pueden requerir únicamente la adición de agua. Se pueden añadir otros nutrientes.

- Recipientes de fermentación relativamente pequeños usan poca agua, el sustrato está concentrado.

- Los tanques del inóculo son innecesarios y se puede usar un inóculo de esporas.

- La baja humedad reduce el problema de contaminación bacteriana.

- La aireación se facilita por espacios entre las partículas de sustratos y partículas de la mezcla.

- El rendimiento de producto puede ser mucho más alto que en el medio líquido y es reproducible.

- Los sólidos fermentados se pueden extraer inmediatamente por adición directa de solventes o se pueden mantener en estado congelado antes de la extracción.

- Los métodos de sustrato sólido se pueden usar para proporcionar medioambientes de poco efecto de corte para hongos filamentosos sensibles a ese efecto.

- Desventajas de la fermentación en estado sólido respecto a la fermentación sumergida.

- Los sustratos sólidos naturales, generalmente, requieren de alguna clase de pretratamiento para hacer sus constituyentes químicos más accesibles y su estructura física más susceptible a la penetración del micelio.
- Puede ser necesaria una suplementación de nutrientes para proporcionar un medio complementario para iniciar la producción de biomasa, síntesis de enzimas inducibles, proporcionar condiciones de crecimiento balanceado o prolongar la producción de metabolitos secundarios.
- La agitación debe ser suficientemente lenta para que no se afecte el nivel de crecimiento fúngico pero, la expansión del sustrato puede disminuir la eficiencia de agitación del sustrato sólido durante el cultivo.
- Hay dificultades analíticas para medir cambios físicos, químicos y biológicos durante la fermentación, sin embargo se pueden hacer mediciones automáticas del consumo de O₂ y CO₂.
- Es difícil separar la biomasa microbiana a partir de los sustratos sólidos residuales, ya que el micelio está fuertemente unido al sustrato (43, 50, 53, 55).

1.1.6 Influencia de las condiciones de fermentación en la producción de giberelinas.

La producción exitosa en un metabolito fúngico requiere de un conocimiento detallado de las características del crecimiento y de la fisiología del hongo en cuestión. Cada hongo tiene su propio desarrollo anatómico, morfológico y fisiológico. Para una máxima formación del producto en cada fermentación se deben establecer las condiciones de incubación precisas y el estado adecuado de desarrollo (11). Se ha comprobado que las condiciones óptimas para la formación de GAs se dan en cultivos en los que se restringe la fuente de nitrógeno, mientras se desarrolla el micelio al metabolizar una fuente de carbono (8, 9).

Como fuente de nitrógeno se ha utilizado preferentemente nitrógeno amoniacal y como fuentes alternas se han utilizado semillas de cereales o de otras plantas (33).

En cuanto a la fuente de carbono es deseable un proceso de liberación lenta para evitar represión catabólica.

Por otra parte, se ha demostrado que la sacarosa es mejor que la glucosa como fuente de carbono, pero también se pueden utilizar harinas y aceites vegetales los cuales pueden contener precursores de la molécula de GAs (24).

También se requiere de Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{-3} y SO_4^{-2} , que se encuentran como impurezas en las fuentes naturales de carbono y nitrógeno. Sin embargo algunas veces es necesario adicionarlas (8, 9).

La temperatura óptima para la producción de GA₃ es 29° C, arriba de esta temperatura hay un descenso rápido en la producción (33).

La producción de GA₃ es independiente del pH en el intervalo de 3.0-5.5, pero fuera de este intervalo, la velocidad de producción y productividad decrecen (8, 9).

Stodola et al (1955) observaron que en medios con pH inicial entre 2 y 3, con una tendencia hacia la acidificación, se producen las giberelinas A₁ y A₂, mientras que a pH 7, se incrementa la producción de las giberelinas A₄, A₇, A₁₂, A₁₄ y A₁₆ (64).

El medio ambiente gaseoso afecta significativamente la velocidad de formación de la biomasa y de biosíntesis del producto en el estado sólido. Nos puede proporcionar una manera de monitorear la actividad biológica en la fase líquida por determinaciones de parámetros tales como O₂, CO₂, temperatura y humedad, además proporciona una base importante para el desarrollo de sistemas adecuados de control del proceso para obtener medio ambientes

microbianos más estables en fermentaciones en estado sólido (20).

1.1.7 Métodos reportados para la purificación e identificación de GAs.

La separación y cuantificación de la familia de las giberelinas ha recibido mucha atención en la literatura.

Los sistemas de ensayo usados inicialmente en los estudios de las giberelinas se basaron en sus efectos en las extensiones de los tejidos de plantas (1, 3, 4, 17, 18, 23, 32).

El aislamiento de una giberelina presente en gran cantidad puede efectuarse, generalmente, por cromatografía de adsorción repetida. La separación de otro tipo de giberelinas las cuales son componentes menores y a menudo químicamente muy similares, es muy difícil y requiere el uso de cromatografía de partición así como de cromatografía de adsorción (21).

En el proceso original para el aislamiento de giberelinas, se usó adsorción por carbón seguido por lavado y adición de un solvente, generalmente acetona. Numerosos procesos describen el uso de resinas de intercambio iónico con extracciones en base a solventes. Todos los

procesos de solventes dependen de la extracción en condiciones ácidas (pH 2-4). Las patentes de Pfizer and Co. (1959) y de ICI (1959) mostraron que el acetato de etilo y la metilisobutilcetona eran efectivos. Las etapas de purificación a escala comercial pueden basarse en sistemas reguladores de solventes (12).

Más tarde, se investigó el uso de columnas de ácido silícico y carbón activado para la purificación de extractos crudos. La técnica de cromatografía de partición mostró ser particularmente útil en la separación de giberelinas a partir de mezclas que no se resolvieron por cromatografía de adsorción repetida (60).

Muchos investigadores han obtenido productos puros a partir de extractos crudos por los métodos antes descritos (25, 26). Sin embargo, en algunos casos, fue necesario purificar posteriormente una fracción obtenida por cromatografía en columna, por el método de cromatografía en placa delgada y menos comúnmente por cromatografía en papel.

La cromatografía en placa delgada es un método efectivo para identificar la mayoría de giberelinas si hay disponibilidad de muestras de referencia de giberelinas. MacMillan y Suter (1963) separaron mezclas de 9

giberelinas diferentes sobre sílica gel y kieselguhr usando varios sistemas de desarrollo diferentes (45, 46).

Las giberelinas son detectadas después de la cromatografía por su fluorescencia y color después de calentar con un reactivo adecuado. El reactivo que se emplea más comunmente es ácido sulfúrico concentrado, aplicado por atomización como una solución al 5% en etanol, y calentando a 120°C por 10 minutos (Jones et al 1963).

Con el advenimiento de la HPLC se desvió el interés de los métodos cromatográficos tradicionales de capa delgada y se enfocó en la técnica más nueva (6, 31).

Para muestras de matrices complejas (medios de cultivo, tejidos de plantas), puede ocurrir obstrucción de la columna, requiriendo limpieza extensiva o reemplazamiento frecuente de columnas gastadas. Se ha desarrollado un método de cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC). Para determinaciones de valores de giberelinas A₃ y A₄, A₇ combinadas en caldos de fermentación (30).

La identificación de un compuesto químico tradicionalmente, requirió el análisis químico del compuesto, determinación del peso molecular y el cálculo

de la fórmula molecular. Los métodos de análisis más nuevos, incluyendo espectrometría de masas y espectrometría de resonancia magnético nuclear, han simplificado considerablemente los procedimientos de identificación y las giberelinas más nuevas se han caracterizado utilizando estas técnicas (54).

Ikekawa y Sumiki (1963) introdujeron la cromatografía de gas como un método de separación e identificación de giberelinas, usando columnas de polímero de metilsilicona y polímero fluorinado a base de alkisilicona. Con excepción de la giberelina A₃ todas las muestras dieron puntos agudos sin descomposición. Ellos demostraron que los tiempos de retención eran reproducibles y fueron capaces de estandarizar las columnas para todas las giberelinas usando únicamente un poco de los estándares de referencia ya disponibles (12).

La cromatografía de gas no ayuda por sí misma para trabajo preparativo, ya que solamente se pueden aplicar cantidades muy pequeñas de material si se requiere alta resolución. Wulfson y colaboradores (1965) investigaron el uso de espectrometría de masas de baja resolución en el análisis de mezclas de giberelinas que son difíciles de separar por cromatografía. Usando los metil y etil ésteres

de giberelinas A₁, A₃ y A₆ demostraron que los patrones de fragmentación son lo suficientemente diferentes para permitir la identificación de éstas giberelinas en una mezcla. Muchos investigadores obtuvieron datos de espectros de masa para alquil ésteres de giberelinas particulares y usaron ésta información para establecer la fórmula molecular de éstos compuestos.

MacMillan y colaboradores (1967) exploraron el uso de cromatografía de gas combinada con espectrometría de masas en la identificación de giberelinas presentes en extractos crudos de plantas. Ellos obtuvieron espectros de baja resolución de un extracto crudo metilado a partir de semillas inmaduras de *Phaseolus multiflorus*, después de la separación por cromatografía de gases, las giberelinas esterificadas en la mezcla fueron identificadas como giberelinas A₁, A₄, A₅, A₆ y A₈ (66, 67).

Las técnicas combinadas de cromatografía de gases y espectrometría de masas, son capaces de identificar giberelinas conocidas y detectar las desconocidas. MacMillan (1968) sostiene que la técnica, es capaz de estimar las cantidades totales de cada giberelina presente en un extracto crudo. La relevancia de tales valores para la cantidad de giberelinas presentes, dependerán de la efi-

ciencia de la extracción, purificación preeliminar y procedimientos de metilación (7, 10, 22).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear fue usada para confirmar la estructura del ácido giberélico propuesto por Cross y colaboradores (1959). El diseño y disponibilidad de mejor equipo permitió a la espectroscopía usar cantidades mucho más pequeñas de material, y ahora ésta técnica, se puede usar para giberelinas obtenidas en cantidades de miligramos (61).

Los métodos de I.R., espectrofotométricos U.V., fluorométricos y de bioensayos, son, probablemente, los mejores para la estimación de GAs en medios de fermentación o en forma cruda, considerando que pueden utilizarse una gran variedad de otros métodos para su estimación.

Los bioensayos se han utilizado para estudiar el contenido de giberelinas en plantas.

Debido a que las hormonas de plantas en la mayoría de extractos se encuentran en trazas, la detección fisicoquímica directa es imposible durante las primeras etapas de purificación.

En el caso de las giberelinas la detección en las últimas etapas de purificación, es difícil debido a la

baja longitud de onda y bajo coeficiente de extinción de absorción de luz U.V. de estos compuestos. En estas situaciones, los bioensayos se han usado para detectar las giberelinas y para monitorear el proceso de purificación (12).

Estudios preliminares hechos por Kumar (36) han indicado que los métodos analíticos rutinarios dan respuestas pobres, a no ser que el extracto crudo del hongo, obtenido por fermentación en sustrato sólido, sea altamente purificado. Sin embargo, productos microbianos tales como micotoxinas pueden ser estimados por espectrofluorodensitometría con gran precisión, sin recurrir a una purificación extensiva (36).

1.2.- OBJETIVOS:

1.2.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi* ATCC-12616 en un sistema de fermentación sólida por lotes a base de residuos agroindustriales.

1.2.2 Objetivos particulares.

1) Probar la capacidad de esporulación del hongo en varios medios de cultivo con vista a la preparación de inóculo.

2) Diseñar el sistema de inóculo.

3) Estandarizar técnicas para la determinación cualitativa y cuantitativa de ácido giberélico.

4) Evaluar la capacidad de *G. fujikuroi* para producir ácido giberélico, utilizando salvado de trigo o el grano agotado del proceso de maceración de la malta como sustratos.

2.0.-MATERIAL Y METODOS:

2.1 Microorganismo.

El microorganismo utilizado fue el hongo *Gibberella fujikuroi* ATCC - 12616, cuya conservación se efectuó por resiembras periódicas realizadas cada mes en agar inclinado dextrosa y papa (PDA). Se incubó a 28°C, una vez desarrollado, se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 2 a 8°C.

2.2 Inóculo.

Se utilizaron esporas suspendidas en medio líquido de carboximetilcelulosa con una concentración de 1.5×10^6 U.F.C./ml (13, 15).

El inóculo se utilizó a una concentración del 8% v/p en base al peso del salvado de trigo o masilla en el medio de cultivo, esto es, 3 ml de cultivo líquido esporulado a cada matraz con 25 g de medio.

2.2.1 Producción del cultivo esporulado.

A un cultivo maduro de *Gibberella fujikuroi* en PDA inclinado se le añadió 5 ml de solución salina estéril y se agitó vigorosamente para hacer una suspensión del cultivo.

Se inocularon 3 ml de medio caboximetilcelulosa suplementado y 1% de CaCO_3 con 0.2 ml de la suspensión micelial, se incubó a 28°C y 200 rpm durante 96 h para inducir la esporulación. (13, 15, 56, 57).

2.2.2 Determinación de la población en el inóculo.

La determinación del número de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) en el inóculo, se hizo por medio de la técnica de cuenta viable en placa, utilizando el medio de PDA suplementado con ácido tartárico al 10% para ajustar el pH de 3.5 ± 0.1 . El análisis se hizo por triplicado (14).

2.3 Procedimiento fermentativo

La fermentación tuvo lugar en matraces de 250 ml con 25 g de medio de cultivo a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con una duración de 7 días en condiciones estáticas; en el transcurso de los cuales se tomaron muestras diariamente para determinar la cinética de crecimiento por el método de glucosamina, (2, 27), y la detección de GAs por técnicas cromatográficas y bioensayo (30, 36, 34).

2.4 Muestreo.

El muestreo se efectuó cada 24 horas separando 2 matraces por tiempo por condición. Las muestras se almacenaron a -13°C , y posteriormente se les determinó biomasa y ácido giberélico. Se utilizó toda la muestra de un matraz para cada determinación.

2.5 Medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo probados se muestra en las Tablas (6 y 7) (39, 40).

Los ingredientes se pesaron por separado para cada matraz, y se mezclaron. El aceite de linaza se esterilizó a 170°C durante 2 horas, para asegurar que no fuese una fuente de contaminación se esterilizó además por filtración. Se adicionó la solución de sales minerales y se esterilizaron.

En las primeras fermentaciones los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 60 minutos y se tuvieron problemas de contaminación con hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neurospora* y *Rhizopus*; al aumentar el tiempo de esterilización a 90 minutos se evito la contaminación. (42). Una vez estériles, a temperatura ambiente se les adicionaron las soluciones

estériles de urea y sulfato de magnesio en condiciones asépticas.

2.6 Métodos analíticos.

2.6.1 Crecimiento.

La determinación de la biomasa fúngica se basa en medir el contenido de quitina a medida que avanza la fermentación. La proporción de quitina al peso del micelio varia con la edad, morfología y medio ambiente en el cuál crece el hongo.

La determinación de quitina es indirecta, ya que lo que se cuantifica es la glucosamina producida por hidrólisis ácida de esta (2, 27).

2.6.1.1 Hidrólisis ácida (conversión de quitina a glucosamina).

A la totalidad de la muestra contenida en el matraz Erlenmeyer se le adicionan 25 ml de HCl 6 N. El matraz se tapa y se coloca en un baño de agua a temperatura de ebullición (92° C) durante 12 - 15 h para efectuar la digestión del polisacárido. Una vez enfriado a temperatura ambiente, la muestra se filtra a través de

papel Whatman #1 para eliminar el residuo sólido. El filtrado se almacena a 4-10°C.

2.6.1.2 Determinación de glucosamina.

Fundamento :

Las hexosaminas se someten a una reacción de acetilación al incubarse con acetilacetona a 90°C. Una vez acetiladas, reaccionan con el p-dimetilaminobenzaldehído en solución alcohólica ácida a 65-70°C para formar un compuesto de condensación que absorbe a 560-570 nm. (5, 5B).

Reactivos:

Amortiguador de carbonatos pH 9.6 mezclar volúmenes iguales de NaHCO₃ 1.0 M y Na₂CO₃ 1.0 M.

Reactivo de acetilacetona:

Añadir 2.5 ml de acetilacetona redestilada a 50 ml del amortiguador de carbonatos. Este reactivo es estable por 2-3 horas a 18°C.

Reactivo de Erlinch:

Disolver 3.2 g de P-dimetilaminobenzaldehído en 60 ml de etanol y 60 ml de ácido clorhídrico.

Procedimiento:

Colocar en un tubo de ensayo 2.5 ml de muestra y

una gota de solución indicadora de fenolftaleína al 0.5% en etanol. Neutralizar con NaOH 1.0 M hasta el vire del indicador y ajustar el volumen a 5 ml con agua bidestilada. Añadir 2.5 ml de reactivo de acetilacetona, mezclar, tapar flojamente, calentar por 45 minutos en baño de agua a 90°C y enfriar en baño de agua. Añadir 6.5-12.5 ml de etanol seguido por 2.5 ml de reactivo de Erlinch; aforar a 25 ml con etanol, mezclar suavemente, incubar en baño de agua a 65-70°C durante 10 minutos y reposar 1-2 h a temperatura ambiente. Leer a 530 nm (espectrofotómetro Coleman Jr II 6/20).

2.6.2 Determinación de ácido giberélico.

2.6.2.1 Extracción de GA₃.

El medio de cultivo se trató con una solución acuosa de etanol al 10% ajustando el pH a 2.5 con HCl concentrado. La relación de medio de cultivo a solvente fue 1:5. (37, 41). El tiempo de contacto fue 1 h a 25°C con agitación continua utilizando un agitador de hélice. Se filtró a través de papel Whatman # 41. Los extractos se concentraron a vacío en un rotavapor. El concentrado se recuperó con 3 ml de metanol y se almacenó a 10°C.

2.6.2.2 Bioensayo.

Fundamentos:

La batería de enzimas (alrededor de 18) requeridas para la licuefacción eventual de las reservas almacenadas en el grano de cebada derivan principalmente de la capa aleurona. (Fig. 5). Y muchas de ellas son controladas de alguna manera por las giberelinas. (47). El grano seco generalmente contiene niveles muy bajos de giberelinas y, si estas se añaden al medio, pueden estimular a las células de aleurona a secretar una serie de enzimas hidrolíticas, en particular α -amilasa. (3). La actividad de la α -amilasa se determina mediante la cuantificación de los azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (51).

Procedimiento:

La actividad biológica se midió por determinación del endospermo de cebada pretratada. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. El pretratamiento consistió en remojar semillas de cebada en solución de hipoclorito de sodio 0.1 % pH 3.5 durante 2 h (63). Lavar con agua destilada, dejar reposar 18 h a 12°C y eliminar el embrión (44, 52). Partir longitudinalmente en dos partes la semilla. Se incubaron tres mitades de semillas de

cebada sin embrión en tubos de ensayo de 13x100 estériles conteniendo 0.1 ml de agua destilada estéril, 200 µg de estreptomina y 0.9 ml de muestra problema. Las semillas se incubaron por 72 h a 30°C (39). La mezcla de incubación se molió en un mortero con 11 ml de agua destilada (3) y se agitó por 5 minutos con 0.5g de amberlita. La mezcla homogénea se filtró con papel Whatman #41. A 3 ml de cada filtrado se le añadieron 3 ml de ácido 3,5-DNS, la solución se calentó a 100°C por 5 minutos y se midió la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340.

El ácido 3,5-DNS se preparó por adición de 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 20 ml de NaOH 2N y 50 ml de agua, seguidos por la adición de 30 g de tartrato de sodio y potasio y dilución de la solución a 300ml con agua destilada (39).

2.7.2.3 Cromatografía en placa fina.

Primeramente se prepararon placas de vidrio con sílica gel G, se secaron y activaron a 120°C durante una hora, se aplicó el estándar de GAs, al revelar se observaron señales muy difusas. Posteriormente se utilizaron placas de cromatografía de acrílico con sílica gel G

(Whatman 60 F 254) con un espesor de 0.2 mm activadas a 110°C durante 1 hr. Se aplicaron 5 µl del extracto concentrado y de soluciones estandar de ácido giberélico.

Paralelamente se probaron diferentes sistemas de solventes: cloroformo-acetato de etilo-ácido acético (5:4:1), metanol-acetona (8:2), éter isopropílico-ácido acético (95:5), benceno-ácido acético-agua (8:3:5), benceno-ácido propiónico-agua (8:3:5) y cloruro de metileno-metanol (8:2) (36).

Para visualizar a la luz U.V. los cromatogramas, se probaron dos métodos y dos soluciones de revelado. En el primer método (Kumar) se atomizaron los cromatogramas con una solución de ácido sulfúrico concentrado con 5% de etanol, se calentaron a 100°C durante 30 minutos y se observaron.

En el segundo método (Holt) el revelado se hizo colocando las placas de manera horizontal en una cámara saturada con ácido clorhídrico concentrado, durante 30 minutos, se secaron a 110°C durante 10 minutos y se visualizaron en luz U.V. tanto a longitud de onda corta como a larga (46).

3.0 RESULTADOS Y DISCUSION:

Al inicio de este trabajo se practicaron diferentes técnicas para hacer observaciones al microscopio del hongo *G. fujikuroi* conservado en agar dextrosa y papa. Este examen microscópico reveló un abundante crecimiento vegetativo y ausencia de esporas.

Por lo anterior, se procedió a probar diversos medios de cultivo para inducir la esporulación del hongo. El medio que dió mejor resultado fue el de carboximetilcelulosa (15).

Este medio fue suplementado con CaCO_3 al 1% y de esta manera a los cuatro días de incubación se obtuvo una producción de esporas más abundante que en el mismo medio sin el CaCO_3 .

El examen microscópico reveló la presencia de microconidios, macroconidios, clamidosporas y artrosporas (Fig. 6).

Una vez que se logró la esporulación, se separó micelio de las esporas, filtrando la suspensión a través de almohadillas de lana de vidrio de diferente espesor y contando en una cámara de Neubauer las esporas (16).

Para determinar las UFC/ml el medio que dió mejores resultados fue el de agar dextrosa y papa, ya que en el de Foster no se apreciaban bien las colonias y en el de Martin, el crecimiento fue muy lento.

Con respecto a los soportes que se utilizaron cabe hacer mención que, despues de una exhaustiva búsqueda de información nosotros no encontramos datos del uso de masilla como soporte.

A la masilla se le dió un pretratamiento de secado para eliminar humedad, pues cuando se usó directamente, no hubo crecimiento. El secado de masilla se realizó en estufa de secado y al sol, este último dió buenos resultados.

Para estimar los rendimientos de biomasa durante la fermentación, fue necesario medir la concentración de glucosamina en una muestra conocida de micelio seco (llevado a peso constante) para correlacionar la concentración de glucosamina al peso seco de la biomasa. De esta forma se encontró que un mg de glucosamina es igual a 37 mg de micelio seco (Fig. 7).

Una posible interferencia al usar glucosamina como una medida del crecimiento fúngico en sustratos complejos es la presencia de glucosamina en forma de glucoproteína en diferentes semillas. Sin embargo, esto no interfiere

con la determinación de la glucosamina total, ya que la cantidad de glucosamina procedente de las semillas es característica de las mismas y permanece constante durante la fermentación.

Al analizar los resultados obtenidos en las figuras 8 y 9 para el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de *G. fujikuroi* en un sistema batch, se puede observar que la formación de biomasa es mayor para los casos en que se emplea salvado de trigo que para los de masilla.

Durante las primeras 48 h de fermentación, se presentaron diferencias significativas en el crecimiento, al variar tanto la fuente de carbono como el soporte; siendo la mayor formación de biomasa para almidón-salvado de trigo, pero al final de la fermentación el crecimiento alcanzado se iguala en todos los casos.

Para ver que solvente resultaba mas adecuado para la extracción se llevaron a cabo varios experimentos utilizando un estandar de ácido giberélico y los solventes acetato de etilo, metanol, acetona y etanol a pH 2.5.

Después de la extracción se realizó una cromatografía y se observó que la emisión de fluorescencia a la luz ultravioleta por el estandar es la siguiente:

etanol > acetona > metanol > acetato de etilo.

De acuerdo a estos resultados se decidió utilizar etanol pH 2.5 para extraer el ácido giberélico de los medios de cultivo fermentados.

Los extractos crudos de los medios de cultivo una vez concentrados se aplicaron con micropipetas sobre las placas de silica gel; para llegar al procedimiento de cromatografía en placa delgada más adecuado, se probaron diferentes técnicas.

De todos los sistemas probados los que dieron mejores resultados fueron el de metanol-acetona y el de cloroformo-acetato de etilo-ácido acético, ya que se observó que en los demás sistemas o no se separaba la señal del punto de aplicación, o bien, la señal corría a la misma velocidad que el solvente. En el último sistema se logró mejor separación de los diferentes compuestos fluorescentes presentes en las muestras problema.

Con el método de Holt para revelado de las señales se obtuvieron mejores resultados que con el de Kumar, ya que los valores de Rf son más uniformes entre una determinación y otra. Además de que el manejo de las placas es más sencillo y con menor riesgo para quien está realizando la determinación.

Se observó que la cepa empleada co-produce otros reguladores de crecimiento de plantas, diferentes a ácido giberélico ya que se observaron en los cromatogramas manchas con diferentes valores de Rf y algunos emitieron fluorescencia a la longitud de onda utilizada para la determinación, pero solo una de éstas correspondió a ácido giberélico. El valor de Rf observado para GA₃ es de 0.5. con este sistema de eluentes (Fig. 10).

Para llevar a cabo el bioensayo, todo el material empleado se esterilizó y a la semilla de cebada se le dió un tratamiento de pregerminación para eliminar el embrión.

En las figuras 11 y 12 donde se grafican los mg de GA₃ por kg de medio de cultivo, se puede notar que la producción de GA₃ es más alta en masilla que en salvado.

Esto se debe probablemente, a que hay mejor transferencia de oxígeno y una eliminación de CO₂ más eficiente en la masilla, ya que en medio cuando se esteriliza en autoclave no se compacta; y el salvado de trigo si tiende a formar masas compactas después de la esterilización.

Para ambos soportes la mayor producción se presenta en almidón de maíz, seguido de almidón soluble y en menor cantidad en glucosa.

El que se obtenga mayor acumulación de GA3 en almidón de maíz que en almidón soluble tiene gran importancia económica, ya que el almidón soluble es más costoso que el almidón de maíz.

Si comparamos los resultados de producción de GA3 obtenidos en el presente trabajo, con los obtenidos por Kumar y colaboradores (45), podemos observar que en nuestro caso se tienen concentraciones al doble para salvado de trigo y cuatro veces mayores cuando se emplea masilla. Esto puede deberse (para el caso del salvado), a que en el presente trabajo la determinación se efectuó por bioensayo y Kumar y colaboradores utilizaron el método espectrofluorodensitométrico. Estos autores mencionan (43) que cuando la determinación se hace por el método espectrofotométrico, fluorométrico o bioensayo, los valores que se obtienen son más altos (al doble), debido a la presencia de otros compuestos fluorescentes diferentes a GA3 en los extractos crudos; y por estos métodos no es posible distinguir GA3 de esos compuestos interferentes.

En el presente trabajo no se les dió tratamiento de purificación a los extractos crudos, se usaron directamente y al correr las cromatografías se pudo observar más de una mancha fluorescente con lo cual se

confirma lo anterior.

Para el caso de la masilla aún considerando las observaciones de Kumar y colaboradores (43) los valores obtenidos siguen siendo muy altos.

4.0 CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos se concluye que:

- 1.- El hongo *Gibberella fujikuroi* ATCC-12616 es un buen productor de GAs en las condiciones de fermentación empleadas para el presente trabajo.
- 2.- El medio de carboximetilcelulosa suplementado con CaCO₃ al 1% es el adecuado para inducir a la esporulación al hongo *Gibberella fujikuroi* sin que se afecte la producción de GAs.
- 3.- Las condiciones de esterilización en autoclave empleadas, 121°C durante 90 minutos evitan la contaminación de los medios de cultivo por hongos durante el proceso.
- 4.- La extracción de GAs de los medios de cultivo es más eficiente con etanol pH 2.5.
- 5.- La técnica de cromatografía en placa delgada que ofrece los mejores resultados en la detección de GAs es la que emplea el sistema de eluentes cloroformo-acetato de etilo-ácido acético y como revelador ácido clorhídrico concentrado.
- 6.- La acumulación de biomasa es mayor en los medios que contienen salvado de trigo.

7.- El medio de cultivo de masilla-almidón de maíz es donde se obtienen mejores resultados de producción de GAs.

8.- Con el método de bioensayo se obtienen buenos resultados en la determinación de la concentración de GAs en los extractos crudos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aharoni N., Back A., Ben-Yehoshua S., and Richmond A.E. 1975. Exogenous gibberellic acid and the cytokininisopentenyladenine retardants of senescence in romaine lettuce. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100; 4-6.
- 2.- Aidoo, K.E.; Hendry, R. Wood, B.J.B. 1981 Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12; 6-9.
- 3.- Aniche G.N. and Palmer G.H. 1992. Influence of Gibberellic Acid (GA₃) on the development of amylolytic activities in rice during germination. Proc. Biochem. 27; 291-297.
- 4.- Asakawa Y., Tamari K., Shoji A. and Kaji J. 1974. Metabolic Products of Gibberellin A₆ and their interconversion in dwarf kidney bean plants. Agr. Biol. Chem., 38; 719-725.
- 5.- Ashwell G. Colorimetric analysis of sugars. Methods in Enzymology. 3; 96-97.

- 6.- Barendse, G.W.M.; Van de Werken, P.H. 1980. High-Performance liquid chromatography of gibberellins. *J. Chromatogr.* 198; 449-455.
- 7.- Binks R., MacMillan J. and Pryce R.J. 1969. Combined gas chromatography-mass spectrometry of the methyl esters of gibberellins A₁ to A₂₄ and their trimethylsilyl ethers. *Phytochem.* 8; 271-284.
- 8.- Borrow, A.; Brown, S.; Jefferys, E.G.; Kessell, R.H.J. 1964. The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* 10; 445-466.
- 9.- Borrow, A. Brown, S.; Jefferys, E.G.; Kessell, R.H.J. 1964. kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can J. Microbiol.*, 10; 407-444.
- 10.- Bowen D.H., Crozier A., MacMillan J. and Reid D.M. 1973. Characterization of gibberellins from light-grown *Phaseolus coccineus* seedlings by combined GC-MS. *Phytochem.* 12; 2935-2941.

- 11.- Brian P.W. and Grove J.F. 1957. The Gibberellic acid. *Endeavour*, 63; 161-171.
- 12.- Brückner Betting and Blechschmidt, D. 1991. The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnol.* 11; 163-192.
- 13.- Capellini, R.A.; and Peterson J.L. 1965. *Mycology Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria.* 57; 962-966. John Tuite. Ed. Burges Publishing Company.
- 14.- Carito, S.L.; Pisano, M.E. 1966. Production of Alanine by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Microbiol.* 14; 39-44.
- 15.- Carreón Chávez, L.M. Tesis. Inducción a la esporulación de *Gibberella fujikuroi*. Monterrey, N.L. 1993.
- 16.- Casas Campillo C. and Bautista M. 1965. Microbiological aspects in the hydroxylation of estrogens by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Microbiol.* 13; 977-984.
- 17.- Chary, S.J. and Reddy, S.M. 1985. Starch-Degrading Enzymes of two species of *Fusarium*, *Folia Microbiol.* 30; 452-457.

- 18.- Corgan J.N. and Widmoyer F.B. 1971. The effects of gibberellic acid on flower differentiation, date of bloom, and flower hardness of peach. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96; 54-57.
- 19.- Detroy, R.W. and Hesseltine C.W. 1978. Availability and utilization of agricultural and agroindustrial wastes. Proc. Biochem.
- 20.- Durand A., de la Broise D. and Blachere H. 1988. Laboratory scale bioreactor for solid state proc. J. Biotechnol. 59-66.
- 21.- Durley, R.C.; Crozier, A.; Pharis, R.P. and McLaughlin, G.E. 1972. Chromatography of 33 gibberellins on a gradient eluted silica gel partition column. Phytochem. 11; 3029-3033.
- 22.- Durley R.C., MacMillan J. and Pryce R.J. 1971. Investigation of gibberellins and other growth substances in the seed of *Phaseolus multiflorus* and of *Phaseolus vulgaris* by gas chromatography and by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochem. 10; 1891-1908.

- 23.-Gohliwar, C.S., Sethi, R.P., Marwaha, S.S. and Seghal, V.K. 1984. Gibberellic acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. Enzyme microb. technol., 6; 312-316.
- 24.- Grove, J.F. Gibberellins. In "Biochemistry of Industrial Microorganisms" 320-340. Ed. Rainbow C. and Rose, A.H. Academic Press, London and New York.
- 25.- Harada H. and Nitsch J.P. 1967. Isolation of gibberellins A₁, A₂, A₉ and of a fourth growth substance from *Althaea rosea* cav. Phytochem. 6; 1695-1703.
- 26.- Harrison D.M. and MacMillan J. 1971. Two new gibberellins, A₂₄ y A₂₅, from *Gibberella fujikuroi*, their isolation, structure, and correlation with gibberellins A₁₂ and A₁₅. J. Chem. Soc. 631-636.
- 27.- Hebert D., Phipps P.J., Strange R.E. 1972. Methods in Microbiology, Ribbons W. and Norris J.R. Ed. Vol 5b. Academic Press, New York.
- 28.- Hesseltine C.W. 1977. Solid state fermentation part. 1 Proc. Biochem. 24-31.

- 29.- Holme T., Zacharias, B. 1965. Gibberellic acid formation in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 7; 405-415.
- 30.- Holt Sackett, P. 1984. High-Performance thin-layer chromatography of gibberellins in fermentation broths. *Anal. Chem.* 56; 1600-1603.
- 31.- Horgan, R. and Kramers, M.R. 1979. High-performance liquid chromatography of cytokinins. *J. Chromatogr.* 173; 263-270.
- 32.- Jacobs W.P. and Pruett P.E. 1973. The time-course of polar movement of gibberellin through zea roots. *Amer. J. Bot.* 60; 896-900.
- 33.- Jefferys, E.G. 1970. The Gibberellin Fermentation in Hartman, P.A. *Adv. Appl. Microbiol.* 13; 283-316.
- 34.- Jones K.C., West C.A. and Phinney B.D. 1968. Isolation, identification and biological properties of gibberellin A₆ from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochem.* 7; 283-291.

- 35.- Kahlon, S.S. and Malhotra, S. 1986. Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. *Enzyme microb. technol*, 8; 613-616.
- 36.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1986. Spectrofluorometric estimation in thin-layer chromatography of gibberellic acid produced by solid state fermentation. *J. Chromatogr.* 369; 222-226.
- 37.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987. Extraction of Gibberellic acid from dry mouldy bran produced under solid state fermentation. *Proc. Biochem.* 139-143.
- 38.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987. Gibberellic acid by solid state fermentation: Consistent and improved yields. *Biotechnol. Bioeng.* 30; 267-271.
- 39.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987. Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnol. Lett.* 9; 179-182.
- 40.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1988. Batch and Fed Batch

solid state fermentation: Kinetics of cell growth, hydrolytic enzymes production, and gibberellic acid production. Proc. Biochem. 43-47.

41.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1988 Immobilized growing cells of *Gibberella fujikuroi* P-3 for production of gibberellic acid and pigment in batch and semi-continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28; 537-542.

42.- Kumar, P.K.R. and Lonsane B.K. 1990. Solid state fermentation: physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol, 34; 145-148.

43.- Lindenfelden L.A., Ciegler A. 1975. Solid substrated fermentor for ochratoxin a production. Appl. Microbiol. 323-327.

44.- Macey A., Stowell K.C. 1979. Practical studies on scientific control in commercial maltings. In Brewing Science. 1; 108-109.

45.- Macmillan, J. and Wels C.M. 1973. Partition

chromatography of gibberellins and related diterpenes on columns of Sephadex LH-20. J. Chromatogr. 87; 271-276.

46.- Macmillan J., Suter P.J. 1963. Thin layer chromatography of the gibberellins. Nature 790.

47.- Macris, B.J. and Markakis, P. 1981. Characterization of extracellular β -D- galactosidase from *Fusarium moniliforme* grown in whey. Appl. and Environ. Microbiol. 41; 956-958.

48.- Maddox, I.S. and Richert, S.H. 1977. Production of gibberellic acid using a dairy waste as the basal medium. Appl. Environ. Microbiol. 33; 201-202.

49.- Malik V.S. 1982. Genetic and biochemistry of secondary metabolism. Adv. Appl. Microbiol. 28; 27-107.

50.- Mandels M., Hontz L. and Nystrom J. 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol. Bioeng. 16; 1471-1493.

- 51.- Miller, G.L. 1959. The 3,5 Dinitrosalicylic acid Method
Anal. Chem., 31;426.
- 52.- Moll M. 1979. Analysis and composition of barley and
malt. In Brewing Science. 1; 54-56.
- 53.- Mudgett R.E. 1986 . Solid state fermentations. p66-83
Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. ASM
Washington, D.C.
- 54.- Murofushi N., Durley R.C. and Pharis R.P. 1974.
Preparation of radioactive Gibberellins A₂₀, A₅ y A₈.
Agr. Biol. Chem., 38; 475-476.
- 55.- Nagai S., Nishio N. 1980. Biochemical Engineering
problems on solid state culture. "Proceedings of the
oriental fermented foods". Foods Industry Research and
Development Institute, Hsinchu Taiwan, Republic of China.
- 56.- Nava Saucedo J.E., Barbotin J-N, and Thomas, D. 1989.
Physiological and morphological modifications in
immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelia. Appl. Environ.
Microbiol. 55; 2377-2384.

- 57.- Nava Saucedo, J.E., Barbotin, J-N and Thomas, D. 1989. Continuous production of gibberellic acid in a fixed-bed reactor by immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi* in calcium alginate beads Appl. Microbiol. Biotechnol, 30; 226-233.
- 58.- Phillipps H.D., Strange F.J. 1972. Methods in Microbiology. Ribbons W. and Morris J.R. Ed. Vol. 5B Academic Press, New York.
- 59.- Pitel, D.W.; Vining, L.C. and Arsenault, G.P. 1971. Biosynthesis of Gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. The sequence after Gibberellin A₄. Can. J. Biochem. 49; 194-200.
- 60.- Powell L.E. and tautvydas K.J. 1967. Chromatography of gibberellins on silica gel partition columns. Nature 292-293.
- 61.- Rivier, L.; Gaskin, P.; Albano, K-Y.-S. and MacMillan, J. 1981 GC-MS Identification on endogenous gibberellin conjugates as their permethylated derivatives. Phytochem. 20; 687-692.

- 62.- Smith-Berry. 1974. An Introduction to Biochemistry of fungal Development Academic Press, 282-308.
- 63.- Sosa-Coronel J. and Motes J.E. 1982. Effects of gibberellic acid and seed rates on pepper seed germination in aerated water columns. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107; 290-295.
- 64.- Stodola, F.H.; Raper, K.B. 1955. The microbial production of gibberellins A and X, Arch. Biochem. Biophys, 54; 240.
- 65.- Weiner B.A. 1977. Characteristics of aerobic, solid substrate fermentation of swine waste-corn mixtures. European J. Appl. Microbiol. 4; 51-57.
- 66.- Yamaguchi, I.; Fujisawa, S. and Takahashi, N. 1982. Qualitative and Semi-quantitative analysis of gibberellins Phytochem. 21; 2049-2055.
- 67.- Yamaguchi I., Yokota T., Murofushi N. and Takanashi N. 1975. Structure elucidation of Gibberellin A₃₂ and its acetone. Agr. Biol. Chem., 39; 2405-2410.

APENDICE

TABLA I

DATOS FISICOS Y QUIMICOS DE ALGUNAS GIBERELINAS

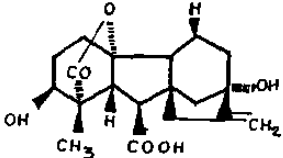
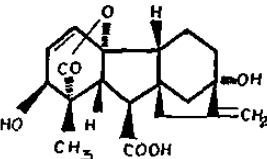
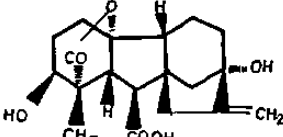
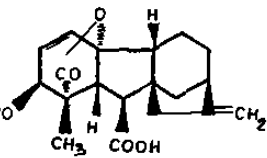
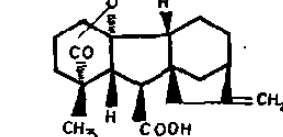
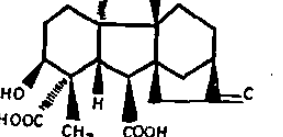
GIBERELINA	FORMULA	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR	PUNTO FUSION (°C)	ROTACION OPTICA () _D ²⁰
GA ₁	C ₁₉ H ₂₄ O ₆		348	255-258	+ 38°
GA ₃	C ₁₉ H ₂₂ O ₆		346	234-236	+ 92°
GA ₄	C ₁₉ H ₂₄ O ₅		332	214-216	- 3°
GA ₇	C ₁₉ H ₂₂ O ₅		330	169-172	+ 20°
GA ₉	C ₁₉ H ₂₄ O ₄		316	208-211	- 22°
GA ₁₃	C ₂₀ H ₂₆ O ₇		334	194-196	- 48°

TABLA 2 - ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS GIBERELINAS

- * PRODUCCION DE RAPIDO ALARGAMIENTO DE APICES E INTERNODULOS DE LAS PLANTAS.
- * HOJAS DE PLANTAS TRATADAS TIENEN COLOR MAS CLARO QUE LAS NO TRATADAS.
- * RAPIDO Y PROLONGADO ALARGAMIENTO DEL TALLO.
- * AUMENTO DE PESO TOTAL POR INCREMENTO EN FIJACION DE CARBONO EN CHICHARO Y TRIGO.
- * AUMENTO DE GROSOR DEL PECIOLLO DE LAS HOJAS Y AUMENTO EN PESO FRESCO Y SECO HASTA 50% EN APIO.
- * ACELERA DESARROLLO DE FLORES DALIA, ROSA, GERANIO, PETUNIA.
- * INCREMENTA EL CRECIMIENTO Y FORMACION DE RENUEVOS EN PLANTITAS JOVENES DE ARCE, ALAMO, ROBLE.
- * ESTIMULA LA GERMINACION E INCREMENTA LA CANTIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS (ALFA AMILASA) EN CEBADA, ARROZ, TRIGO.

TABLA 3 - USOS COMERCIALES DE ACIDO GIBERELICO EN AGRICULTURA Y HORTICULTURA.

CULTIVO	EFFECTOS	APLICACION	PAIS
CAÑA DE AZUCAR	INCREMENTAR EL RENDIMIENTO DE LA COSECHA A MAS DE 5TON. POR ACRE Y LA OBTENCION DE AZUCAR DE 0.2 A 0.5 TON. POR ACRE.	62G DE GA3 POR ACRE, APLICACION COMO CALDO, GIBERELINAS SEMIPURIFICADAS Y CRISTALINAS.	E.U. (HAWAII)
SEMILLAS DE PAPA	ESTIMULAR LA GERMINACION (PARTICULARMENTE UTIL EN CLIMAS CON 2 O 3 COSECHAS EN UNA ESTACION)	SUMERGIR INMEDIATAMENTE ANTES DE QUITAR LOS BROTES O PLANTAR.	INDIA
ALCACHOFAS	INCREMENTAR EL NUMERO DE FRUTOS POR PLANTA: ADELANTANDO LA COSECHA POR VARIAS SEMANAS.	120 ppm POR APLICACION FOLIAR.	CHIPRE, ESPAÑA, ISRAEL, ITALIA.
RUIBARBO	ESTIMULAR LA GERMINACION EN CULTIVOS TEMPRANOS, INCREMENTANDO EL RENDIMIENTO DE LOS TRONCOS.	APLICACION DE SOLUCION DE GA3 A LA CORONA DE LAS PLANTAS DE RUIBARBO.	REINO UNIDO
LUPULO	INCREMENTAR RENDIMIENTOS ARRIBA DEL 40%.	5 A 15 ppm POR APLICACION POR ATOMIZACION EN LA ETAPA DE ESCOBILLA O ANTES.	AUSTRALIA, E. U.
TOMATE	INCREMENTAR RENDIMIENTOS.	40G POR HECTAREA POR ATOMIZACION (2 A 3 VECES) EN LA FLORACION.	CHECOSLOVAQUIA.

TABLA 4 - DISTRIBUCION DE CONSUMO DE GA₃ EN MEXICO EN 1989 (AL MES DE JUNIO).

EMPRESA / PAIS	PRECIO (DOLARES)	VOLUMEN (KG)	VALOR COMERCIAL (DOLARES)
CERVECERIA CUAUHEMOC, S.A. ESTADOS UNIDOS	\$1,349.75	4.0	\$5,399
EQUIPAR, S.A. DE C.V. ESTADOS UNIDOS	\$330.00	0.1	\$33
INT. DE FERTILIZANTES, S.A.	\$798.20	5.0	\$3,991
SIN EMPRESA REGISTRADA REINO UNIDO	\$839.03	155.0	\$130,050
ICI MEX., S.A. DE C.V.	\$799.05	106.1	\$84,779
SIN EMPRESA REGISTRADA REINO UNIDO	\$773.73	159.6	\$123,488
LABORATORIOS HELIOS, S.A. DE C.V. ESTADOS UNIDOS	\$810.89	65.0	\$52,708
CEBADAS Y MALTAS, S.A. DE C.V. ESTADOS UNIDOS	\$1,251.60	35.0	\$43,806
BIOENZIMAS, S.A. ESTADOS UNIDOS	\$291.20	138.0	\$40,186
HONG KONG	\$293.76	45.0	\$13,219
	\$286.97	93.0	\$26,967
SIN EMPRESA REGISTRADA ESTADOS UNIDOS	\$758.07	30.0	\$22,742
TOTALES			
FUENTE: SECOFI, BANCOMEXT 1990			

TABLA 5 - PRINCIPALES COMPAÑIAS PRODUCTORAS DE GIBERELINAS.

COMPAÑIA	LOCALIZACION
ABBOTT LABORATORIES	NORTH CHICAGO, IL., U.S.A.
MERCK AND COMPANY, INC.	RAHWAY, N.J., U.S.A.
IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES	MANCHESTER, G.B.
PIERREL, S.P.A	MILAN, ITALIA
KYOWA HAKKO KOGYO	TOKIO, JAPON
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES	OSAKA, JAPON

TABLA 6 - COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS

SE PREPARO POR SEPARADO EL MEDIO DE CULTIVO PARA CADA MATRAZ (25G/MATRAZ) CON EL FIN DE FACILITAR LA HOMOGENIZACION DEL MISMO.

	A	B	C	D	E	F
SALVADO DE TRIGO (G/MATRAZ)	20	20	20	0	0	0
MASILLA (G)	0	0	0	20	20	20
ALMIDON SOLUBLE (G)	5	0	0	5	0	0
GLUCOSA (G)	0	5	0	0	5	0
ALMIDON DE MAIZ (G)	0	0	5	0	0	5
ACEITE DE LINAZA (ML)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
SOLUCION DE SALES MINERALES (ML)	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25
SOLUCION DE MgSO4 AL 37% (ML)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
SOLUCION DE UREA AL 7.5% (ML)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

TABLA 7 - COMPOSICION DE LA SOLUCION DE SALES MINERALES.

ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	70 ppm
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	70 ppm
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	70 ppm
HCL	16.90%

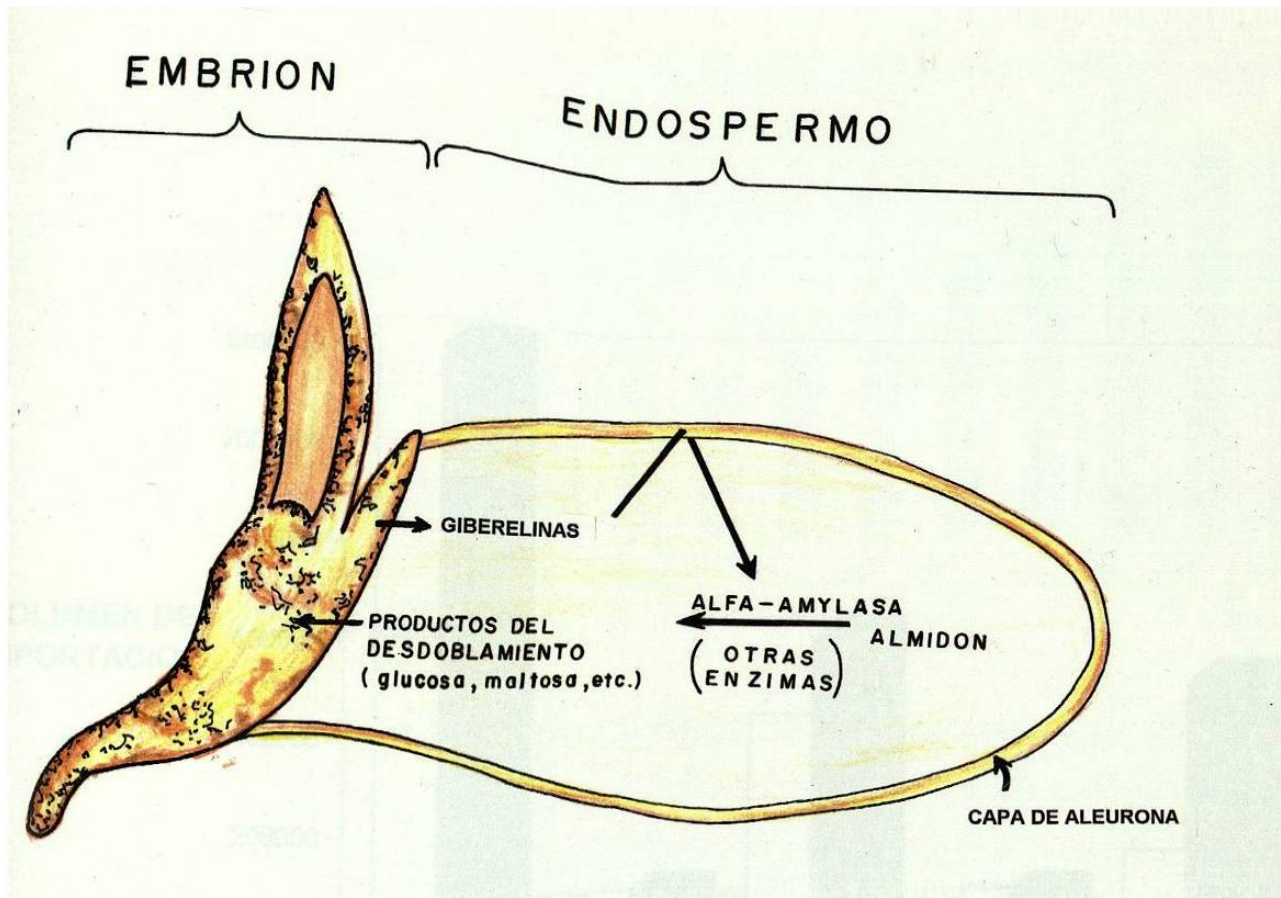


Fig. 1 Diagrama esquemático que ilustra algunos aspectos asociados con la hidrólisis de las reservas en la germinación de un grano de trigo (*Triticum sativum*) o cebada (*Hordeum vulgare gram*). La giberelina producida por el embrión estimula las células de la capa aleurona para sintetizar y secretar α -amilasa (y otras hidrolasas) que degrada almidón en el endospermo, proporcionando azúcares para la semilla que germina.

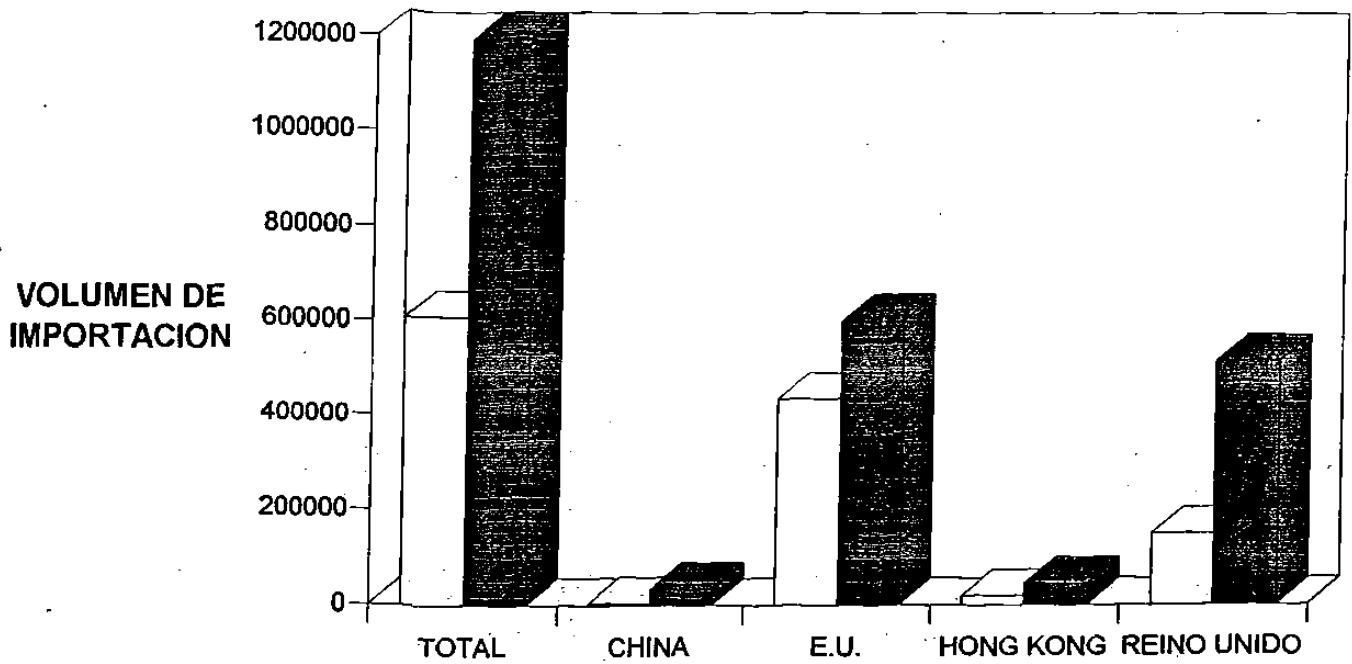


FIG 2 - ORIGEN Y VALOR COMERCIAL DE LAS IMPORTACIONES DE GA3 EN MEXICO 1991 Y 1992

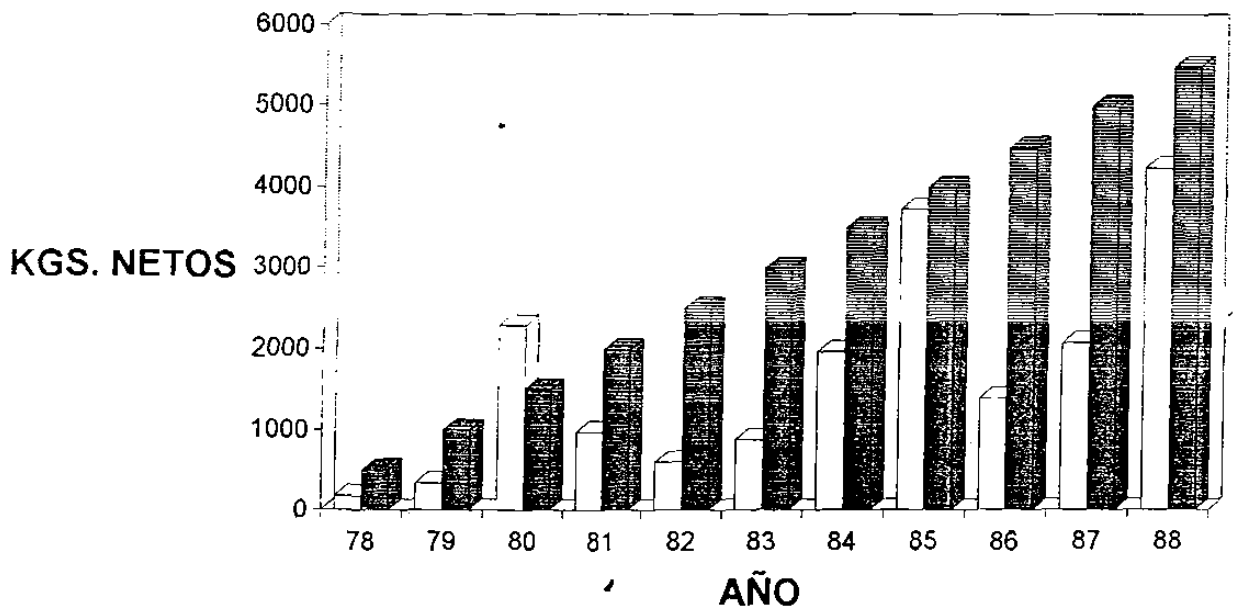


FIG. 3 - IMPORTACIONES DE GA3 EN MEXICO 1978-1988

AÑO
 KGS
 FUENTE: SECOFI, BANCOMEXT 1989

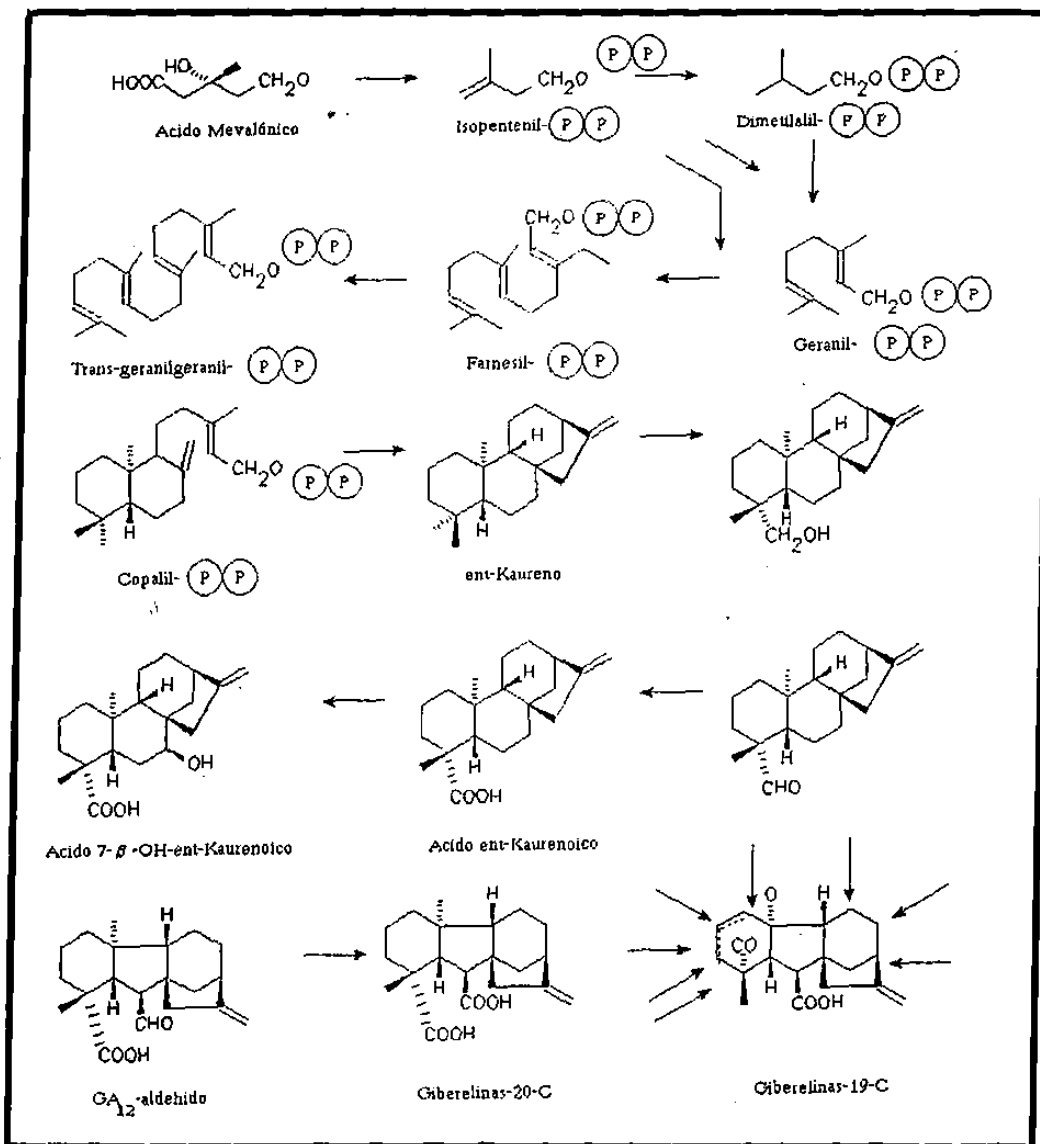


FIG. 4 BIOSINTESIS DE GIBERELINAS

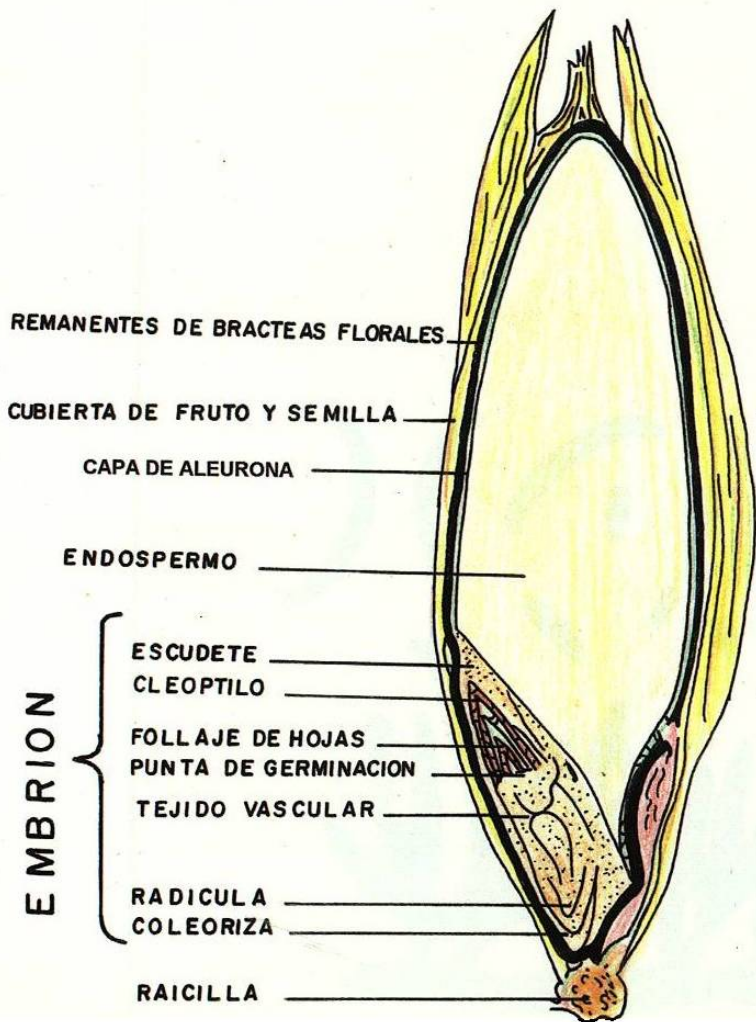


FIG. 5 CORTE LONGITUDINAL DE UN GRANO DE CEBADA

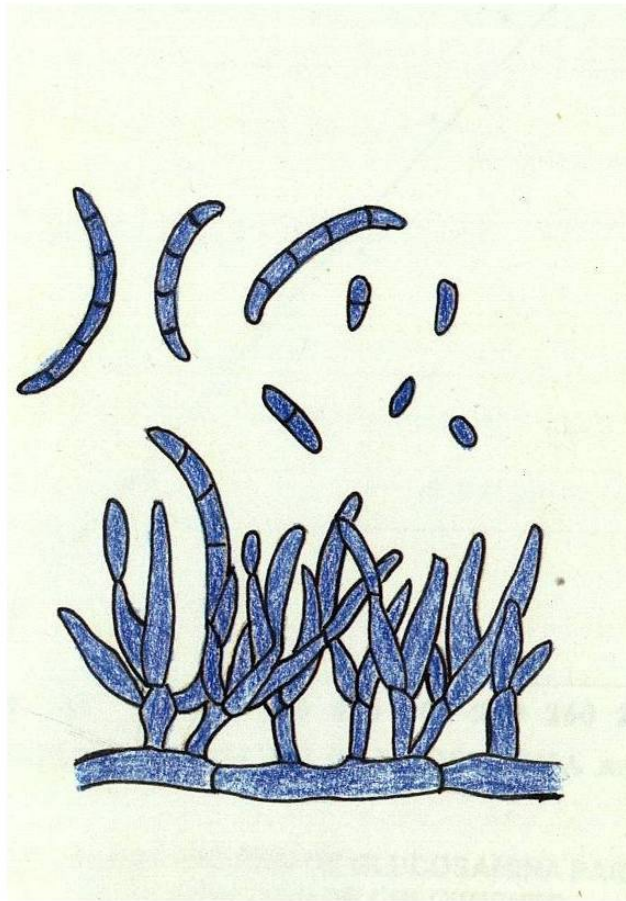


Fig. 6 Morfología microscópica de *Gibberella fujikuroi*
(macroconidios y microconidios)

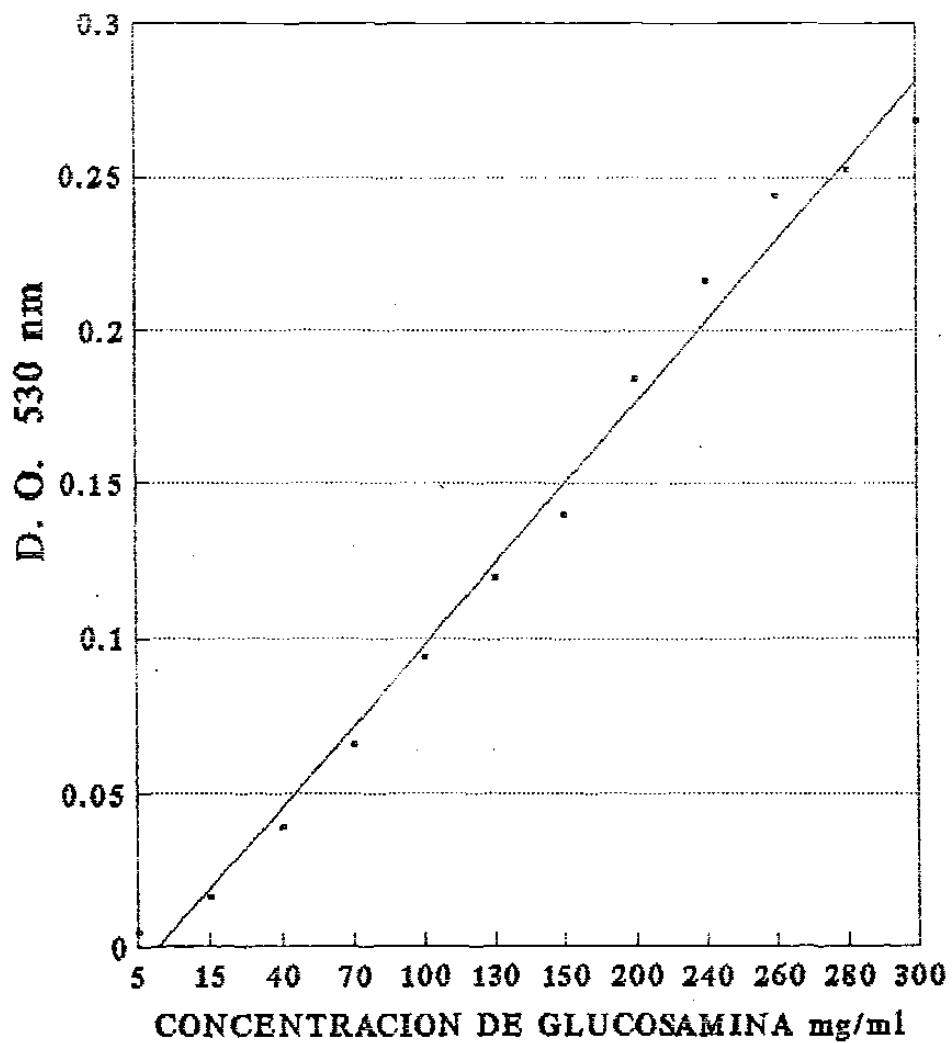


FIG. 7 CURVA PATRON DE GLUCOSAMINA PARA LA DETERMINACION DE CRECIMIENTO.

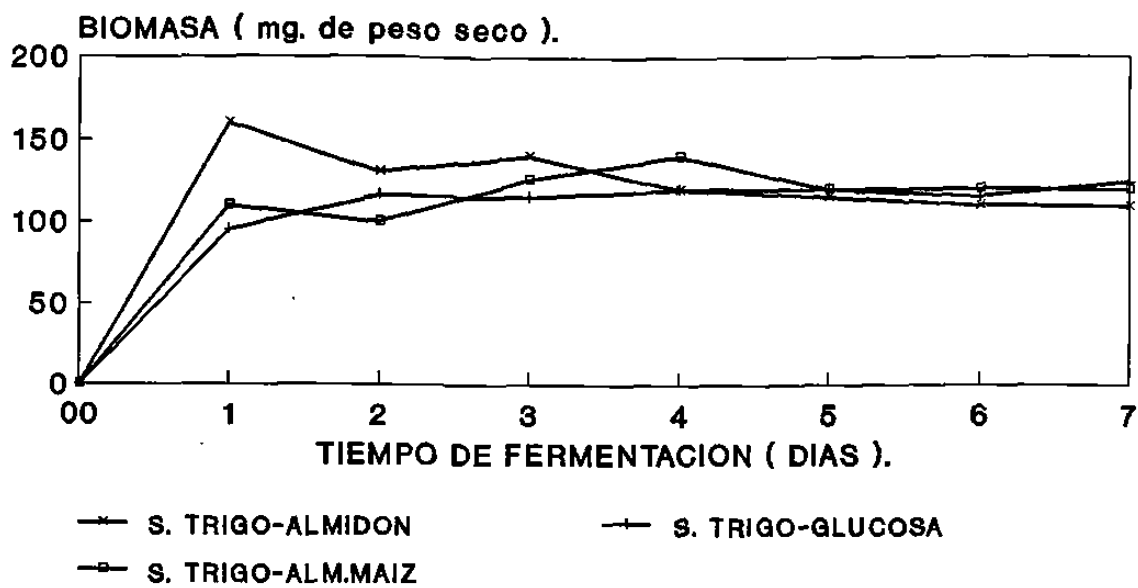


FIG. 8 - EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *G. fujikuroi* EN SALVADO DE TRIGO

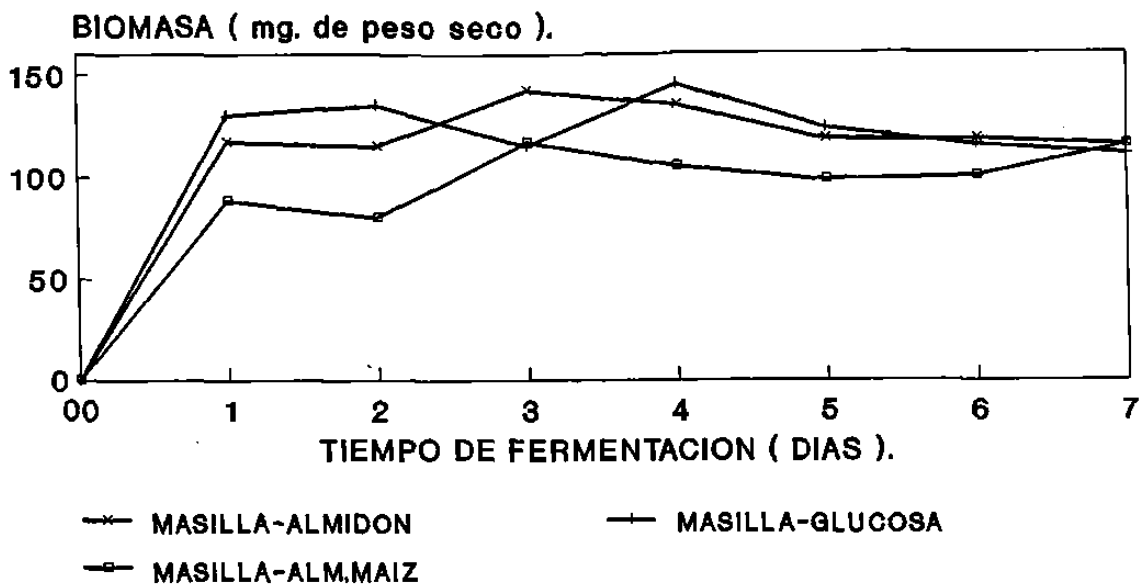
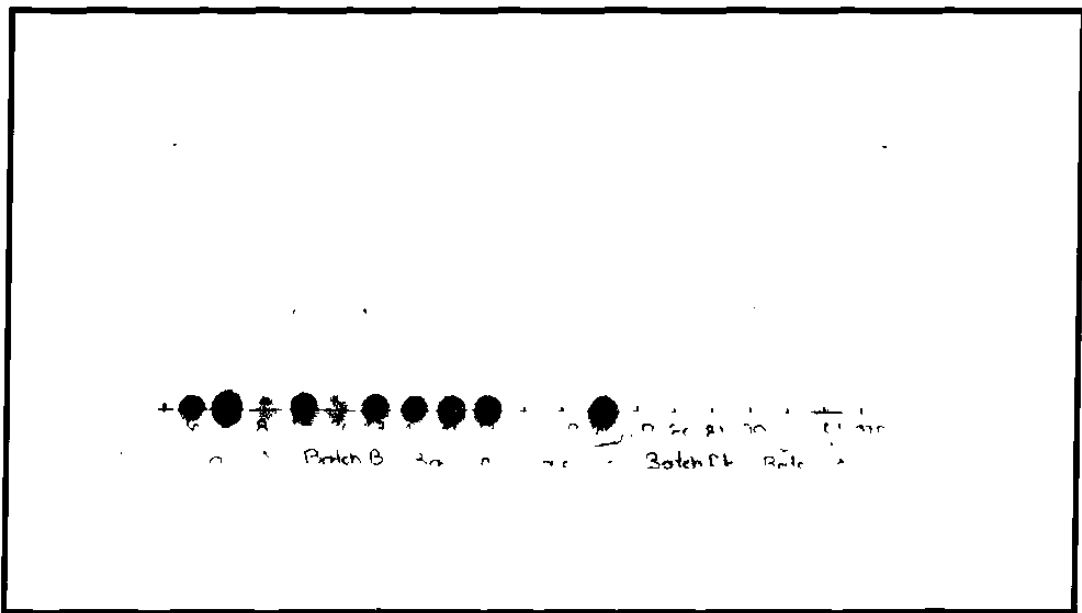


FIG. 9- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *G. fujikuroi* EN MASILLA



**FIG. 10 - CROMATOGRAFIA EN
PLACA FINA DE Ga_3 Y
MUESTRAS PROBLEMA.**

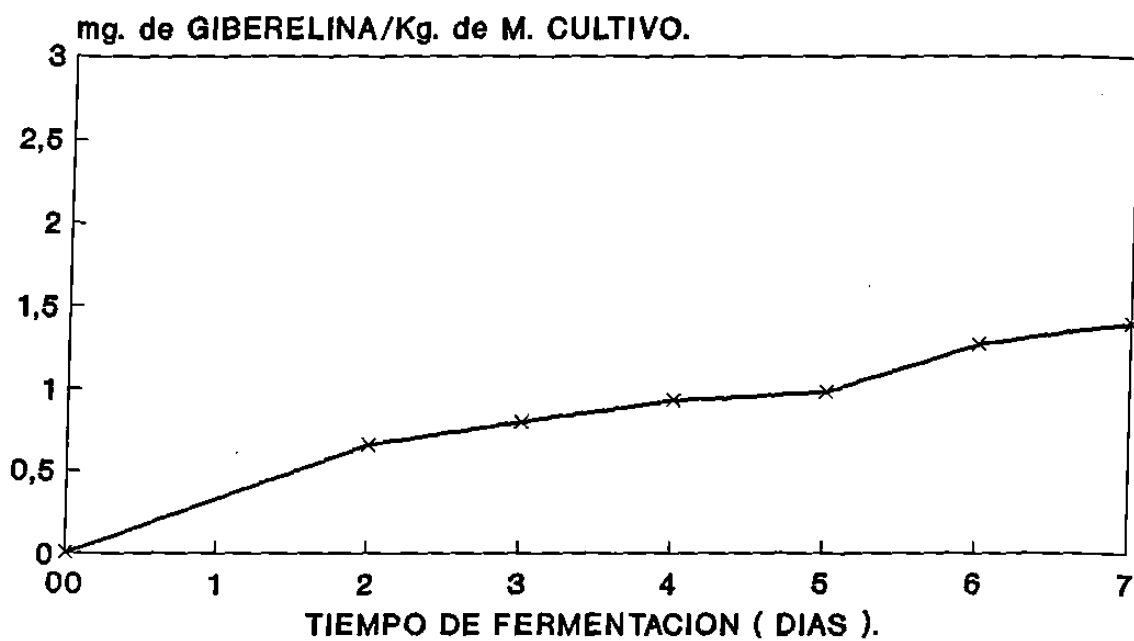


FIGURA 11.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO (SALVADO DE TRIGO-ALMIDON) EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS.

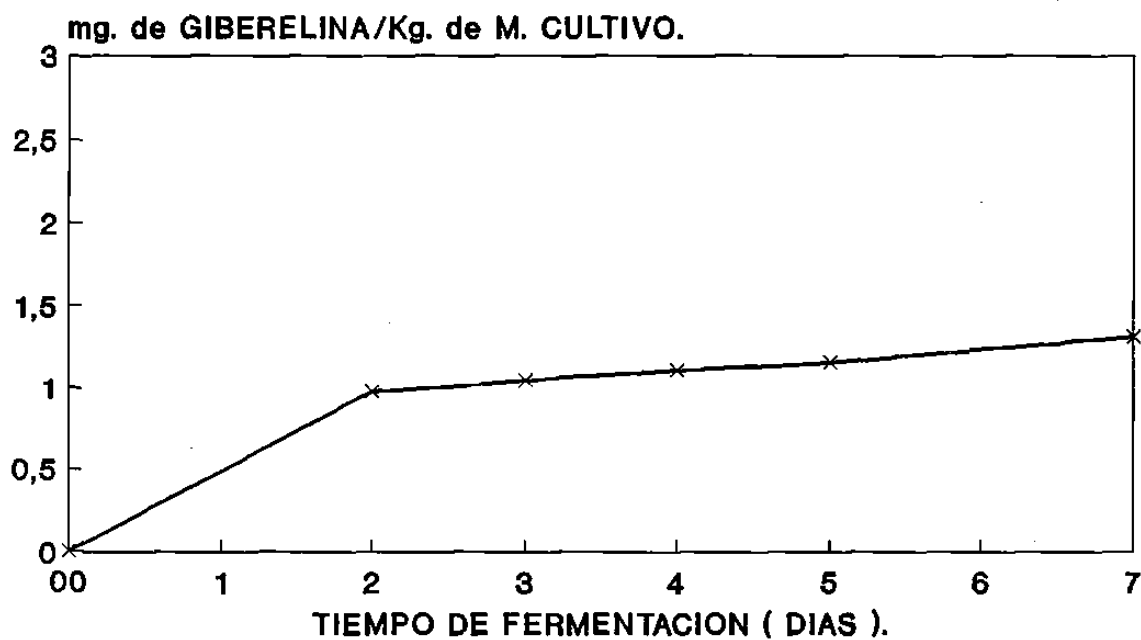


FIGURA 12.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO (SALVADO DE TRIGO - GLUCOSA) EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS.

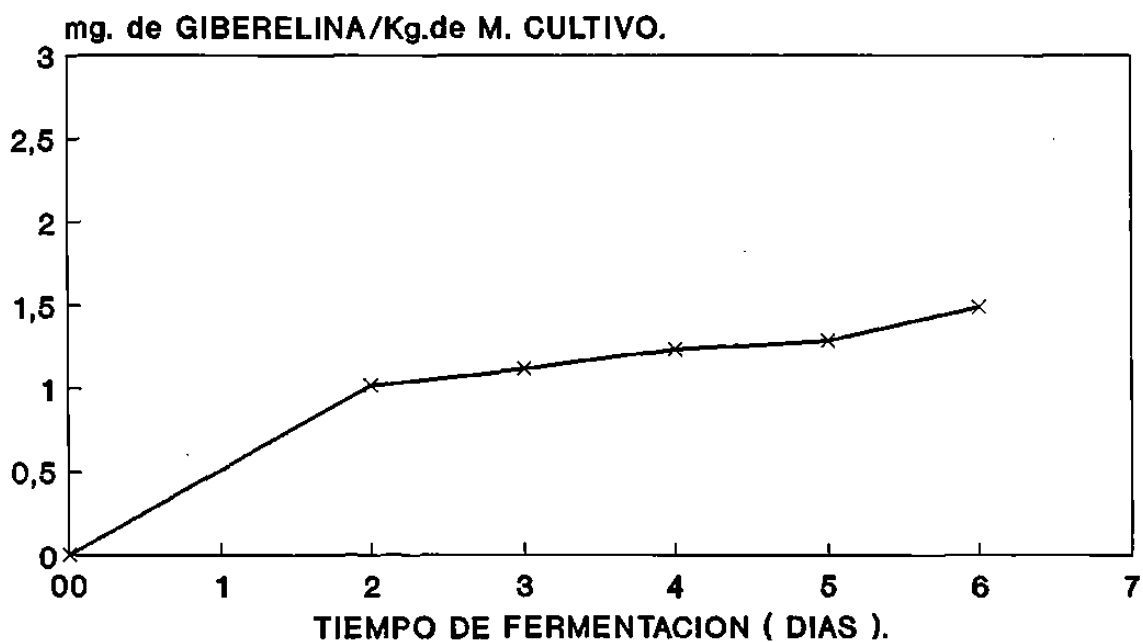


FIGURA 13.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO (SALVADO DE TRIGO- ALMIDON DE MAIZ) EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS.

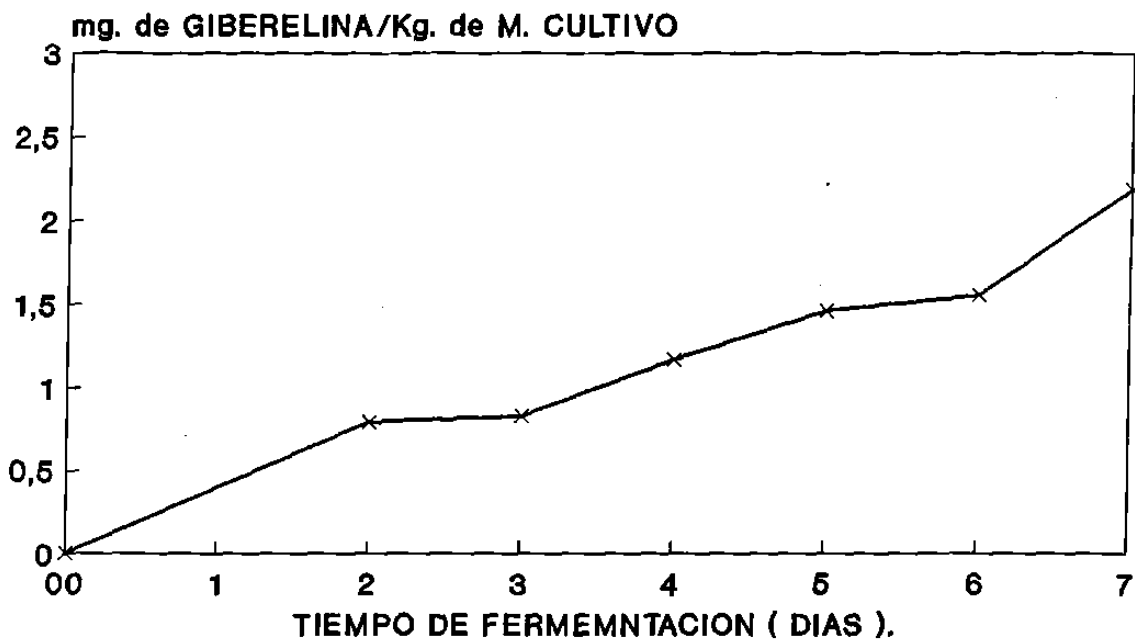


FIGURA 14.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO (MASILLA - ALMIDON) EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS.

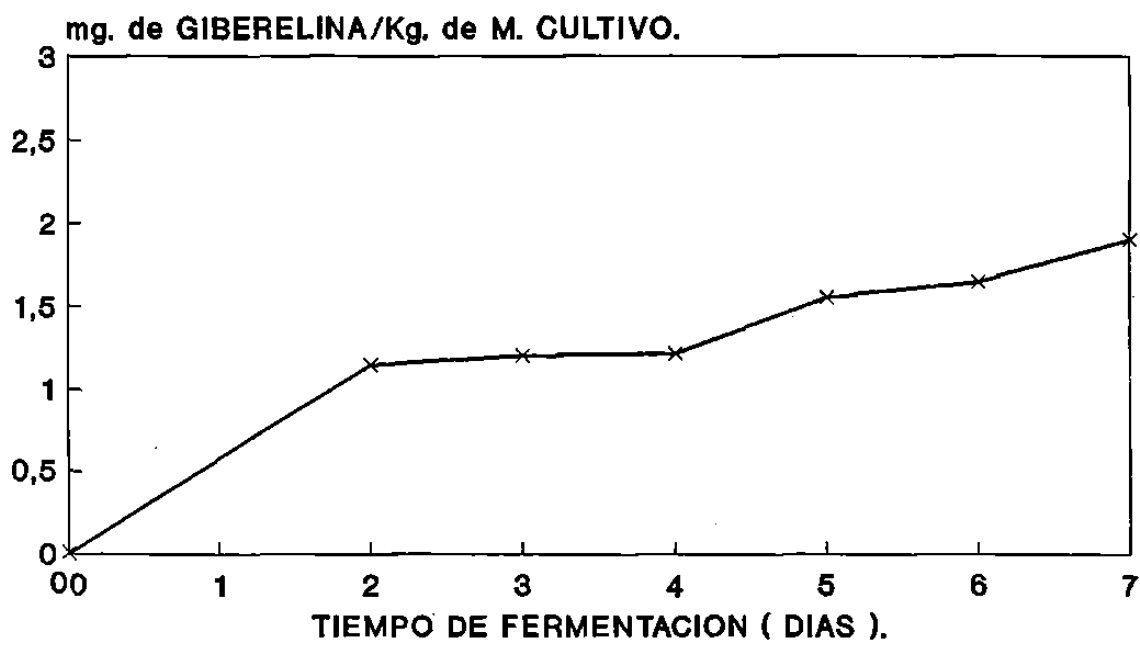


FIGURA 15.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO (MASILLA- GLUCOSA) EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS.

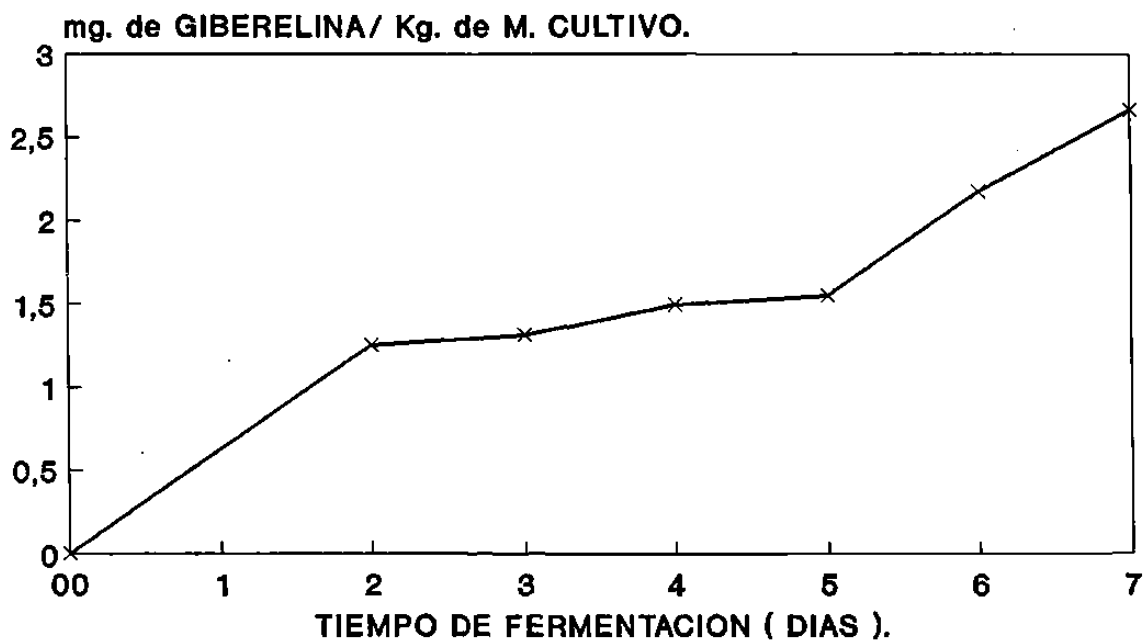


FIGURA 16.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO (MASILLA - ALMIDON DE MAIZ) EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS.

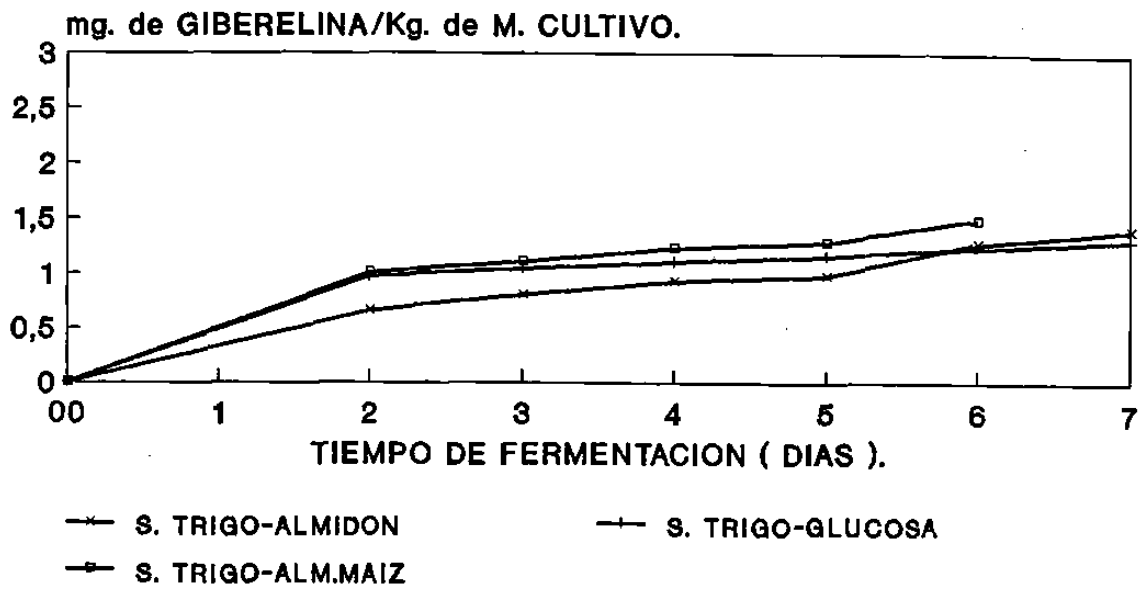


FIGURA 17.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS POR G. fujikuroi.

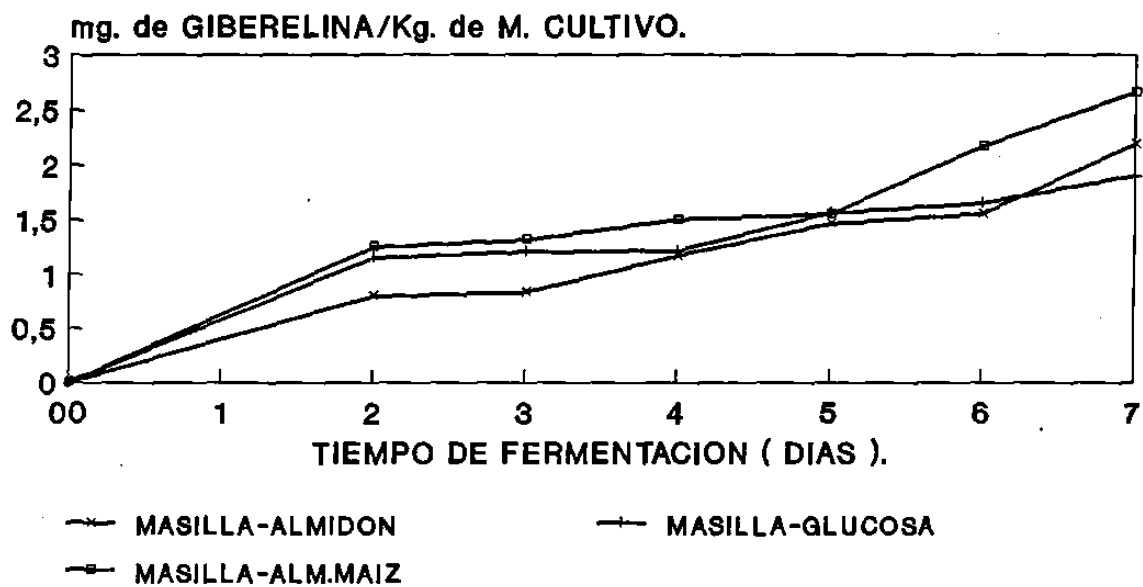


FIGURA 18.- EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCION DE GIBERELINAS POR *G. fujikuroi*.

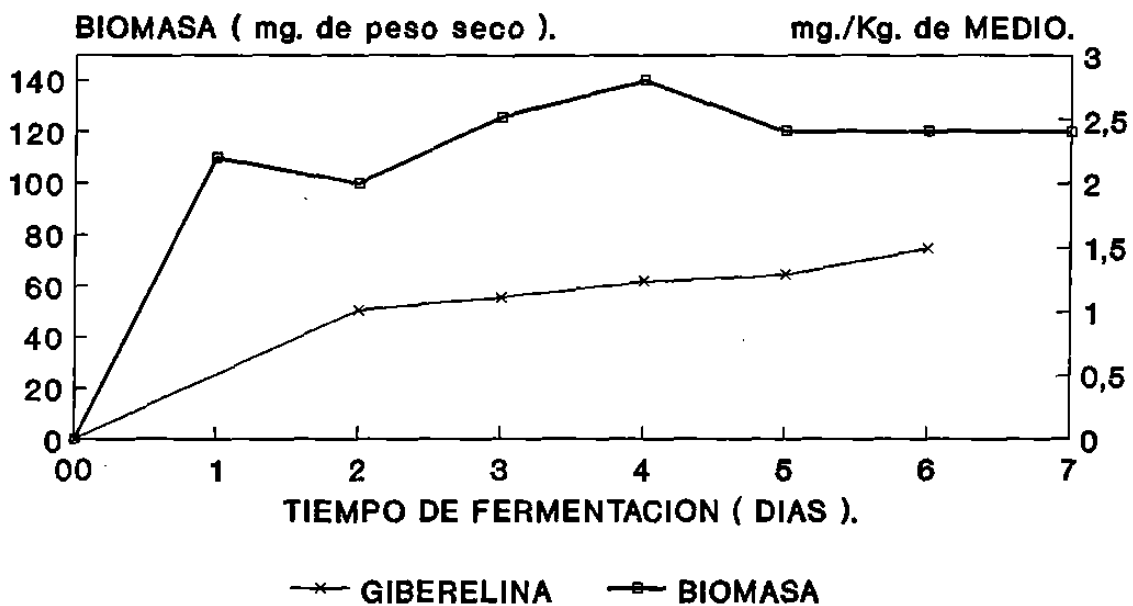


FIGURA 19.- PRODUCCION DE GIBERELINAS Y CRECIMIENTO DE G. fujikuroi EN MEDIO S. TRIGO-ALM. MAIZ EN UN CULTIVO BATCH.

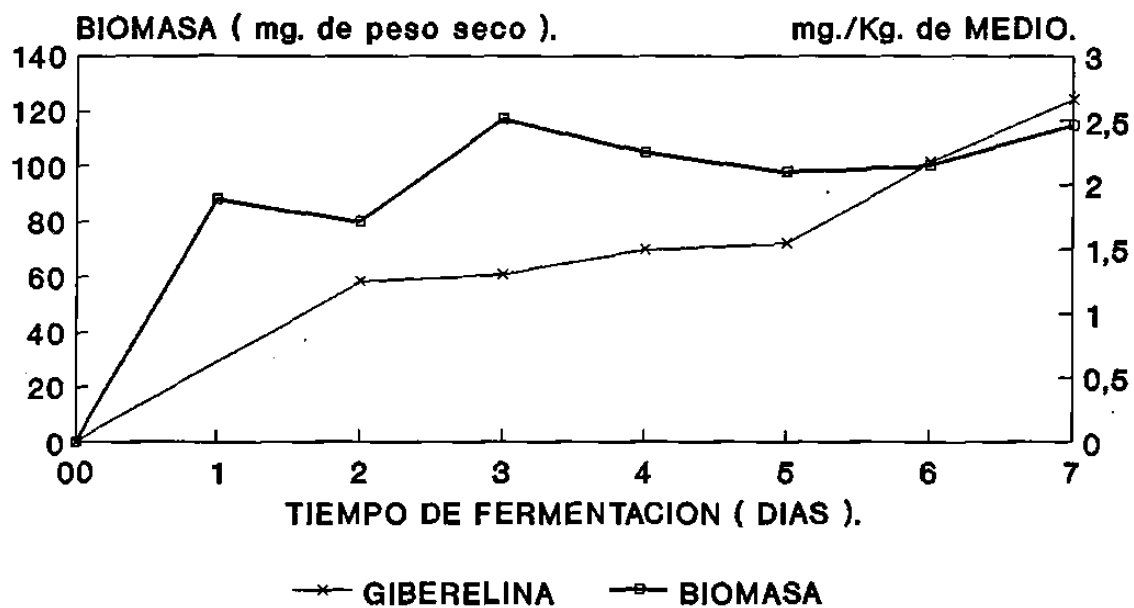


FIGURA 20.- PRODUCCION DE GIBERELINAS Y CRECIMIENTO DE *G. fujikuroi* EN MEDIO MASILLA-ALM. MAIZ EN UN CULTIVO BATCH.

