

## Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz

### The effect of different anthranilic acid concentrations on maize growth

José Luis Hernández-Mendoza<sup>1</sup>, Víctor Ricardo Moreno-Medina<sup>1</sup>,  
Jesús DiCarlo Quiroz-Velásquez<sup>1</sup>, Jesús Gerardo García-Olivares<sup>1</sup>,  
Netzahualcoyotl Mayek-Pérez<sup>1</sup>

---

#### Resumen

La rizobacteria *Azospirillum brasilense* basa su capacidad promotora del crecimiento vegetal en la producción de auxinas y otras hormonas, entre ellas el ácido antranílico (AA). En este trabajo se determinó el efecto del AA (0, 500, 1000, 3000 y 5000 ppm) en el crecimiento y la acumulación de biomasa del híbrido de maíz 83G66 en condiciones de invernadero. El AA de 500 a 3000 ppm promovió un mayor crecimiento (área foliar y altura de planta), y el AA de 1000 y 3000 ppm incrementó significativamente la biomasa seca en maíz en comparación con el testigo. El 90% de la asimilación del AA en las plantas ocurrió durante los primeros 10 días después del tratamiento.

**Palabras clave:** auxinas, fitohormonas, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Zea mays* L.

#### Abstract

The plant growth-promoting ability of the *Azospirillum brasilense* rhizo-bacterium is based on auxin production and that of other hormones, anthranilic acid (AA) being outstanding amongst them. This work was thus aimed at determining the effects of anthranilic acid (0, 500, 1000, 3000, and 5000 ppm) on maize growth and dry biomass accumulation in greenhouse conditions using the 83G66 hybrid. Significantly increased plant growth (leaf area and plant height) was achieved with 500 to 3,000 ppm AA, whilst 1,000 to 3,000 ppm AA significantly increased dry biomass accumulation in maize compared to control (0 ppm). 90% of AA in maize plants was assimilated during the first 10 days post-treatment.

**Key words:** Auxin, phyto-hormone, plant growth-promoting rhizobacteria, *Zea mays* L.

Recibido: septiembre 14 de 2009

Aprobado: mayo 24 de 2010

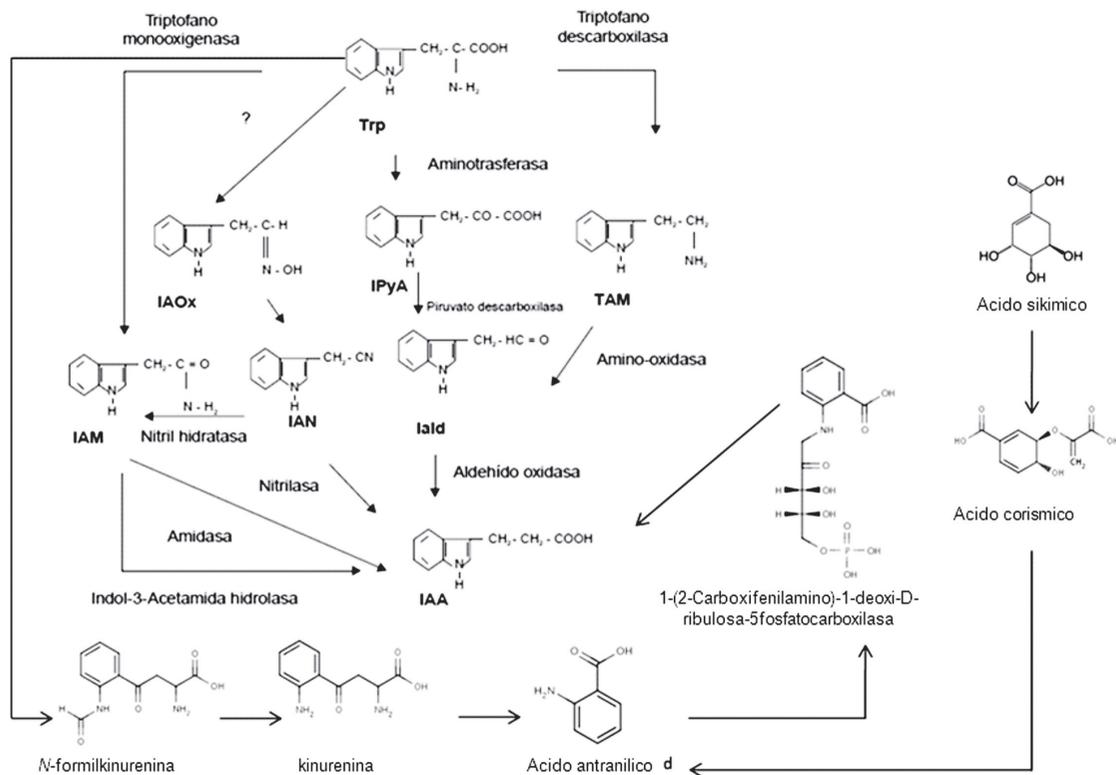
---

<sup>1</sup> Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. jhernandezm@ipn.mx

## Introducción

La bacteria *Azospirillum brasilense* frecuentemente se aísla de la rizosfera de maíz (*Zea mays* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] y otras gramíneas. Dicha bacteria es promotora del crecimiento vegetal y, por ello, se ha utilizado como inoculante o biofertilizante en maíz y sorgo. En el norte del estado de Tamaulipas, México (SIAP, 2009) se cultivan anualmente hasta 350.000 y 600.000 ha respectivamente. El efecto de esta bacteria se refleja en el incremento del índice de clorofila en sorgo (Pecina *et al.*, 2005) y en el rendimiento de grano de maíz y sorgo hasta 35% en comparación con plantas no inoculadas. Estos resultados han fomentado su uso debido a que reducen la fertilización química, que representa alrededor de 22% de los costos de producción (Díaz-Franco *et al.*, 2005; García-Olivares *et al.*, 2006; 2007).

*A. brasilense* produce fitohormonas entre las que se destacan el ácido 3-indol acético (AIA) y el ácido indol butírico (AIB) (Bashan *et al.*, 2004). La síntesis de AIA en *A. brasilense* tiene tres rutas de triptófano (TRP) dependientes: del ácido Indol 3 pirúvico (AIP), la de triptamina (TAM) y la del Indol 3 acetonitrilo (IAN), donde el paso de IAN a AIA libera una molécula de amonio que representa la fijación biológica de nitrógeno atribuida a *A. brasilense*. Existe otra ruta TRP-independiente que se origina del Indol 3 glicerol fosfato (Carreño-López *et al.*, 2000; Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). Una ruta de degradación del TRP ocurre a través de la kinurenina para formar AA, mismo que puede transformarse en Indol 3 Glicerol Fosfato y este en TRP o AIA (Zakharova *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003; Bashan *et al.*, 2004) (figura 1).



**Figura 1.** Rutas metabólicas de la síntesis de AIA. Tres rutas son TRP-dependientes y la del Indol 3 glicerol fosfato es TRP-independiente y formadora de TRP (adaptado de Zakharova *et al.*, 1999; Carreño-López *et al.*, 2000; Aguilar-Piedras *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2003).

El AA se descubrió en 1841 por C. J. Fritzsche y también se denomina ácido 2-aminobenzoico, 2-carboxianilina, 1-amino-2-carboxibenceno o vitamina L (Wiklund y Bergman, 2006). Las bacterias y las plantas metabolizan el AA a partir del ácido shiquímico vía el ácido corísmico (Bohlmann *et al.*, 1996; Rapparini *et al.*, 1999). También el AA es intermediario importante en la síntesis y degradación de TRP (Chang *et al.*, 2003). El AA también está presente durante la germinación de las semillas de maíz y desaparece cuando la planta alcanza los 35 días de edad (Singh y Wilhorm, 2004). El AA se ha detectado en un sinnúmero de organismos, entre ellos en insectos, donde juega un papel como atrayente sexual; se le conoce como vitamina L y sus derivados se utilizan para el tratamiento de diversos disturbios en humanos (Synthelabo, 1972; PatentesOnline-Chile, 2002; Wiklund y Bergman, 2006). También se ha detectado el AA en *A. brasilense* (Brodnikova *et al.*, 1992; Hernández-Mendoza *et al.*, 2008). En este trabajo se determinó el efecto del ácido antranílico en el crecimiento y la acumulación de biomasa seca del maíz cultivado en condiciones de invernadero.

### Materiales y método

En este trabajo se utilizó el híbrido de maíz amarillo 83G66 (Pioneer Hi-Bred™, Johnston, EUA) que se cultiva ampliamente en el norte de Tamaulipas. Las semillas se sembraron a 2 cm de profundidad en sustrato de turba (Redi Earth Scott™, Marysville, EUA) depositado en charolas de polipropileno rígido (53,3 cm de largo x 28 cm de ancho x 5,7 cm de alto) de 72 cavidades. Las charolas se regaron con agua potable periódicamente durante el desarrollo del experimento.

Doce días después de la siembra se asperjó al follaje de las plántulas con un atomizador AA (Sigma-Aldrich™) en concentraciones de 500, 1000, 3000 y 5000 ppm en un volumen equivalente a 4  $\mu\text{L cm}^{-2}$  de follaje. Al testigo se le aplicó agua destilada estéril. Los tratamientos (concentraciones de AA) se establecieron en un

diseño experimental completamente al azar con 72 repeticiones (una semilla / planta por cavidad en charola de polipropileno). Se cortaron 15 plantas por tratamiento a los 12, 22, 32 y 42 días después de la siembra, y se secaron individualmente a 65° C por 72 h en una estufa con aire forzado para estimar el peso seco de la biomasa total (parte aérea y raíces) por planta. A los 42 días después de la siembra (dds), y previo al corte de plantas, se midió la altura de planta (cm) de la base del tallo al ápice y el área foliar ( $\text{cm}^2$ ), midiendo para ello el largo x ancho de la hoja y multiplicando el valor por 0,75 (Tinoco-Alfaro *et al.*, 2008) de 15 plantas por tratamiento cosechadas al azar.

La extracción de los metabolitos se realizó a partir de 100 g de follaje de plantas de 42 ddt de edad seco, macerado y molido en 10 mL de metanol en tubos de ensayo de 18 x 150 mm, cuya mezcla se dejó reposar una noche a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ). El metanol se evaporó en baño maría hasta conservar aproximadamente 2 mL del extracto, mismo que se centrifugó a 2000 rpm por 15 min y el sobrenadante se resuspendió en 2 mL de la fase de corrimiento para cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) (fosfato diácido de potasio 50 mM/acetronitrilo 70/30 v/v; pH = 3,0). Posteriormente, el sobrenadante se filtró con filtros adicionados con membranas de nylon de 25 mm de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore™; Cork, Irlanda). El filtrado se colectó en viales de 1,5 mL (National Scientific; Rockwood, EUA) y luego se inyectó en un HPLC (Hewlett Packard-Agilent™ modelo 1100; Waldbronn; Alemania) equipado con una columna Ultrasphere RP18 de 150 x 4.6 mm de diámetro interno (Beckman Ultrasphere™; Fullerton, EUA) y tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . El detector (UV G1314A; Hewlett-Packard Agilent) se ajustó a una longitud de onda de 230 nm, temperatura de 35° C, flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  por muestra y lavado con agua mili-Q estéril entre muestras (Hernández-Mendoza *et al.*, 2008). El HPLC se calibró con estándares de AIA, AA y TRP, con concentraciones y tiempos de reten-

ción de 10 y 2, 50 y 2,8 y 100 ppm y 4,5 min, respectivamente.

Los datos de área foliar, altura de planta y biomasa seca total a los 42 días después de la siembra se sometieron al análisis de varianza con prueba de Tukey (DMSH,  $p < 0,05$ ) (GraphPad Software, 2005).

## Resultados

El AA en concentraciones de 500 a 3000 ppm, incrementó significativamente el

área foliar y la altura de planta del maíz, con respecto al testigo. En las concentraciones altas, de 1000 y 3000 ppm se produjo más biomasa seca de planta que en los lotes testigo 42 días después de la siembra (tabla 1). Por HPLC se detectó la presencia de AA y TRP en las plantas de maíz y sus concentraciones se redujeron a medida que pasó el tiempo después del tratamiento, aunque la asimilación fue particularmente en los primeros 10 días después de tratamiento (aproximadamente 90%), posteriormente se reduce de manera sensible (figura 2).

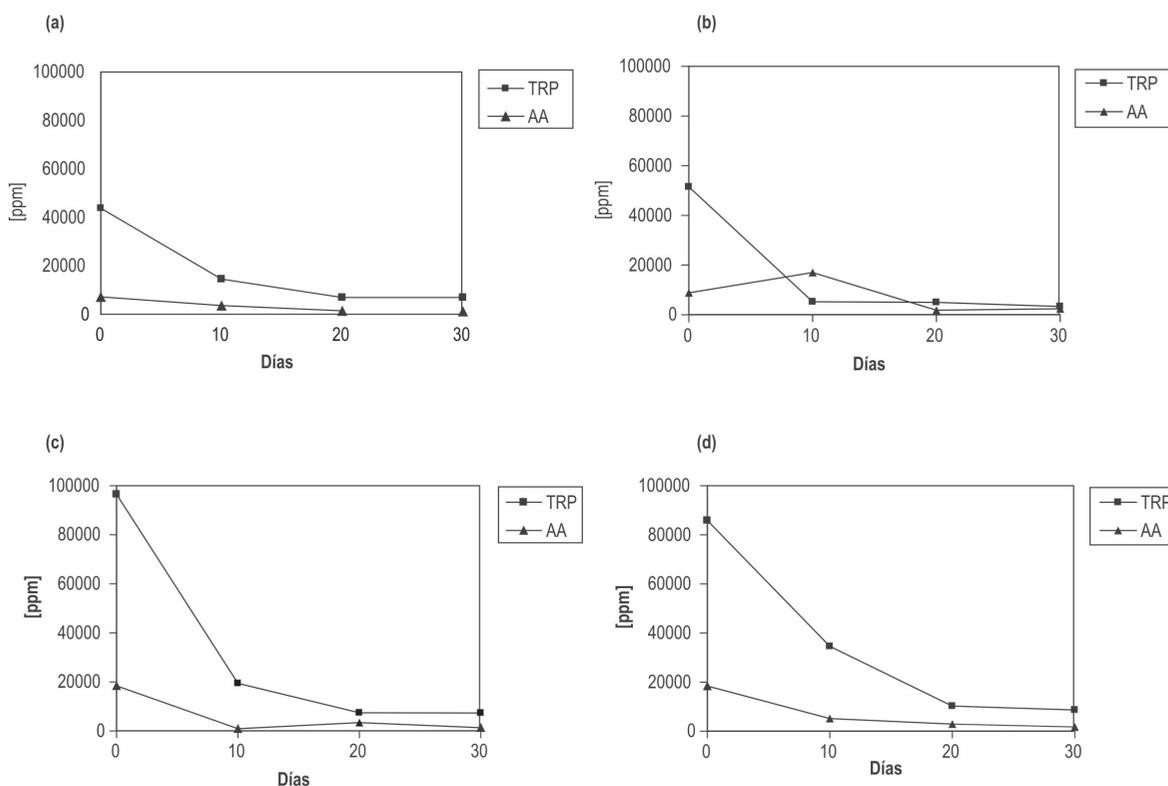
**Tabla 1.** Área foliar y altura de planta de maíz híbrido 83G66 en invernadero tratado con diferentes concentraciones de ácido antranílico a los 42 días después de la siembra

Tratamiento (ppm de ácido antranílico)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Altura de planta (cm)	Peso seco de planta (g)
Testigo (0)	122,0	28,6	0,21
500	146,2	36,3	0,23
1000	149,0	34,6	0,27
3000	146,6	34,1	0,26
5000	126,9	31,0	0,24
DMSH (P<0,05)	12,9	2,6	0,02

## Discusión

En el norte del Estado de Tamaulipas el cultivo del maíz implica generalmente la utilización de altas dosis de fertilización química que, a su vez, representa una inversión de alto costo y riesgo para los agricultores de la región. Una alternativa para ello consiste en la inoculación de microorganismos promotores del crecimiento también llamados “rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal”, “bioestimulantes”, “biofertilizantes” o “inoculantes” (Díaz-Franco *et al.*, 2005; García-Olivares *et al.*, 2006; 2007). Los microorganismos más frecuentemente utilizados en México son las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum*, así como hongos micorrízicos del género *Glomus* (Bashan, 1998). *A. brasilense* incrementa el rendimiento de

grano del maíz hasta 35% respecto a plantas no inoculadas en la región de estudio, donde además la reducción en el uso de fertilizantes químicos representa un ahorro de aproximadamente 22% de los costos de producción (Díaz-Franco *et al.*, 2005; García-Olivares *et al.*, 2006, 2007). Sin embargo, en sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] no se han encontrado efectos importantes en crecimiento y rendimiento de grano con la aplicación de biofertilizantes a base de *Azospirillum*, lo que se atribuye a factores ambientales, pues el sorgo se cultiva en condiciones de temporal o secano, errático y pobre (Martínez-Medina, 2004; Pecina-Quintero *et al.*, 2005). La constante evaluación de cepas de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, por su capacidad promotora de di-



**Figura 2.** Asimilación del ácido antranílico a los 0, 10, 20 y 30 días después del tratamiento de plantas del híbrido de maíz 83G66 con 500 (a), 1000 (b), 3000 (c) y 5000 (d) ppm.

cho crecimiento así como su interacción con el ambiente, resultan útiles en el corto y mediano plazos de modo que potenciarán la productividad de las especies agrícolas de interés. El mejor entendimiento de las características básicas de la interacción *A. brasilense*-raíces de maíz y/o sorgo, y los indicadores críticos del éxito de la inoculación ayudarán a mejorar la eficacia de *A. brasilense* en diversas condiciones ambientales, y así estimular su aplicación en gran escala en la producción agrícola en campo (Bashan y Holguín, 1997). Por ello, asociar el potencial biofertilizante de *A. brasilense* CBG-497 con la síntesis, entre otros metabolitos, del ácido antranílico es un avance sustantivo y novedoso. Otro aspecto importante es que hasta ahora se sugería la cuantificación de la asimilación de triptófano y la producción de AIA en cepas de *A. brasilense* a utilizarse como biofertilizantes, dado que el triptófano es precursor de la síntesis de auxinas

(van de Broek *et al.*, 1999). Ahora, nuestros resultados permiten sugerir que la determinación de la asimilación de AA en plantas es importante para establecer la asociación con el crecimiento y desarrollo del maíz. Los efectos positivos de *A. brasilense* en diversos cultivos se han atribuido principalmente al mejoramiento en el desarrollo de la raíz, y al incremento subsecuente en la tasa de asimilación de agua y la utilización de minerales del suelo (Sumner, 1990; Okon y Labandera-González, 1994; Fallik y Okon, 1996; Burdman *et al.*, 1997; Hamaoui *et al.*, 2001; Döbbelaere *et al.*, 2002).

## Conclusiones

Las dosis menores a 1000 ppm del ácido antranílico en condiciones de invernadero se asocian positivamente con el crecimiento vegetativo y la acumulación de biomasa en maíz. El

ácido antranílico se metaboliza en aproximadamente 90% durante los 10 días posteriores al tratamiento.

### Agradecimientos

Se agradece al Instituto Politécnico Nacional (proyecto SIP 20070762) y al Patronato para la Investigación Fomento y Sanidad Vegetal AC por el apoyo financiero para la realización del trabajo, así como al Laboratorio de Interacción Planta Microorganismo del CBG-IPN por haber proporcionado la cepa de *A. brasilense* para este estudio. M. I. Sánchez-Pérez es becaria PIFI-IPN y Conacyt. J. L. Hernández Mendoza y N. Mayek-Pérez son becarios EDI-IPN y COFAA-IPN; N. Mayek-Pérez es becario del SNI.

### Referencias bibliográficas

- Aguilar-Piedras, J. J., Xiqui-Vásquez, M. L., García-García, S., Baca, B. E. 2008. Producción de ácido Indol-3-acético en *Azospirillum*. Artículo de revisión. Rev Lat Microbiol 50: 29-37.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol Adv 16: 729-770.
- Bashan, Y., Holguín, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). Can J Microbiol 43: 103-121.
- Bashan, Y., Holguin, G., Bashan, L. E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can J Microbiol 50: 521-577.
- Bohlmann, J., Lins, T., Martin, W., Eilert, U. 1996. Anthranilate synthase from *Ruta graveolens*. Plant Physiol 111: 507-514.
- Brodnikova, N. A., Katsy, E. I., Egorenkov, D. A., Panasenkov, V. I. 1992. *Azospirillum brasilense* Sp245 mutants in production of anthranilic and indolyl-3-acetic acid. Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiia I Virusologiia 9-10: 3-5 (In Russian with abstract in English).
- Burdman, S., Kigel, J., Okon, Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol Biochem 29: 923-929.
- Carreño-López, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., Baca, B. E. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. Mol Gen Genet 264: 521-530.
- Chang, H. K., Mohseni, P., Zylstra, G. J. 2003. Characterization and regulation of the genes for a novel anthranilate 1,2-dioxygenase from *Burkholderia cepacia* DB01. J Bacteriol 185: 5871-5881.
- Díaz-Franco, A., Alvarado-Carrillo, M., Cantú-Almaguer, M. A., Garza-Cano, I. 2005. Fertilización biológica y producción de maíz en la región semiárida del norte de Tamaulipas, México. Agric Téc Méx 31: 153-163.
- Döbbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol Fert Soils 36: 284-297.
- Fallik, E., Okon, Y. 1996. Inoculations of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. Soil Biol Biochem 28: 123-126.
- García-Olivares, J. G., Rodríguez-Luna, I. C., Moreno-Medina, V. R., Mendoza-Herrera, A., Mayek-Pérez, N. 2006. Efecto de la biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo en el norte de Tamaulipas. Agric Téc Méx 32: 135-141.
- García-Olivares, J. G., Moreno-Medina, V. R., Rodríguez-Luna, I. C., Mendoza-Herrera, A., Mayek-Pérez, N. 2007. Producción de auxinas de *Azospirillum brasilense* nativas del norte de Tamaulipas, México y su efecto en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. Rev Fitotec Mex 30: 305-310.
- GraphPad Software, Inc. 2005. GraphPad Prism version 4.0. San Diego, USA.
- Hamaoui, B., Abbadi, J. M., Burdman, S., Rashid, A., Sarig, S., Okon, Y. 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. Agronomie 21: 553-560.
- Hernández-Mendoza, J. L., Quiroz-Velázquez, J. D., Moreno-Medina, V. R., Mayek-Pérez, N. 2008. Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. Avances de Investigación Agropecuaria 12: 57-67.
- Martínez-Medina, J. 2004. Respuesta de la biofertilización en el crecimiento y rendimiento de sorgo de grano en

- Linares, Nuevo León. *In*: Memoria del Simposio de Biofertilización. A. Díaz-Franco, N. Mayek-Pérez, A. Mendoza, N. Maldonado-Moreno (eds.). 25 de noviembre de 2004. Río Bravo, México. pp. 42-52.
- Okon, Y., Labandera-González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years' worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26: 1591-1601.
- PatentesOnline-Chile. 2002. Compuestos derivados de amida de ácido antranílico; procedimiento de preparación; composición farmacéutica; y uso del compuesto para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, de retinopatía o macular. Disponible en <http://www.patentesonline.cl/compuestos-derivados-de-amida-de-acido-antranilico-procedimiento-de-preparacion-composicion-52221.html> [Fecha de consulta: 14 de septiembre de 2009].
- Pecina-Quintero, V., Díaz-Franco, A., Williams-Alanís, H., Rosales-Robles, E., Garza-Cano, I. 2005. Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en sorgo. *Rev Fito-tec Mex* 28: 389-392.
- Rapparini, F., Cohen, J. D., Slovin, J. P. 1999. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Lemna gibba* studied using stable isotope labeled anthranilate and tryptophan. *Plant Growth Regul* 27: 139-144.
- Singh, M., Wilhorm, J. M. 2004. Study of a corn (*Zea mays* L.) mutant (*blue fluorescent-1*) which accumulates anthranilic acid and its  $\beta$ -glucoside. *Biochem Genet* 13: 357-367.
- Sistema de Información Agropecuaria (SIAP). 2009. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Sagarpa. México. Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob/mx> [Fecha de consulta: 30 de mayo de 2009].
- Sumner, M. E. 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. pp. 53-123. In: B. A. Stewart (ed.). *Advances in Soil Sciences*. Berlin: Springer.
- Synthelabo. 1972. Memoria descriptiva sobre: procedimiento para la obtención de derivados del ácido antranílico. Patente de Invención 9254/21. Disponible en [http://www.espatentes.com/pdf/0404928\\_A1.pdf](http://www.espatentes.com/pdf/0404928_A1.pdf) [Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2009].
- Tinoco-Alfaro, C. A., Ramírez-Fonseca, A., Villarreal-Farías, E., Ruiz-Corral, A. 2008. Arreglo espacial de híbridos de maíz, índice de área foliar y rendimiento. *Agric Téc Méx* 34: 271-278.
- van de Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., Vanderleyden, L. J. 1999. Auxins up-regulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 181: 1338-1342.
- Wiklund, P., Bergman, J. 2006. The chemistry of anthranilic acid. *Curr Organic Synth.* 3: 379-402.
- Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., Brudnik, V. V., Skripko, N. G., Bulkin, N. S. H., Ignatov, V. V. 1999. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. *Eur J Biochem* 259: 572-576.