



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

Erika Citlaly Interiano Santos

CON EL TEMA

Determinación del crecimiento y el perfil proteómico de
hojas de *Moringa oleifera* cultivada con vermicomposta y roca
fosfórica

MEDIANTE

OPCIÓN I

TESIS PROFESIONAL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2015.

DEDICATORIAS

A Dios, pues con su guía y amor pude llevar a cabo este nuevo reto en mi vida. Por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.

A mi madre, por ser lo mejor que tengo en la vida, por todo lo que me ha dado, en primer lugar la oportunidad de vivir, por su apoyo, amor, comprensión y confianza en todo momento, eres un gran regalo de Dios, te amo mamá.

A mi hermano, por su apoyo, consejos y cariño pero sobre todo por compartir grandes momentos conmigo, a mí cuñada por la motivación y amistad brindada, a mis hermosos sobrinos por ser parte importante de mi vida, los quiero mucho.

A Omar, por su apoyo incondicional, brindándome amor, confianza y comprensión en todo momento, animándome constantemente a salir adelante en todos mis propósitos, te quiero.

A mis amigos, Lety mi gran amiga, por compartir momentos inolvidables a su lado a lo largo de la carrera, por seguir disfrutando de nuestra amistad, además que sin tu insistencia y motivación no estaría culminando este ciclo. A Martín, por el gran apoyo brindado a lo largo de la tesis, compartiendo conmigo generosamente cada idea que pudiera hacer de mi tesis un mejor trabajo, por ser un buen maestro y muy buen amigo, pero sobre todo por su paciencia, los quiero mucho.

El camino no siempre ha sido fácil, sin embargo la esperanza, sueños e ilusiones nunca han dejado de estar presentes. Sueños de los cuales ustedes han sido cómplices incondicionales.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo; en especial al Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo director de tesis, por creer en mi aceptándome bajo su dirección, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido.

A la M.C. Rosa Isela Cruz Rodríguez y al M.C. Juan José Villalobos Maldonado, por su orientación y tiempo prestado en la revisión de tesis, así como sus sugerencias y conocimientos aportados para la culminación de la misma.

A todas las personas que contribuyeron de la mejor manera para alcanzar el éxito y que no aparecen porque sería una lista interminable, a todos GRACIAS.

CONTENIDO

Lista de figuras.....	i
Lista de cuadros.....	iii
Resumen.....	iv
1.0. Introducción.....	1
2.0. Marco teórico.....	2
2.1. Clasificación taxonómica.....	2
2.1.1. Familia <i>Moringaceae</i> y género <i>Moringa</i>	3
2.1.2. Distribución geográfica.....	3
2.2. Descripción botánica.....	4
2.2.1. Toxicidad.....	5
2.3. Valor nutritivo.....	6
2.4. Usos de <i>Moringa oleifera</i>	7
2.4.1. Partes comestibles.....	8
2.4.2. Propiedades medicinales.....	9
2.4.3. Uso en la agricultura.....	9
2.4.3.1. Sistemas agroforestales.....	9
2.4.4. Uso químico.....	11
2.4.5. Otros usos.....	12
2.5. Requerimientos de cultivo.....	13
2.5.1. Características del suelo para <i>M. oleifera</i>	13

2.5.2. Siembra.....	13
2.5.3. Métodos de propagación.....	14
2.6. Insumos orgánicos.....	16
2.6.1. Composta.....	16
2.6.2. Vermicomposta.....	17
2.6.2.1. Papel de la lombriz de tierra en la vermicomposta.....	19
2.6.3. Efecto de la vermicomposta en las plantas.....	19
2.6.4 Roca fosfórica.....	21
2.6.4.1. Fijación del fósforo en el suelo.....	22
2.6.5. Efecto del fósforo en las plantas.....	23
2.7. Análisis proteómico en plantas.....	24
2.7.1. Ramas especializadas en el estudio de aspectos particulares de la proteómica.....	25
2.8. Extracción de proteína.....	26
2.9. Cuantificación de proteínas.....	28
2.10. Separación de las proteínas por electroforesis (SDS-PAGE).....	29
2.10.1. Fundamentos de la electroforesis (SDS-PAGE).....	30
2.11. Espectrometría de masas.....	31
3.0. Justificación.....	34
4.0. Objetivos.....	35
5.0. Metodología.....	36
5.1. Ubicación del área de estudio y material vegetal.....	36

5.2. Establecimiento del experimento.....	36
5.3. Determinación de las variables morfométricas de <i>M. oleifera</i>	38
5.4. Evaluación del contenido de clorofila.....	39
5.5. Preparación del material biológico.....	40
5.6. Extracción de proteína.....	40
5.7. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	40
5.8. Electroforesis SDS-PAGE.....	41
5.8.1. Gel de separación.....	41
5.8.2. Gel de apilamiento.....	42
5.8.3. Desnaturalización de las proteínas.....	43
5.9. Análisis de datos.....	45
6.0 Resultados y discusiones.....	46
6.1. Variables de crecimiento y desarrollo del cultivo de <i>M. oleifera</i> en invernadero.....	46
6.2. Evaluación del contenido de clorofila en las plantas de <i>M. oleifera</i> ...	50
6.3. Análisis proteómico de <i>M. oleifera</i>	53
6.3.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	53
6.3.2. Análisis del patrón electroforético de <i>M. oleifera</i>	56
7.0. Conclusión.....	58
8.0. Bibliografía.....	59

9.0. Anexos	69
Anexo I. Cantidades de las soluciones para la preparación del gel separación.....	69
Anexo II. Cantidades de las soluciones para la preparación del gel de apilamiento	70
Anexo III. Cantidades de los reactivos para la preparación de la solución para teñir de azul de coomassie.....	71
Anexo III. Cantidades de los reactivos para la preparación de la solución para desteñir.....	72

Lista de figuras

Figura 2.1. Países donde se encuentran cultivos de <i>M. oleifera</i> en el mundo.....	3
Figura 2. 2. Partes de la planta de <i>M. oleifera</i>	5
Figura 5.1. Establecimiento del experimento en el invernadero.....	37
Figura 5.2. Esquema de las variables morfométricas.....	39
Figura 5.3. Medición de clorofila.....	39
Figura 5.4. Adición del gel separador entre los cristales.....	41
Figura 5.5. Adición del gel concentrados y el peine.....	42
Figura 5.6. Montaje y llenado de la caja de electroforesis.....	43
Figura 5.7. Adición de las muestras a los pozos para la electroforesis SDS-PAGE.....	44
Figura 5.8. Tinción del gel con azul de coomassie.....	44
Figura 5.9. Adición de la solución para desteñir.....	45
Figura 6.1. Altura de las plantas de <i>M. oleifera</i> a los 45 y 90 días después de la emergencia.....	47
Figura 6.2. Diámetro de las plantas de <i>M. oleifera</i> a los 45 y 90 días después de la emergencia.....	48
Figura 6.3. Contenido de clorofila plantas de <i>M. oleifera</i> a los 45 y 90 días después de la emergencia.....	51
Figura 6.4. Contenido de proteína a los 45 días después de la emergencia (dde) en porcentaje y mg prot./g muestra, para los tratamientos: suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR).....	54

Figura 6.5. Contenido de proteína a los 90 días después de la emergencia (dde) en porcentaje y mg prot./g muestra, para los tratamientos: suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR)..... 55

Figura 6.6. Gel de poliacrilamida 10% a los 45 días de muestreo, donde se muestran los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT), albumina de suero bovino (BSA), suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo +vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR)..... 56

Figura 6.7. Gel de poliacrilamida 10% a los 45 días de muestreo, donde se muestran los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT), albumina de suero bovino (BSA), suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR)..... 57

Lista de cuadros

Cuadro 2.1. Comparativo del contenido nutritivo de las hojas de <i>M. oleifera</i> con otros alimentos.....	6
Cuadro 2. 2. Esquema de las aplicaciones de <i>M. oleifera</i>	8
Cuadro 2. 3. Esquema de los sistemas agroforestales.....	10
Cuadro 5.1. Distribución de los tratamientos.....	36
Cuadro 5.2. Caracterización fisicoquímica del suelo y la vermicomposta....	38
Cuadro 9.1. Composición del gel de separación.....	69
Cuadro 9.2. Preparación del gel de apilamiento.....	70
Cuadro 9.3. Composición de la solución de azul de Coomassie.....	71
Cuadro 9.4. Preparación de la solución de lavado o para desteñir.....	72

Resumen

A nivel mundial el uso desmedido de fertilizantes químicos, ha generado efectos negativos en el suelo y medio ambiente, lo que ha propiciado el uso de una fertilización orgánica. Por lo que el uso de vermicomposta y roca fosfórica son una alternativa para una fertilización que gestione la producción de cultivos más sustentable; a su vez, éstos aportan características favorables al suelo, debido a que son una fuente importante de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo, elementos necesarios en diferentes procesos de las plantas, primordialmente en la síntesis de proteínas, ya que son las moléculas biológicas más abundantes que se encuentran en todos los organismos. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de insumos orgánicos sobre el crecimiento y el perfil proteómico de *M. oleífera*. En una primera etapa, las plantas fueron cultivadas en bolsas plástico de 60 x 20 cm con 9 kg de suelo agrícola y distribuidas mediante un diseño de bloques completamente aleatorizado en donde se evaluaron los siguientes tratamientos: Suelo + vermicomposta (S+V), Suelo + Planta (S +P), Suelo + Planta + Urea (S+P+U), Suelo + Roca Fosfórica (S+R) y Suelo + Roca Fosfórica + Vermicomposta (S+R+V). Posteriormente, se cuantificó el contenido de proteínas por el método de Bradford; se analizó el patrón electroforético y el peso molecular mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE, paralelo a estas evaluaciones se midieron la altura, diámetro de la planta y el contenido de clorofila durante los días 45 y 90 después de la emergencia en un experimento en invernadero. Los resultados obtenidos revelaron que el tratamiento S +R + V presentó la mayor altura de (76.0 cm), diámetro (11.14 mm) y contenido de proteínas (30.62%). El peso molecular de las proteínas se encuentra en el rango de 20 a 150 kDa. No se observó un efecto positivo en el contenido de clorofila al adicionar roca fosfórica y vermicomposta, Sin embargo ésta combinación pudiera ser una alternativa importante para el desarrollo, crecimiento y rendimiento de las plantas, al tiempo que se disminuye el uso de fertilizantes químicos con lo que se contribuye a la preservación del medio ambiente.

Introducción

Moringa oleifera es un árbol multipropósito, conocido por sus propiedades medicinales, oleaginosas y alimenticias, estas cualidades hacen que sea un árbol de gran importancia y llegue a ser conocido en muchos lugares como “árbol milagroso o “el árbol de la vida” (Arias-Marín, 2014). Originaria del sur del Himalaya, actualmente se encuentra naturalizada en más de setenta países de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en su mayoría en regiones poco desarrolladas (Falasca y Bernabé, 2008). *M. oleifera* es un árbol con una multitud de usos, la planta tiene un alto contenido de aminoácidos principalmente proteínas, todas las partes de la planta son comestibles desde la raíz hasta las hojas, por su capacidad de resistencia a la sequía y el potencial agronómico es un árbol cultivable en regiones áridas y semiáridas, siendo de gran importancia ya que actualmente los cambios climáticos son muy extremos (García- Fayos, 2007; Magaña-Benítez, 2012).

Es conocido que los fertilizantes químicos han sido utilizados con gran frecuencia ocasionando que los suelos se vuelvan cada vez más pobres en nutrientes y se modifiquen sus propiedades fisicoquímicas, generando suelos no aptos para el cultivo, es por ello que actualmente se ha implementado el uso de abonos orgánicos.

Existe una gran variedad de tipos de abonos orgánicos debido tanto a la cantidad de materias primas disponibles como a los diferentes procesos de elaboración, entre ellos podemos encontrar compostas, vermicompostas y abonos verdes, lo que ha generado en cierta forma, que en los últimos años haya un incremento en su utilización para la producción de muchos cultivos (Duran y Enríquez, 2010), ya que estos abonos orgánicos presentan un efecto positivo en el suelo mejorando sus propiedades y contenido de nutrientes. Es por ello que surge el interés del estudio del cultivo de *M. oleífera* y de evaluar el efecto de la adición de vermicomposta y roca fosfórica en el crecimiento así como el contenido de proteína de la planta y el patrón electroforético.

2.0 Marco teórico

Moringa oleifera es un árbol nativo del Himalaya en India, pero ampliamente distribuido en otras regiones de India, Asia, África, Sur de Florida, Islas del Caribe y América del Sur (Castro Márquez, 2013). El cultivo del árbol aporta gran cantidad de nutrientes al suelo, además de protegerlo de factores externos como la erosión y la desecación es cultivado en suelos pobres con escasas de lluvia (Foidi *et al.*, 2001; Radovich, 2009). *M. oleifera* es un árbol de crecimiento muy rápido, se puede desarrollar hasta unos 10 – 12 metros. La copa es poco densa, de forma abierta, semejante a una sombrilla (tipo acacia), el tronco puede ser único (Hernández y Moza, 2013).

2.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo a la clasificación más actualizada basada en criterios filogenéticos de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>):

Dominio: Eukaryota

Reino: Viridiplantae

Filo: Streptophyta

Subclase: Rosids

Orden: Brassicales

Familia: *Moringaceae*

Género: *Moringa*

Se la conoce con varios nombres vernáculos: árbol del ben, morango, *moringa* (español); anamambo (Madagascar); mungaara, (India); angela (Colombia); marango (Costa Rica); acacia, ben (Cuba); ceiba (El Salvador); perla, (Guatemala); ben, la libertad (República Dominicana); marango (Honduras); teberinto (Salvador); entre otros (Navie y Csurhes, 2010).

2.1.1. Familia *Moringaceae* y género *Moringa*

Las moringáceas son una familia de árboles de hoja caediza y corteza gomosa. Hojas compuestas alternas, doble o triplemente pinnadas, con folíolos opuestos y sin estípulas. Las flores están dispuestas en pánulas axilares, de color blanco, irregulares, con 5 pétalos, 5 sépalos, 5 estambres funcionales y varios estaminodios. El fruto se encuentra en una cápsula larga con varias semillas con tres alas o no aladas (Olson y Fahey, 2011). El género *Moringa* es el único de la familia *Moringaceae*; *M. oleífera* Lam., es una de las 13 especies del género *Moringa* (Olson, 2009).

2.1.2 Distribución geográfica

Las especies de *Moringa* puede crecer en bosques, sólo en raras ocasiones lo hacen aisladas, y ninguna junto a otra especie del género en el mismo lugar. Se ha vuelto nativa en muchos países de África, Madagascar, Arabia, el Sureste de Asia, la zona del Pacífico, las Islas del Caribe, Centroamérica y América del Sur (Figura 2.1). Es una planta que crece muy bien en zonas áridas, tropicales, semiáridas o propensas a la sequía. (Hernández y Moza, 2013).



Figura 2. 1. Países donde se encuentran cultivos de *M. oleífera* en el mundo.

2.2. Descripción botánica

M. oleifera presenta un crecimiento rápido, llegando a una edad de 20 años de vida, es adaptable a climas tropicales; ya que el estar en zonas con un clima subtropicales suelen a ser árboles con hoja caduca, lo que provoca la pérdida de hojas por estrés hídrico (Muhl *et al.*, 2011). Las hojas son compuestas, con hojuelas delgadas y ovaladas de 1 a 2 cm de longitud de color verde claro; las flores son blancas, cremosas con estambres amarillos las cuales nacen en racimos. Tiene cierta resistencia a la sequía (Alfaro, 2008).

El fruto es una capsula colgante conocida como vaina color castaño muy parecida a una legumbre pero de sección triangular, de aproximadamente unos 30-45 cm de largo y 1.8 cm de diámetro (Magaña-Benítez, 2012). Las semillas son negruzcas redondeadas con un tejido a modo de alas blancas y delgadas de 2-3 mm de largo. Este árbol florece y produce semillas durante todo el año (Reyes-Sánchez, 2004).

El tallo y la raíz de la planta son de gran importancia; ya que le dan características especiales como la de crecer y proliferar con poca agua. La corteza es blanquecina, el tronco generalmente espeso e irregular en tamaño y forma y la corona pequeña y densa, rara vez sobrepasa los 10 metros de altura. La raíz mide varios metros, carnosa en forma de rábano, es pivotante y globosa lo que le brinda a la planta cierta resistencia a la sequía en periodos prolongados (Figura 2.2), cuando se le hacen cortes, produce una goma color rojizo parduzco (García-Torres *et al.*, 2013)



Figura 2.2. Partes de la planta de *M. oleifera*

2.2.1. Toxicidad

Los compuestos de *M. oleifera* tienen una toxicidad muy baja, contiene como principios tóxicos benzil, ácido moríngico y ácido cianhídrico. La corteza fresca contiene beta sistosterol y pequeñas trazas de alcaloides. Las hojas frescas y machacadas aplicadas a la piel producen ampollas y quemaduras, los cotiledones de la semilla presentan efectos tóxicos por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, el efecto tóxico probablemente debido a los constituyentes antimicrobianos (Alfaro y Martínez, 2008); esto es si se utilizan en grandes cantidades, concentraciones y con un uso muy frecuente.

Sin embargo, se considera que no constituye un riesgo para la salud humana a las concentraciones utilizadas con propósitos nutricionales, medicinales o de purificación de agua (Alfaro y Martínez, 2008).

2.3. Valor nutritivo

M. oleífera se está tomando como un recurso de primer orden con un bajo costo de producción con eficiente funcionalidad para la prevención de la desnutrición y múltiples patologías asociadas a carencias de vitaminas y elementos esenciales en la dieta (Alfaro y Martínez, 2008).

A las hojas de *Moringa* se le atribuyen una riqueza de nutrientes esenciales; algo que es poco común en plantas. La importancia de los aminoácidos esenciales es que, al no poder ser sintetizados en el organismo, es necesario ingerir alimentos ricos en proteínas que los contengan, para que el organismo obtenga los aminoácidos esenciales y pueda formar nuevas proteínas. En el cuadro 2.1 podemos encontrar una pequeña comparación entre la cantidad de nutrientes contenidos en las hojas frescas de *Moringa* con otros alimentos como zanahorias, naranjas, plátanos y leche (Magaña-Benítez, 2012).

Cuadro 2.1. Comparativo del contenido nutritivo de las hojas de *M. oleífera* con otros alimentos. Fuente SAGAR 2001.

Nutriente	Moringa	Otros alimentos
Vitamina A (mg)	1,130	Zanahorias: 315
Vitamina C (mg)	220	Naranjas: 30
Calcio (mg)	440	Leche de vaca: 120
Potasio (mg)	259	Plátanos: 88
Proteínas (mg)	6,700	Leche de vaca: 3,200

Es una fuente excepcional de proteínas, carbohidratos, calcio, potasio, hierro, carotenos, vitaminas y minerales; con un porcentaje superior al 25% de proteínas, esto es tantas como el huevo o el doble que la leche, cuatro veces la cantidad de vitamina A de las zanahorias, cuatro veces la cantidad de calcio de la leche, siete veces la cantidad de vitamina C de las naranjas, tres veces más potasio que los plátanos cantidades significativas de hierro, fósforo, magnesio, y aminoácidos (lisina, leucina, valina, isoleucina, triptófano, treonina entre otros) (Trees for life:Moringa book, 2011; Arias-Marín, 2014). Por lo que la utilización de *Moringa* para muchos países con alta desnutrición es una buena alternativa, es por ello que tiene un futuro prometedor en la industria dietética, y como alimento proteico para grandes deportistas (Alfaro, 2008).

Las hojas secas contiene los mismos nutrientes de manera concentrada, excepto la vitamina C (Trees for life: Moringa book, 2011). Este contenido nutritivo a su vez puede verse afectado por diversas variantes como son: el área, el clima, la estación y el tipo de suelo en el que se encuentre.

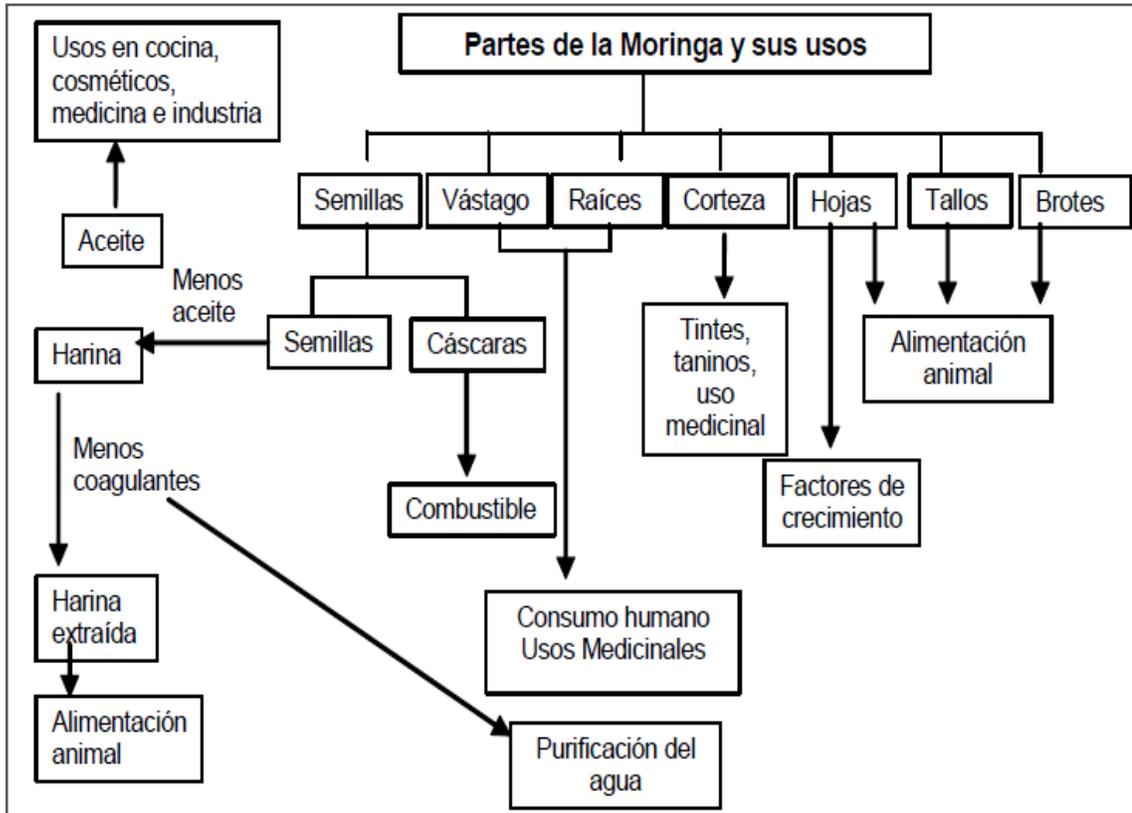
2.4. Usos de *Moringa oleífera*

El árbol de *M. oleífera* brinda una innumerable cantidad de productos valiosos que poseen utilidades extremadamente interesantes y que las comunidades han aprovechado por mucho tiempo Desde la antigüedad en Grecia y Roma se conocían las propiedades cosméticas del aceite de esta planta y, durante el siglo XIX, se exportó desde las plantaciones de la India a Europa, como lubricante de maquinaria de precisión (Sánchez, 2004).

En cuanto a los usos que tiene la *Moringa* encontramos muchos entre ellos como materia prima para muchas industrias como la cosmética, sanitaria, farmacológica alimenticia, entre otras. Es utilizada desde las semillas hasta la raíz presentando muchos beneficios en cuanto al punto de vista industrial; por tal razón

se le atribuye el nombre de “árbol milagroso”, algunos usos potenciales de *Moringa oleifera* se indican en el cuadro 2.2. .

Cuadro 2.2. Esquema de las aplicaciones de *M. oleifera* (Alfaro, 2008).



2.4.1. Partes comestibles:

La mayoría de las partes de la planta son comestibles; la raíz es carnosa y gruesa tiene un sabor parecido al maní, las hojas son consumidas crudas en ensaladas, caldos o en polvo como sazónador de comida.

Las semillas son utilizadas ya que proporcionan aceite que se emplea en la mecánica, materiales artísticos, empleado en la industria de perfumes y belleza. Las flores por su parte, son consumidas en ensaladas las cuales tiene un sabor y textura parecida a los champiñones, todas estas a su vez pueden ser tostadas con lo que brindan gran cantidad de nutrientes, (Sanchinelli-Pezzarossi, 2004).

2.4.2. Propiedades medicinales

La corteza fresca se usa como antídoto contra picadura de insectos y veneno de serpientes. Los frutos se consideran como afrodisiacos y la decocción de la raíz se usa contra la viruela. La infusión de la semilla es purgante y laxante. A las flores, hojas y raíz se les atribuyen propiedades bactericida, depurativa, diurética, estrógena, expectorante, purgante, rubefaciente, estimulante, tónica y vermífuga. La corteza del tallo y la raíz es estimulante, diurética y antiescorbútica (Sanchinelli-Pezzarossi, 2004).

2.4.3. Uso en la agricultura

Las hojas tiene efecto bactericida y fungicida en específico para *phytium debangemum* (hongos que atacan plántulas pequeñas) (Alfaro y Martínez, 2008).

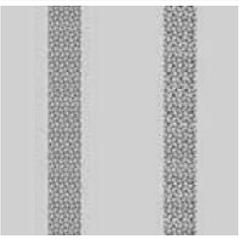
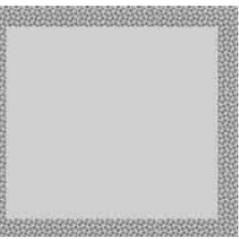
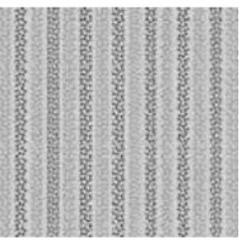
M. oleífera se ha destacado dentro de un grupo de árboles no leguminosos, como una planta promisoría para los sistemas de corte, acarreo y pastoreo, así como en la formación de barreras rompevientos y cercas vivas, ha adquirido una relevancia dentro de la agricultura por sus múltiples beneficios (García-Torres *et al.*, 2013).

2.4.3.1. Uso de *M. oleífera* en sistemas agroforestales.

Los recursos forestales están disminuyendo mucho por la agricultura, cría de animales, y el consumo de leña, todos los cuales son actividades esenciales para el bienestar de muchas comunidades (García-Torres *et al.*, 2013).

Los sistemas agroforestales ayudan con la sostenibilidad ya que están diseñados para proveer productos que necesitan los productores (García-Torres *et al.*, 2013). Estos sistemas pueden ser acondicionados como se muestra en el cuadro 2.3.

Cuadro 2.3. Esquema de los sistemas agroforestales (García-Torres *et al.*, 2013).

<p>Cortinas rompevientos: Su finalidad es que a nivel del cultivo el viento sea lento ya que desvían la fuerza del viento a altitudes más elevadas.</p>	
<p>Cercos vivos: Estos cercos no solamente reducen la necesidad de cercos tradicionales, sino que pueden producir beneficios tangibles tales como comida, leña, y otras materias primas.</p>	
<p>Cultivo de callejón: Consiste en la siembra de filas paralelas de árboles en un campo. Las cosechas están sembradas dentro de estas filas.</p>	

De las formas antes descritas, *M. oleifera* es muy indicada para el sistema de callejones debido a las características que este presenta como son: crecimiento rápido, tallos rectos y largos, raíces verticales y profundas y pocas raíces laterales, escasa sombra y alta productividad de biomasa con alto contenido de nitrógeno (Duarte y Flores, 2004).

Para el control de la erosión causada por el viento y el agua, *M. oleifera* tiene un papel muy importante; en el caso de erosión por el viento se utiliza la técnica de cortinas rompevientos, para controlar la erosión por el agua se da ya

que posee una raíz tuberosas que sirve como reserva de agua en épocas de sequía, lo que es muy útil en la recuperación de suelos áridos.

Otra de las ventajas encontradas en la *M. oleifera* es la recuperación de suelos debido a la cantidad de nitrógeno que es capaz de aportar con el material vegetativo, esto cuando se realizan podas en las plantaciones y simplemente el desprendimiento de las hojas que se vuelven abono para el suelo y con ello enriqueciéndolo (García-Torres *et al*, 2013).

2.4.4 Usos químicos

M. oleifera ha sido de gran importancia en la industria cosmética y farmacéutica, siendo utilizado como materia prima que tiene la función de ser vehículo de los principios activos que son utilizados como emolientes, saborizantes y aromatizantes (García-Torres *et al*, 2013). Otras características destacables para usar el aceite obtenido de la *M. oleifera* son que posee un índice de etanol elevado y un índice de yodo alto logrando una estabilidad en el combustible como la obtención de biodiesel y etanol (Biswas, 2008).

En ingeniería ambiental, el término tratamiento de aguas es el conjunto de operaciones unitarias de tipo físico, químico o biológico cuya finalidad es la eliminación o reducción de la contaminación o las características no deseables de las aguas, bien sean naturales, de abastecimiento, de proceso o residuales (Muñoz y Rodríguez, 2005). En el tratamiento de agua se encuentran muchos y variados procesos, de los cuales encontramos la coagulación que está dividida en inorgánicos y polímeros orgánicos sintéticos, este proceso es aplicado para la desestabilización de impurezas coloidales y disueltas, produciendo agregados de flóculos grandes que pueden ser removidos, provocándole a ésta una remoción de la turbiedad orgánica y/o inorgánica, una remoción del color verdadero o aparente, la eliminación de bacterias, virus y organismos patógenos, entre otros (Muñoz y Rodríguez, 2005).

Actualmente se buscan procesos naturales con los que se tratan de obtener beneficios importantes para el medio ambiente, como lo es el caso de la purificación y limpieza del agua. Es aquí donde las semillas de *M. oleifera* se caracterizan por ser un floculante natural, debido a que contienen un coagulante activo caracterizado como un péptido catiónico de peso molecular aproximado de 13 kDa y punto isoeléctrico a pH de 10 (Cornejo y Paredes, 2011).

2.4.5 Otros usos

Por el gran conjunto de características, hacen que el árbol cumpla con los estándares necesarios para ser considerado como un árbol apto para la obtención de múltiples productos y beneficios de importancia en muchos ámbitos como es la utilización de forraje para la alimentación de animales, las hojas y flores se comen cocidos, la ceniza de la corteza se usa para hacer jabón, las flores se usan para adornar altares, el tronco se usa para leña de encendido rápido, para construcciones rurales, como hormona de crecimiento, fuente de celulosa y carbón activado (Sanchinelli-Pezzarossi, 2004; Biswas, 2008).

Estudios realizados han demostrado que puede fabricarse jabón de muy buena calidad a partir de aceite de *M. oleifera*, con grandes propiedades antioxidantes muy potentes que se consideran un factor detrás de su extraordinaria estabilidad, y que a la vez posee una gran capacidad de absorber y retener incluso las fragancias más fugitivas (García-Torres *et al.*, 2013), de la corteza se extrae una goma de la cual se extraen taninos utilizados en la industria de curtido de pieles (Alfaro y Martínez, 2008).

2.5 Requerimientos de cultivo

Moringa es una planta de fácil propagación con una gran característica ecológica ya que se puede localizar en diferentes tipos de suelos con diferentes temperaturas y condiciones de humedad. Requiere de una elevación máxima entre 1500-2000 msnm, con una precipitación de 250- 400 mm por año, por lo cual tolera periodos de sequía, se mantiene a una temperatura de 15-30 °C (Radovich, 2009).

2.5.1 Características de suelo para *M. oleifera*

M. oleifera puede crecer en todo tipo de suelos duros o pesados, suelos con poca capacidad de retención de humedad y hasta en aquellos que presentan poca actividad biológica, tolera suelos arcillosos, pero no encharcamientos prolongados; puede crecer en suelos ácidos y alcalinos (pH 4.5-8) (Reyes-Sánchez, 2004).

2.5.2 Siembra

Para la siembra debe de existir una buena preparación tanto del suelo como del tiempo en el que esta se efectuará. Por lo que es preferible comenzar al final de la época de seca y culminar en época de lluvia, se recomienda que el terreno quede suelto, pero no muy polvoso para evitar que la semilla quede muy profunda o sea lavada por la lluvia (Reyes-Sánchez, 2004).

2.5.3. Métodos de propagación

Las semillas de *M. oleifera* tienen una capacidad de germinación de un año aproximadamente. La germinación se ve mermada por varios factores que afectan su buen desarrollo, como la temperatura, sustrato, condiciones de luz, el grado de fertilidad, la edad de las semillas (Alfaro, 2008).

Las dos alternativas de propagación de *M. oleifera* son:

- Siembra directa de la semilla
- Material vegetativo

Por lo que para llevar a cabo la propagación se puede hacer de cualquiera de las dos formas, tomando en cuenta las limitaciones y ventajas que cada método podría tener en cuanto al buen crecimiento y desarrollo de la planta.

El uso de siembra directa de la semilla puede realizarse en campo o en vivero, no requiere de ningún tratamiento anterior, la propagación por semillas es la manera más común y apropiada de sembrar la *M. oleifera*. La viabilidad del surgimiento de la planta depende, en general, del grado de fertilidad de los árboles productores, para éstos árboles el poder germinativo es de 99.5% y la vigorosidad es de 90% (Duarte y Flores, 2004; Reyes-Sánchez, 2004). Una de las ventajas es que podemos sembrarla directamente en campo ya que al carecer de un estado de latencia estas empiezan a brotar a los pocos días de siembra (Pérez, 2012).

Si la siembra se realiza en viveros este tiene la ventaja de permitir un cuidado minucioso de la planta y un aislamiento de condiciones a las que se expone en la siembra directa. Para el vivero se recomienda un sustrato compuesto por 60% de arena y 40% de tierra negra, para lograr una textura franco arenoso (referencia).

Se utilizan bolsas de polietileno de 8x12 pulgadas y la siembra de semillas se realiza directamente a la bolsa. Si la propagación se lleva a cabo por material vegetativo, este se realiza con mayor éxito utilizando estacas que acodos aéreos, para ello las estacas deben de contar con un mínimo de 2.5 cm de grosor y una longitud superior a 30cm. Debe de plantarse antes de que las lluvias comiencen, y de ser posible regarlas diariamente (Alfaro, 2008).

El árbol tiende a crecer recto, por lo que se recomienda la poda para poder estimular la ramificación a la altura de 1.5 metros sobre el suelo lo cual permite que el árbol pueda ser manipulable. Después de la siembra se debe de llevar a cabo una serie de prácticas agronómicas, para el buen desarrollo de la plántula, como son: el control de maleza ya que esta competiría con el desarrollo de la planta, el control de insectos y plagas dado a que afectan el crecimiento de la planta dándole un aspecto desfavorable pudiendo llegar a secarla y el uso estratégico de corte se recomienda debido a que si los árboles crecen mucho se vuelve muy difícil poder cortar las hojas o simplemente para evitar que crezca demasiado. (Alfaro y Martínez, 2008).

2.6 Insumos orgánicos

Los abonos orgánicos son todos aquellos residuos de origen vegetal y animal de los cuales las plantas pueden obtener importantes cantidades de nutrimentos; facilitan la diversidad de microorganismos y generan un suelo en equilibrio, favoreciendo una nutrición adecuada de la planta la cual se vuelve menos susceptible a las plagas y a las enfermedades, con lo que se elimina la utilización de plaguicidas sintéticos.

Con la implementación de los abonos orgánicos se reduce el costo de producción y se evita la eliminación de organismos benéficos para el desarrollo de las plantas, la contaminación de (agua, aire, suelo y alimentos) y con ello se evitan muchos riesgos a la salud del hombre (Sánchez-Iza, 2011).

Algunas de las ventajas para la utilización de los abonos orgánicos es que son sencillos de preparar, los materiales que se utilizan son económicos, proporcionan materia orgánica de forma constante, mejorando la fertilidad del suelo, ayuda a la conservación de la humedad y la buena penetración de los nutrientes, aumenta la macrofauna y la mesofauna de suelo, protege el ambiente y favorece el establecimiento y la reproducción de microorganismos benéficos en los terrenos de siembra (Sánchez-Iza, 2011). Dentro de los abonos orgánicos lo más conocidos son el compostaje y la vermicomposta.

2.6.1 Composta

El compostaje consiste en la transformación microbiana de la materia orgánica bajo condiciones controladas que resulta de la descomposición de residuos de origen animal y vegetal, la cual se divide en tres etapas (Diánez y Santos 2007):

1. Etapa mesofílica: Esta se lleva a cabo en los primeros días en donde se presenta un incremento de temperatura de 20 a 45 °C, debido a la descomposición de azúcares.
2. Etapa termofílica: En esta etapa se puede alcanzar temperaturas que van de 55 a 70°C, y se genera la degradación de la celulosa, es aquí donde se da la disminución de la población microbiana.
3. Etapa de maduración: Aquí la composta empieza en un proceso de enfriamiento, donde ocurre la recolonización por microorganismos que pueden ser antagónicos a organismos fitopatógenos.

En esta fase, los remanentes orgánicos son degradados a una tasa más lenta (Artavia *et al.*, 2010). Para facilitar la descomposición y estabilización de los residuos orgánicos, diversos investigadores han optado por utilizar otro proceso biológico, el cual no incluye la etapa termofílica, sino que incluye el empleo de lombrices de tierra, el cual recibe el nombre de vermicomposta (Subhash *et al.*, 2014).

2.6.2. Vermicomposta

El vermicompostaje es una técnica de biotecnología de bajo costo que permite el reciclaje de una variedad de residuos de diferente naturaleza a través de la acción combinada de las lombrices de tierra y microorganismos. Además de ser excelentes productos orgánicos para la agricultura, la vermicomposta puede ser considerada material útil para la restauración de suelos contaminados de plaguicidas ya que mejoran su adsorción reduciendo el riesgo ambiental de la lixiviación de pesticidas hacia las aguas subterráneas (Romero *et al.*, 2006).

En este sentido, la vermicomposta podría ser prometedora para materiales orgánicos que constituyen capas BIOMIX en los sistemas de biobed, como composta termófila, que han sido reportadas para ser eficaz en adsorber pesticidas degradantes en lechos biológicos (Vischetti *et al.*, 2008).

La vermicomposta es una forma de compostaje (Soto y Muñoz, 2002) en la cual cierto tipo de lombrices de tierra, como *Eisenia foetida*, *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus*, transforman los residuos orgánicos en un subproducto estable denominado “vermicomposta” o “*worm casting*”. Los residuos de la ganadería son una “fuente de alimento” común para las lombrices, pero los residuos de los supermercados, los biosólidos (lodos de aguas negras), la pulpa de papel, y de la industria de la cerveza también se han utilizado en el proceso de vermicomposteo (McGinnis *et al.*, 2004).

El proceso de vermicomposta involucra la bio-oxidación y estabilización del material orgánico por la acción de lombrices que airean, acondicionan y fragmentan el sustrato y por microorganismos que degradan bioquímicamente la materia orgánica. En este proceso se distingue una fase activa donde las lombrices procesan el desecho y modifican su estado físico, composición microbiana y una fase similar a la de maduración, marcada por el desplazamiento de las lombrices hacia capas más frescas del desecho (Artavia *et al.*, 2010).

La vermicomposta tiene como característica principal ser de un material de color oscuro, con un agradable olor a mantillo de bosque, su gran bioestabilidad evita su fermentación o putrefacción, contiene una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina, y facilita su asimilación por las raíces e impide que éstos sean lixiviados con el agua de riego manteniéndolos disponibles por más tiempo en el suelo y favorece la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas (Canellas *et al.*, 2002).

2.6.2.1 Papel de la lombriz de tierra en la vermicomposta.

Hoy en día existen diversas evidencias de que las lombrices de tierra provocan diferentes efectos benéficos, físicos, químicos y biológicos, sobre los suelos y diversos investigadores han demostrado que estos efectos pueden incrementar el crecimiento de la planta y el rendimiento de los cultivos tanto en ecosistemas naturales como en los ecosistemas manejados.

Estos efectos se han atribuido al mejoramiento de las propiedades y la estructura del suelo, a una mayor disponibilidad de los elementos nutritivos para las plantas, y a una creciente población microbiana y metabolitos biológicamente activos, como los reguladores de crecimiento de la planta (Subhash *et al.*, 2014).

La vermicomposta se genera en el tubo digestor de la lombriz, y de acuerdo al uso que se destine, se puede clasificar como: fertilizante orgánico, mejorador del suelo y medio de crecimiento (MC) para especies vegetales que se desarrollan en invernaderos (Domínguez *et al.*, 2000).

2.6.3. Efecto de la vermicomposta en las plantas.

Se ha demostrado que la adición de la vermicomposta a los suelos y sustratos de cultivo incrementa considerablemente el crecimiento y la productividad de una gran cantidad de cultivos (Hashemimajd *et al.*, 2004; Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2007); también favorece e incrementa la actividad biótica del suelo, su acción antibiótica, aumenta la resistencia de las plantas en contra de plagas, enfermedades y organismos patógenos; Además se puede utilizar sin inconvenientes en estado natural y se encuentra libre de nematodos.

Los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene regeneran las características químicas del suelo y, al igual que cierto tipo de hormonas de crecimiento, favorecen el desarrollo de las especies vegetales (Singh *et al.*, 2008).

Debido a que posee un pH neutro mejora las características estructurales del terreno, desliga suelos arcillosos y agrega suelos arenosos. Durante el transplante previene enfermedades y evita el choque por heridas o cambios bruscos de temperatura y humedad. Su elevada capacidad de intercambio catiónico (CIC) se debe a la presencia de grupos carbonilos e hidroxilos fenólicos y alcohólicos, entre otros, en su estructura (Pereira y Zezzi-Arruda, 2004).

Se ha reportado que la vermicomposta disminuye el efecto de las sales sobre la germinación y el crecimiento de las plantas. Así también tiene aplicación para secuestrar herbicidas que se encuentran en el suelo y para biorremediación de suelos contaminados con metales pesados provenientes de desechos de la industria del cromado (Oliva *et al.*, 2007).

Es conformada por materiales finamente divididos como el peat con gran porosidad, aireación drenaje, capacidad de retención de humedad la cual le permite adsorber y retener fuertemente los elementos nutritivos; en consecuencia, las vermicompostas pueden tener un gran potencial en las industrias hortícolas y agrícolas como sustrato para el crecimiento de la planta (Atiyeh *et al.*, 2000a). Actualmente se reconoce que en actividades hortícolas produce mejoras significativas en las plantas respecto a su aspecto, sanidad y rendimiento (Castillo *et al.*, 2000).

2.6.4 Roca Fosfórica

La roca fosfórica se obtiene de depósitos geológicos situados en todo el mundo, la apatita, un mineral de fosfato de calcio, es el componente principal de la roca fosfórica. Se recupera a través de minería a cielo abierto, aunque en algunos casos se extrae de minas subterráneas. El fósforo es uno de los elementos esenciales para las plantas, la disponibilidad de este en el suelo es uno de los mayores limitantes para alcanzar altos rendimientos de los cultivos de muchas especies vegetales en el trópico (Wakelin *et al.*, 2004).

Lamentablemente, muchos de los suelos son deficientes de las formas disponibles de fósforo para las plantas. Esta deficiencia se ha atribuido al bajo nivel de fósforo en los materiales originales, así como la alta fijación que este tiene por aluminio y óxidos ferrosos debido a las prácticas de cultivo intensivas que provocan una baja fertilidad del suelo (Odongo *et al.*, 2006). Esto es debido a que los suelos tropicales y subtropicales son extremadamente ácidos y deficientes en fosfatos, además tienen una alta capacidad de fijación de este elemento (Khan *et al.*, 2007).

Las rocas fosfóricas son minerales ricos en fósforo que generalmente presentan un alto contenido de calcio. Químicamente corresponden a fosfatos tricálcicos o apatitas, cuya principal característica es su escasa solubilidad en agua (Schwaner, 2006).

La aplicación de la roca fosfórica de manera directa en el suelo resulta una alternativa debido a que representa un bajo costo y está siendo utilizada como fertilizante fosfatado, no solo por su valor agronómico como fuente de fósforo sino también como fuente de carbono para el cultivo (Morillo *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta la baja solubilidad así como los factores que afectan en el proceso, se han realizado experimentos que ayuden a incrementar la solubilidad de la roca fosfórica y con ello aumentar la disponibilidad de fósforo para la planta; de las cuales se conocen tres tipos de rocas fosfóricas como son: las micronizadas, aciduladas y compactas (Morillo *et al.*, 2007).

La acidulación parcial consiste en tratar a la roca fosfórica molida con una porción del ácido requerido para convertir totalmente el fosfato tricálcico insoluble en fosfato monocálcico soluble en agua. En este proceso pueden ser usados ácidos como sulfúrico, fosfórico, nítrico, clorhídrico o combinación de ellos, aunque el más utilizado es el sulfúrico. Es conocido que la tasa de disolución de la roca fosfórica en el suelo depende de la concentración de protones (H^+) alrededor de los gránulos de roca fosfórica, de lo que podemos decir que la disolución de la roca fosfórica puede ser favorecida cuando el pH del suelo, el calcio intercambiable y la concentración de fósforo son bajos (Morillo *et al.*, 2007).

Su uso en la agricultura está recibiendo una mayor atención durante la última década, y varios informes han indicado que algunos microorganismos son capaces de solubilizar roca fosfórica insoluble y la liberación de fósforo soluble (Achala *et al.*, 2007).

2.6.4.1 Fijación del fósforo en el suelo

Las plantas utilizan una gran cantidad de fósforo en comparación con la cantidad total presente en el suelo. El mantenimiento de una buena cantidad de fósforo disponible para el crecimiento de las plantas es un problema, tanto en suelos ácidos como alcalinos. El problema comienza desde la tendencia del fósforo a combinarse con muchos constituyentes diversos del suelo para formar compuestos insolubles por medio de un proceso llamado colectivamente fijación de fósforo (Marroquín-Cabrera, 2006).

Todo el fósforo que entra al suelo se transforma, generalmente en formas más insolubles, pero permanece ahí como reserva. Una buena disponibilidad de fósforo depende de una adecuada solubilización. Cualquier mecanismo que disminuya la fijación y favorezca la solubilización conducirá a un mejor uso del fósforo por las plantas (Marroquín-Cabrera, 2006; Vargas-Ramírez, 2012).

Los microorganismos del suelo como las bacterias solubilizantes especialmente de fósforo (PSB) tienen la capacidad de solubilizar fosforo del suelo por acidificación de la rizosfera a través de la producción de ácidos orgánicos y enzimas como fitasas y fosfatasas (Marroquín-Cabrera, 2006).

2.6.5 Efectos del fósforo en las plantas

La nutrición fosforada de las plantas se realiza a partir de los iones del ácido ortofosfórico, principalmente se absorbe como H_2PO_4^- seguido del HPO_4^{2-} . El fósforo se ha demostrado que aumenta el crecimiento de plantas; Está presente en las semillas en cantidades mayores que en cualquier otra parte de la planta; sin embargo, se encuentra en gran proporción en las partes jóvenes en crecimiento. Como el nitrógeno, es un constituyente de todas las células vivas. Forma parte también de los fosfolípidos, nucleoproteínas y de la fitina, esta última es una forma de reserva de fósforo en las semillas (Marroquín-Cabrera, 2006). Este elemento representa un papel muy importante en la transformación de la energía en las células, tanto de las plantas como de los animales.

Por lo tanto, es necesario para las transformaciones normales de los carbohidratos en las plantas; por ejemplo, la degradación de almidón en glucosa. El fósforo es también necesario para la asimilación de las grasas, y aparentemente incrementa la eficiencia de los mecanismos cloroplásticos (Vargas-Ramírez, 2012).

2.7 Análisis proteómico en plantas

Las proteínas se encuentran entre las moléculas más estudiadas en plantas, incluyendo determinación de estructura, propiedades y función biológica; ya que se encuentran en todos los organismos, son las moléculas biológicas más abundantes y son de suma importancia para la función y organización celular vegetal; actualmente se dispone de avances biológicos cuantitativos a gran escala para estudiar los comportamientos de moléculas relevantes biológicamente, entre estas técnicas las más ampliamente utilizadas en la biología de plantas esta la Proteómica (Bertone y Snyder, 2005; García *et al.*, 2012).

La proteómica es el estudio de las proteínas pertenecientes a un sistema biológico mediante el uso de procesos bioquímicos adaptados para su análisis, para definir que las proteínas son expresadas por un genoma en un tejido o en una célula, el cual es dinámico y es el reflejo del medio ambiente en el que es estudiado el cual se denomina “proteoma”, término que fue acuñado en 1994; como respuesta a estímulos externos e internos las proteínas pueden ser modificadas postraduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas, por lo que obtener el proteoma de una célula es como tomar una fotografía de todas las proteínas en un momento determinado bajo una condición biológica determinada (Girotti, 2010; Pérez-Mora, 2012).

La proteómica ofrece la oportunidad de examinar y clasificar los patrones temporales de la acumulación de proteínas que ocurren en diferentes procesos vegetales. Las estrategias proteómicas desarrolladas permiten caracterizar las modificaciones de las proteínas que no pueden ser predichas de una secuencia genómica, complementando las funciones de esta; ayudando así al entendimiento, posible control y manipulación de las características de calidad y nutricionales de las plantas (Mann y Jensen 2003; García *et al.*, 2012).

2.7.1 Ramas especializadas en el estudio de aspectos particulares de la proteómica.

La proteómica tiene como meta primordial brindar una descripción completa y cuantitativa de la expresión de las proteínas; por lo que la investigación en la actualidad es amplia y se divide en tres áreas fundamentales:

1. Proteómica de expresión: Tiene como objetivo el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. La información obtenida nos puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en la transducción de señales, o la identificación de proteínas específicas de una enfermedad (Girotti, 2010; Pérez-Mora, 2012).
2. Proteómica funcional: Es el estudio de la función de las proteínas dentro de un sistema biológico y la regulación de su expresión dentro de ese sistema, aquí también se incluye el estudio de la afinidad entre la interacción ligando-receptor.
3. Proteómica estructural: Involucra la determinación y el análisis de estructuras tridimensionales de proteínas que contribuyen a la función y su identidad molecular con otras proteínas. Por lo que se ha potenciado su aplicación en la industria farmacéutica ya que se buscan blancos para el uso de nuevas drogas (Girotti, 2010; Pérez-Mora, 2012).

Para llevar a cabo cualquiera de los estudios proteómicos mencionados anteriormente, es necesaria la utilización y aplicación de un conjunto de técnicas que permiten con mayor facilidad el estudio de las proteínas, los cuales comprenden tres pasos importantes: 1) la extracción de la proteína, 2) separación de la proteína por electroforesis (SDS-PAGE) y 3) el análisis por espectrometría de masas.

2.8. Extracción de proteína.

Para obtener una buena extracción de proteína debemos de tener en cuenta la preparación de la muestra siendo este un paso crítico para que el estudio proteómico sea adecuado; con lo que se logra conseguir el mayor número de proteínas de una célula, tejido, órgano u organismo disgregando el tejido y/o rompiendo a la célula para obtener el proteoma (Ramírez-Merchant, 2015).

Es conocido que las plantas contienen relativamente contenidos bajos en proteína, además de que contiene proteasas (serinproteasas y metalproteasas), que degradan a las proteínas y compuestos como polisacáridos, pigmentos, ácidos nucleicos, lípidos y compuestos fenólicos que dificultan la extracción y la separación de las proteínas (Pérez-Mora, 2012; Ramírez-Merchant, 2015). Las metodologías más utilizadas para la extracción son la utilización de solventes orgánicos como fenol, tampones acuosos en presencia de detergentes o precipitaciones directas con ácido tricloroacético (Faurobert *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2009).

Cada una de estas metodologías suelen ser utilizadas de acuerdo a la proteína de interés, ya que la solubilidad está asociada a la localización intracelular de estas; no hay una metodología global para la extracción ya que sirve para una planta pero para otra no, esto depende de muchos factores y la adecuación particular de dicha metodología es fundamental para el desarrollo del experimento; ya que para los estudios, el análisis de la mezcla de proteínas debido a su rapidez y calidad de los resultados requiere de proteínas bien resueltas, por lo tanto se deben de evitar manchas producidas por artefactos de la proteólisis (Pérez-Mora, 2012).

El aislamiento de una proteína se lleva a cabo mediante una lisis o rotura celular, para su posterior extracción con un tampón adecuado. Los métodos utilizados se dividen en:

- Métodos físicos: en estos métodos encontramos rotura celular por Choque osmótico, rotura mecánica, congelación/descongelación, sonicación.
- Métodos químicos: Están basados en el empleo de detergentes; estos detergentes disocian las interacciones lípido-proteína e interacciones hidrofóbicas entre las proteínas, rompiendo membranas y ayudando además a solubilizar las proteínas.

El método de rotura celular a elegir depende de las características mecánicas del tejido o célula de donde se va a aislar la proteína así como su localización. Generalmente se combinan ambos métodos, por medio de una lisis física en tampón de lisis con detergente. El detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) es uno de los más utilizados por su alta eficiencia de solubilización (De la Cuesta, 2010).

Para realizar una correcta solubilización de las proteínas de una muestra ésta debe llevarse a cabo en un medio tamponado suplementado con una serie de compuestos. En primer lugar, los tampones de solubilización deben contener alta concentración de un agente caotropo, generalmente Urea o una combinación de esta con Tiourea, que desnaturaliza las proteínas mediante la ruptura de enlaces hidrofóbicos de las proteínas, así como de las interacciones intramoleculares (De la Cuesta, 2010; Pérez-Mora, 2012).

En segundo lugar, se debe incluir un detergente (CHAPS, SDS, Tritón X-100) que mantenga a las proteínas en disolución, al impedir que se formen de nuevo las interacciones hidrofóbicas. La presencia de un agente reductor (ditiotretitol, β -mercaptoetanol, fosfina) que produzca la ruptura de los puentes

disulfuro entre residuos de cisteína es también fundamental para una solubilización eficiente (Jorrín *et al.*, 2009; De la Cuesta, 2010; Pérez-Mora, 2012).

Esta preparación se somete a centrifugación 15000 rpm para eliminar los restos celulares y separar a él sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, del precipitado además de restos celulares que también contienen proteínas asociadas a membranas (Chen *et al.*, 2012). Una vez que la proteína se ha extraído de su entorno natural está expuesta a muchos agentes que pueden dañarla. Los cambios bruscos de pH, ácidos y bases fuertes, temperaturas extremas y la acción de las proteasas (enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos) son los principales factores que pueden desnaturizar a las proteínas (Ramírez-Merchant, 2015).

2.9. Cuantificación de proteínas.

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de proteínas, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, así como para otros muchos propósitos. Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas los cuales se basan en:

- ✓ La propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV
- ✓ Para la formación de derivados químicos
- ✓ La capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes

Entre los métodos más utilizados para la cuantificación de proteína encontramos los métodos de absorción, métodos colorimétricos y métodos fluorimétricos (Bermejo, 2010; Ramírez-Merchant, 2015). De los cuales nos centraremos en los métodos colorimétricos que se dividen en:

- ✓ Biuret
- ✓ Lowry
- ✓ Bradford
- ✓ BCA

De los cuales en este estudio se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual consiste en el acoplamiento del colorante comassie (Blue G-250) a las proteínas, el colorante interactúa con la proteína a través de fuerzas de van der Waals entre las regiones hidrofóbicas de la proteína y la región no polar del colorante, y la interacción electrostática entre el colorante cargado negativamente y grupos amino cargados positivamente de proteína, se absorbe a 595 nm; existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas, este método es el más utilizado para la cuantificación por ser factible, sencillo, rápido y barato ya que solo se utiliza un reactivo y no necesita grandes cantidades de muestras así como pocas sustancias interfieren en su determinación (Sharma *et al.*, 2004; Bermejo, 2010).

2.10. Separación de las proteínas por electroforesis (SDS-PAGE)

La tecnología más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de proteínas; la electroforesis es un método analítico, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico y fue empleada por primera vez en 1937 por Tiselius (De la Cuesta, 2010; Ramírez- Merchant, 2015).

Las proteínas se separan de acuerdo a su masa y como las proteínas son solubilizadas en dodecilsulfato sódico (SDS), no suele haber problemas de solubilización. Es una técnica sencilla, reproducible y permite la separación de proteínas de 10-300 KDa; Cuando se aplica un campo eléctrico a un medio que contiene partículas cargadas, las partículas cargadas negativamente migran hacia

el ánodo polo positivo mientras que, las cargadas positivamente migran hacia electrodo negativo cátodo (Fernández, 2013).

2.10.1 Fundamentos de la electroforesis (SDS-PAGE)

La electroforesis (SDS-PAGE) se basa en geles de poliacrilamida que se forman mediante la polimerización de la acrilamida con bisacrilamida, creando una red porosa a través de la cual las proteínas migran en función a la relación carga/masa. El dodecilsulfato de sodio (SDS) es empleado para proporcionar una carga neta negativa a todo el entorno de manera que la carga intrínseca de las proteínas se vuelven insignificante y la migración solo depende de su masa (De la Cuesta, 2010). Existen muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida (Ramírez-Merchant, 2015).

Los geles de poliacrilamida son los soportes de elección para la electroforesis porque son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato (S₂O₈) (Álvarez-Contreras, 2011).

Además variando la concentración de acrilamida y bisacrilamida se pueden conseguir tamaño de poro controlado, que a su vez sirven de tamices moleculares que potencian la separación; las moléculas más pequeñas que los poros se desplazan fácilmente a través del gel. Las moléculas mucho mayores quedan casi inmóviles y las moléculas de tamaños intermedios se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad (Núñez, 2008; Álvarez-Contreras, 2011).

El dodecilsulfato de sodio (SDS) conocido también como lauril sulfato, es un detergente aniónico capaz de romper las interacciones no covalentes, el cual se agrega en la preparación de la muestra con un agente reductor, β -Mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro de tal manera de desnaturalizar la proteína. Los polipéptidos desplegados se unen al SDS cargándose negativamente, siendo en general, la cantidad de SDS unido proporcional al peso molecular del polipéptido e independiente de su secuencia. Así, los complejos SDS- proteínas formadas se someten a electroforesis sobre gel de poliacrilamida (Álvarez-Contreras, 2011). La dirección de la corrida es vertical descendente; después de la electroforesis, las proteínas se visualizan añadiendo un colorante, tal como el azul de Coomassie que se fija a las proteínas pero no al gel (Lehninger, 2009).

2.11. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas tuvo su origen en 1886, cuando Goldstein descubrió los iones positivos en un tubo de descarga eléctrica a baja presión. Posteriormente, Wien descubrió que los campos eléctricos o magnéticos fuertes refractaban los iones, y en 1899 construyó un dispositivo con campos eléctricos y magnéticos paralelos que separaban los rayos positivos según su relación carga/masa. Casi a la vez, en 1912, Joseph Thomson continuó con los estudios de los rayos catódicos de Goldstein, y al igual que Wien pero de diferente forma consiguió crear el primer espectrómetro de masas (Fernández, 2013).

Las técnicas más modernas aparecieron en los años 1950-1960, cuando Dehmelt y Paul desarrollaron la trampa de iones. A finales de los 80 se desarrollaron las dos técnicas de ionización más empleadas hoy en día, Fenn creó la ionización por electrospray, Tanaka y Karas desarrollaron de forma independiente y casi a la vez, la ionización/desorción por láser asistido por matriz (MALDI) (Fernández, 2013).

Mediante espectrometría de masas es posible obtener información estructural de las proteínas tal como secuencia de aminoácidos y la masa de los péptidos. Esta información puede utilizarse para identificar proteínas comparando los resultados con bases de datos. La espectrometría de masas también resulta útil para identificar y localizar modificaciones post-traduccionales en las proteínas (Morales-Sánchez y Gallo-Ramírez, 2006).

La espectrometría de masas se basa entonces en la producción de iones en fase gaseosa de una mezcla de biomoléculas y la separación de los mismos en un analizador de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) (Girotti, 2010). Los iones así separados son detectados en función de su abundancia. Para lograr la formación, separación y detección de estos iones, los pasos básicos para un análisis de espectrometría de masas son:

1. Proteólisis de las proteínas por acción de proteasas, generalmente tripsina que rompe en lisina y arginina, para el posterior análisis por huella peptídica.
2. Una ionización suave de los péptidos por ionización/desorción laser asistida por matriz (MALDI), o ionización por electrospray (ESI).
3. Separación de los iones de acuerdo a su relación masa/carga en un analizador de masas, de los cuales los más usados son el de tiempo de vuelo (TOF), El cuadrupolo, la trampa de iones y la transformada de Fourier (TF) y Orbitrab.
4. Selección de iones más abundantes los cuales son sometidos a un nuevo análisis de masas.
5. Medida de las masas en un detector obteniendo el espectro de masas

Estos espectrómetros requieren un complejo sistema de vacío para mantener una baja presión en todos los componentes. El sistema de entrada introduce la muestra en la fuente de iones, donde los componentes se convierten en iones gaseosos. Este flujo de iones gaseosos es acelerado en el analizador de masas, donde se separan en función de su relación m/z , y por último llegan al detector, que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que pueda ser procesada, almacenada e interpretada, dando lugar al espectro de masas (Fernández, 2013).

Finalmente, los datos son procesados a través de una serie de algoritmos computacionales que determinan la secuencia de las proteínas, el más usado es Mascot (MatrixScience, UK), el cual es un motor de búsqueda que usa datos de espectrometría de masas para identificar proteínas en Bases de Datos de libre acceso (Pérez-Mora, 2012).

3. Justificación

Actualmente se han desarrollado muchos productos para satisfacer las necesidades nutrimentales de la población, elaborando productos que únicamente dañan a la salud por su alto contenido de conservadores y aditivos químicos, por ello es necesaria la búsqueda de alternativas para producir alimentos ricos en nutrientes esenciales para el ser humano, principalmente proteínas.

Se han realizado diversos estudios en plantas que puedan proporcionar esos nutrientes; como *Moringa oleífera* a la cual se le han atribuido diferentes propiedades medicinales y cuenta con una multitud de usos, debido a que contiene nutrientes esenciales como vitaminas, minerales y aminoácidos así como también un alto contenido proteico, por lo que resulta ser una buena alternativa alimenticia; ese alto contenido de nutrientes generado por la planta depende directamente de los nutrientes presentes en el suelo, si este es pobre en macro y micronutrientes, las plantas que se desarrollen también tendrán una menor cantidad de nutrientes, esto puede ser contrarrestado si al suelo se le proporcionan insumos orgánicos que tengan la característica de brindar nutrientes al suelo como nitrógeno y fosforo, que sean asimilados por las plantas y además de que contribuyen en la disminución de la erosión. Lo anterior nos llevó a cultivar plantas de *Moringa oleífera* adicionando al suelo vermicomposta y roca fosfórica, para determinar su efecto en el contenido de proteína en las hojas.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de insumos orgánicos sobre el crecimiento y el perfil proteómico de *M. oleífera*.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de roca fosfórica y vermicomposta sobre las características morfológicas y el contenido de clorofila de *Moringa oleífera*.
- Analizar el contenido proteico en las hojas de *M. oleífera* durante el experimento en invernadero.
- Determinar el perfil proteómico en las hojas de *Moringa oleífera* fertilizadas con vermicomposta y roca fosfórica.

5.0 Metodología

5.1 Ubicación del área de estudio y material vegetal

La parte experimental de la caracterización del suelo, extracción y cuantificación de proteínas así como la identificación de los pesos moleculares de las plantas se desarrollaron en el laboratorio de Biología Molecular del Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas analíticas en biocombustibles ubicado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (16° 45' 26.2" LN y 93° 10' 24.8" LO; altitud=584 msnm).

Se cultivaron plantas de *M. oleífera* en el invernadero del ITTG, a partir de plantas sanas y libres de enfermedades, después de 45 y 90 días se recolectaron hojas que no estuviesen maltratadas y/o secas en bolsas de plástico evitando con ello un daño físico y así trasladarlas con mayor facilidad al laboratorio. .

5.2 Establecimiento del experimento

Para la realización de este experimento se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado en donde se evaluaron los siguientes tratamientos: S+V, S+P (control negativo), S+P+U (control positivo), S+R, S+R+V. En el cuadro 5.1 se muestra la distribución de los tratamientos (Pérez, 2006; De la Cruz-Lázaro *et al.*, 2009).

Cuadro 5.1. Distribución de los tratamientos

S+R+V	S+V	S+P	S+R	S+P+U
S+P+U	S+R	S+R+V	S+V	S+P
S+P	S+V	S+P+U	S+R	S+R+V

Dónde:
S= Suelo
P= Planta
V= Vermicomposta
R= Roca Fosfórica
U= Urea

Se utilizaron bolsas de plástico para cultivo de 60 cm de altura y 20 cm de diámetro, a las que se les agregó 9 Kg de suelo seco y tamizado, obtenido en el “Rancho la Escondida” ubicado en la zona de riego del distrito 101 del municipio de la Concordia, Chiapas (16°06'58"N 92°41'20"O ; altitud de 550 msnm), este fue mezclado con vermicomposta, roca fosfórica y urea de acuerdo a cada tratamiento; la caracterización del suelo y de la vermicomposta utilizados se indican en el cuadro 5.2.; se consideró a una bolsa de cultivo como una unidad experimental, y en cada una se sembraron 3 semillas a 1 cm de profundidad aproximadamente y posteriormente fueron colocadas en invernadero y regadas con agua 2 veces a la semana (Figura 5.1). Se realizaron dos muestreos, a los 45 y 90 días después de la emergencia de las plantas de *M. oleífera*.



Figura 5.1. Establecimiento del experimento en el invernadero

Cuadro 5.2. Caracterización fisicoquímica del suelo y la vermicomposta

Parámetros fisicoquímicos	Suelo	Vermicomposta
pH	6.76 ± 0.11	7.41 ± 0.020
Textura	Franco arcilloso arenoso	Franco arenoso
Humedad	43.61 %	49.25%
Fósforo (mg/Kg)	4 ± 0.51	-
Carbono (mg/Kg)	9.65 ± 1.06	-
Conductividad eléctrica (ds/m)	0.430 ± 0.30	0.052 ± 0.036
CRA (g H ₂ O/Kg de suelo)	857.39 ± 19.21	0.009247 ± 0.025
Nitrógeno (g/Kg ss)	1.7 ± 0.009	2.16

5.3. Determinación de las variables morfométricas de *M. oleífera*.

Las variables morfométricas que se determinaron fueron longitud del tallo el cual se midió desde la base de la planta hasta el ápice de crecimiento por un flexometro (pretul) y diámetro del tallo que fue medido a una distancia aproximada de 2 cm desde la base de la planta por un vernier Surtex (stanless hardened), las cuales se realizaron una vez por semana durante 90 días de experimento (Figura 5.2) (Singh *et al.*, 2008; Pérez-Inocencio, 2012).



Figura 5.2. Esquema de las variables morfológicas

5.4. Evaluación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila se realizó tomando seis lecturas de diferentes hojas por cada planta con un clorofilómetro SPAD 502 KONICA MINOLTA una vez por semana (Figura 5.3), las unidades fueron reportadas como spad (Morales-Esquer, 2005).



Figura 5.3. Medición de clorofila

5.5. Preparación del material biológico

La preparación de las muestras se realizó pesando 0.5 gramos de hojas de *M. oleífera* frescas de cada uno de los tratamientos en una balanza marca Ohaus modelo PA214, para posteriormente ser maceradas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino de malla 100, que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso (Chen *et al.*, 2012).

5.6. Extracción de las proteínas

La extracción de proteína de las hojas de *M. oleífera* fue realizada empleando el protocolo de extracción modificado por Chen *et al.*, (2012). Del tampón de extracción que contiene [Tris-HCl 0.1 M + ácido ascórbico 0.1% + glicerina 10% + polivinilpolipirrolidona 1% + β - mercaptoetanol 5%] a un pH de 8, se agregó 1 mL a cada una de las muestras y se incubaron a 4 °C por 4 horas. Después, las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrifuga marca Hermle tipo Z326K (Labortechnik GmbH, Stuttgart, Germany). Posteriormente se tomó 1 mL para la cuantificación de proteína por Bradford y 10 μ L para la electroforesis.

5.7. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford

Para la determinación del contenido de proteína total se empleó 1 mL de muestra y se le agregó 1mL del reactivo de Bradford que posteriormente se mezcló por inversión. Se dejó en reposo durante 15 minutos para luego medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter, DU700, E.U. Para calcular la concentración se utiliza una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) Sigma- Aldrich (1 mg/mL) (Bradford, 1976).

5.8. Electroforesis SDS-PAGE.

La separación del complejo proteico se llevó a cabo mediante la preparación de un gel de 0.75 mm de espesor; tal como fue realizada por (Ramírez-Merchant, 2015).

5.8.1 Gel de separación.

El gel de separación también llamado gel compactador o de resolución de poro pequeño, se preparó al 10% a base de Acrilamida- Bis 30%, Tris-HCl 1.5 M, SDS 10%, Persulfato de amonio 1%, agua destilada y TEMED como se muestra en el anexo I. La solución resultante se mezcló por inversión y se colocó en el espacio entre los cristales cuidando que no quedaran burbujas (Figura 5.4).



Figura 5.4. Adición del gel separador entre los cristales

5.8.2. Gel de apilamiento

El gel de apilamiento o concentrador, se preparó al 4% a partir de una solución de Acrilamida-Bis 30%, Tris-HCl 0.5 M, SDS 10%, Persulfato de amonio 1%, agua destilada y TEMED ver anexo I, esta solución se mezcló igualmente por inversión, y se adicionó de igual manera que la solución anterior y se le colocó el peine para formar pozos de 1.5 mm (Figura 5.5).



Figura 5.5. Adición del gel concentrador y el peine

Una vez polimerizado el gel, se retiraron los peines para permitir la formación de pozos, después se colocó el cassette dentro de la caja de electroforesis, para posteriormente adicionar la solución amortiguadora de corrida 1X (180 mL en el tanque inferior y 120 mL en el tanque superior) hasta cubrir completamente los pozos como se muestra en la figura 5.6.

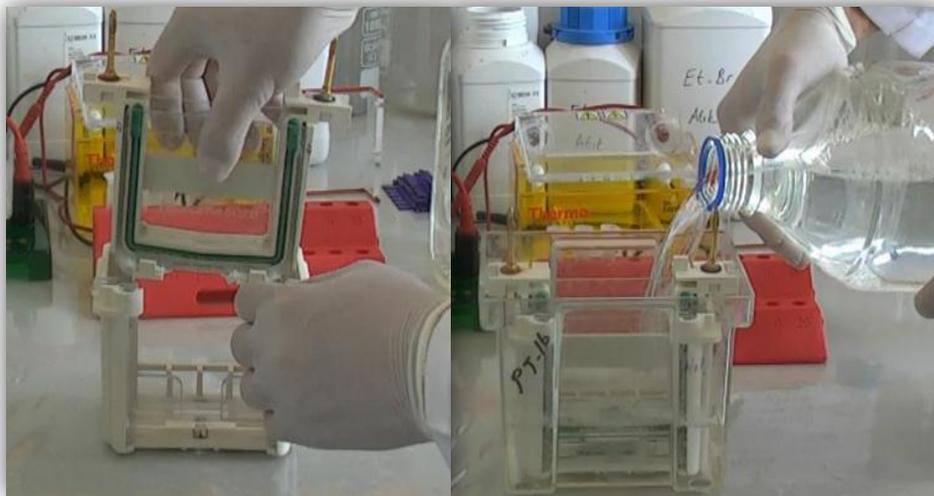


Figura 5.6. Montaje y llenado de la caja de electroforesis

5.8.3 Desnaturalización de las proteínas.

La desnaturalización de las proteínas se llevó mediante calentamiento a 95 °C durante cinco minutos en un termobloque (Thermomixer Compact Eppendorf, USA) (Ramírez-Merchant, 2015).

Las muestras se prepararon colocando 10 μ L del sobrenadante de la muestras + 10 μ L de buffer Laemmli Sample 1x en tubos Eppendorf para PCR de 0.5 mL, mismo procedimiento se realizó para la albumina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL utilizado como control positivo. Después de transcurrida la desnaturalización se cargaron las muestras en cada uno de los pozos aproximadamente de 5 a 15 μ L evitando que la muestra saliera del pozo (Figura 5.712); cargando en el primer carril una mezcla de marcadores de tamaño molecular (MT) seguido de BSA y las muestras en los carriles siguientes.



Figura 5.7. Adición de las muestras a los pozos para la electroforesis SDS-PAGE

Una vez cargadas las muestras se ejecutó una corriente de 80 volts por 20 minutos para el gel de apilamiento y 120 volts por 40 minutos para el gel de separación. Una vez que el tiempo de corrida transcurrió, se desmontó el equipo para extraer cuidadosamente del cassette los cristales y separarlos de manera que el gel quede posado sobre uno de los cristales, posteriormente se sumergió en una solución para teñir de colorante azul de coomassie compuesta por ácido acético 10%, metanol 40%, azul de coomassie 0.1% y agua destilada (Figura 5.8) ver anexo II, en agitación durante 30 minutos.



Figura 5.8. Tinción del gel con azul de Coomassie

Después del tiempo de tinción se retiró la solución y se le colocó una solución para desteñir compuesta por ácido acético 10%, metanol 40% y agua destilada ver anexo II, con lo que se logró eliminar las asociaciones no específicas del gel con el colorante y con ello la mejor visualización de las bandas de proteínas por lo que la solución se cambió cada 15 minutos (Figura 5.9).



Figura 5.9. Adición de la solución para desteñir

5.9. Análisis de datos.

Los datos obtenidos en cada una de las determinaciones, fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento con mayor rendimiento en las variables evaluadas se determinó mediante la comparación de medias con un nivel de confiabilidad del 95% ($P < 0.05$) utilizando el paquete de datos de Statgraphic Centiruum XV.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Variables de crecimiento y desarrollo del cultivo de *M. oleífera* en invernadero

De acuerdo a los resultados obtenidos de las plantas de *M. oleífera* las que fueron cultivadas con la interacción de roca fosfórica y vermicomposta, registraron una altura mayor en comparación a los demás tratamientos (Figura 6.1). El análisis de varianza reveló a los 45 días después de la emergencia (dde) una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos mediante un análisis de medias ($p < 0.05$), los resultados indicaron que el tratamiento S + R + V influyó positivamente sobre el crecimiento de las plantas de *M. oleífera* obteniendo plantas con mayor altura (45 cm) a diferencia de los controles quienes presentaron una altura media por debajo de los 31 cm; sin embargo cuando los insumos fueron agregados individualmente como el caso de S + R y S + V presentaron una altura de 29 cm y de 39 cm respectivamente.

El análisis de varianza de los resultados de la altura de las plantas de *M. oleífera* a los 90 días después de la emergencia, indicaron que no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos, y las plantas con mayor altura (76 cm) se obtuvieron con el tratamiento S + R + V, mientras que los controles S + P y S + P + U presentaron alturas de 58 y 66 cm respectivamente; así mismo, al adicionar de manera individual vermicomposta se obtuvo una altura de 54 cm y roca fosfórica registro una altura de 60 cm.

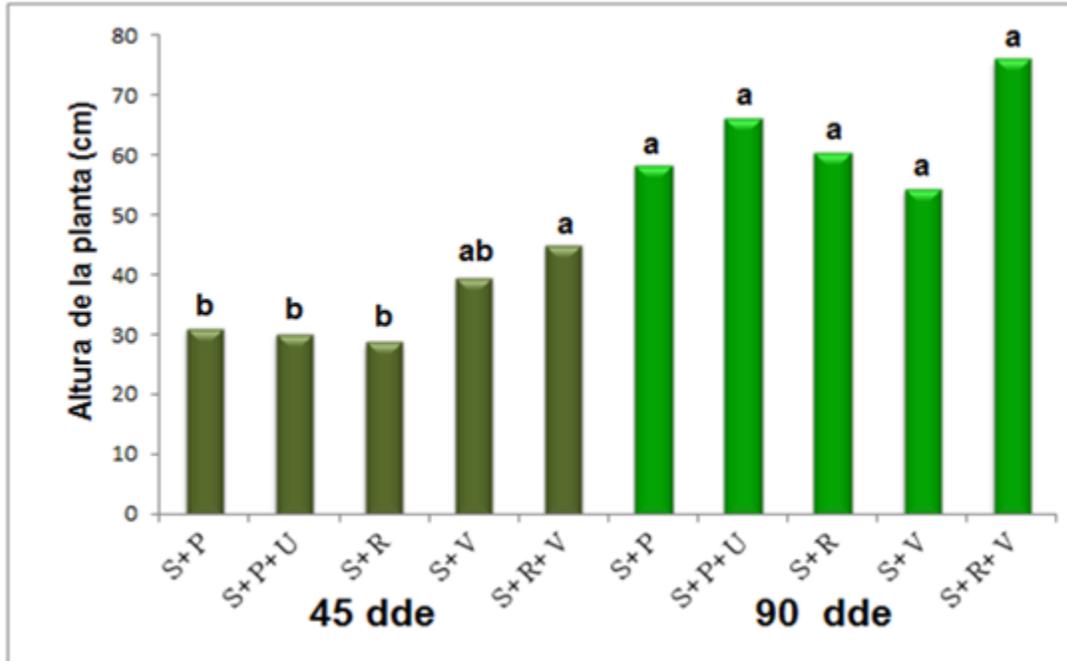


Figura 6.1. Altura de las plantas de *M. oleifera* a los 45 y 90 días después de la emergencia (dde).

En la figura 6.2, se muestran los resultados obtenidos con respecto al efecto de la adición de insumos orgánicos sobre el diámetro del tallo de las plantas de *M. oleifera*, a los 45 días después de la emergencia (dde); el análisis de varianza indicó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. La prueba de comparación de medias mostró que las plantas que fueron tratadas con S + R + V, registraron el mayor diámetro del tallo (7 mm) en comparación con el diámetro alcanzado por los controles que tuvieron un diámetro por debajo de 5 mm, a diferencia de las plantas tratadas con vermicomposta y roca fosfórica individualmente que obtuvieron diámetros de 5 mm respectivamente. De igual forma los resultados obtenidos de diámetro del tallo a los 90 días después de la emergencia, el tratamiento S + R + V presentó las plantas con mayor diámetro (11 mm), que si bien no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y los controles presentando estos diámetros menores a 10 mm, cabe mencionar que los tratamientos S + R y S + V registraron plantas con un comportamiento similar entre sí con un diámetro de 10 mm.

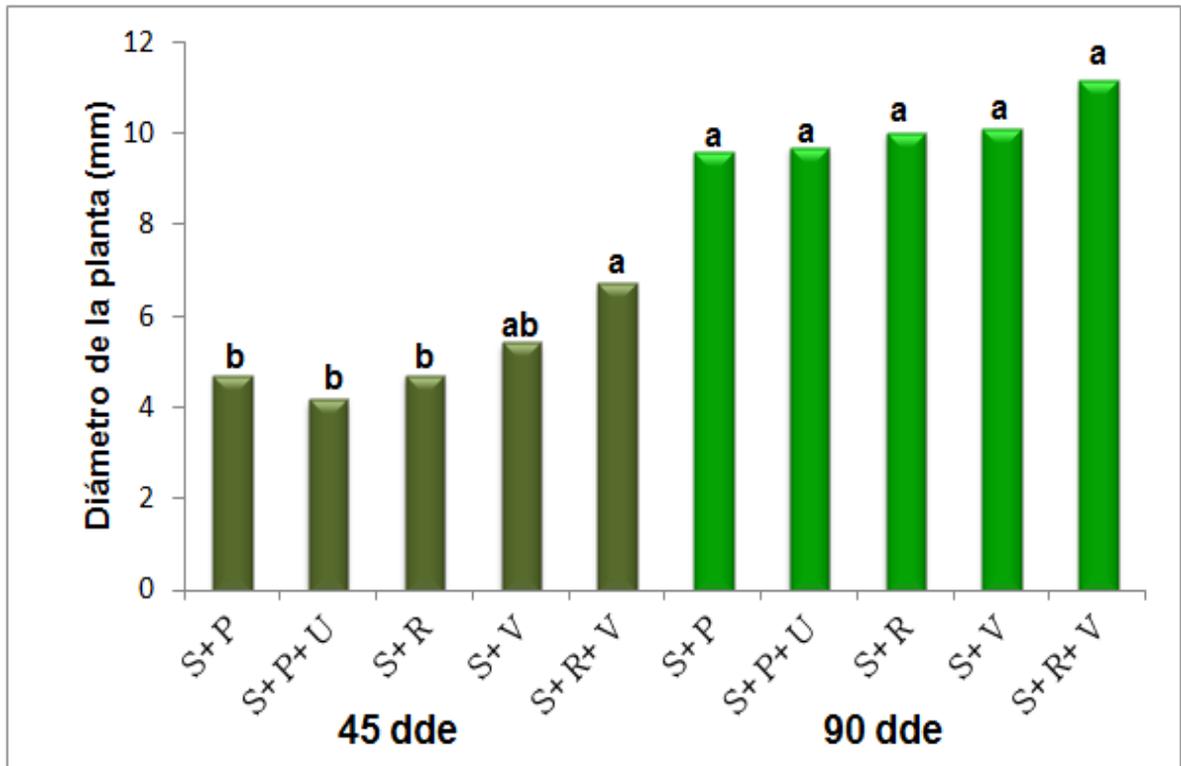


Figura 6.2. Diámetro de las plantas de *M. oleifera* a los 45 y 90 días después de la emergencia.

Es conocido que el uso de vermicomposta y roca fosfórica genera un efecto positivo en las plantas ya que al ser aplicados simultáneamente como insumos orgánicos y componentes del sustrato se obtienen rendimientos mayores (Gutiérrez-Miceli, 2007), por lo que en este estudio se observó que el tratamiento S + R + V registro un aumento considerable en cuanto a la altura y diámetro del tallo en las plantas de *M. oleifera*. Esto puede deberse a que la vermicomposta contiene ácidos húmicos y reguladores del crecimiento vegetal, lo que genera un aumento en la tasa de germinación y el crecimiento de las plantas (Arancon *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008); la mayoría de los nutrientes están en formas disponibles, como son nitratos, fosfatos, calcio intercambiable y potasio soluble; lo cual proporciona a la planta una mayor velocidad de crecimiento garantizando mayor acumulación y transporte de nutrientes, además participan en funciones esenciales de las plantas.

Por su parte, la adición de roca fosfórica proporciona a la planta un aporte considerable de fósforo el cual tiene una participación fundamental en la formación de estructuras biológicas, así como el almacenamiento y transferencia de energía (NAD, NADP y ATP), respiración y fotosíntesis, transformación de azúcares y almidones; también es elemento clave en el movimiento de nutrientes en la planta, división y crecimiento celular (Bernal y Espinosa, 2003; Sánchez, 2007; Calderón-Vásquez *et al.*, 2009).

En este sentido Sindoni *et al.* (2009), reportaron que la mayor altura y diámetro del tallo en plantas de lechosa (*Carica papaya L.*) "Maradol amarilla", se obtuvieron en aquellas que fueron propagadas con vermicomposta; así mismo Singh *et al.*, (2008), reportaron que el uso de vermicomposta en los cultivos de fresa (*Fragaria x ananassa Duch*), presentaron un efecto positivo sobre el crecimiento, además de una notable disminución en los desórdenes fisiológicos de la planta, también aportó frutos más firmes con color atractivo y atributos de buena calidad, de modo que aumentó el rendimiento del cultivo; por otro lado López *et al.*, (2014), observaron que en la novena semana de tratamiento presentaron diferencia significativa en la altura con una dosis alta de fósforo en plantas de caraota (*Phaseolus vulgaris L.*); caso contrario con el diámetro del tallo en que no observaron diferencias significativas entre tratamientos, aunque si existió una tendencia a mayor repuesta a las diferentes dosis de roca fosfórica.

6.2 Evaluación del contenido de clorofila en las plantas de *M. oleifera*

El contenido de clorofila es uno de los más importantes estimadores de la fotosíntesis; los organismos fotosintetizadores emplean diferentes tipos de pigmentos fotosintéticos, como aquellos implicados directamente a la transformación de la energía lumínica en energía química y aquellos que son capaces de absorber la luz a diferentes longitudes de onda y transformar la energía absorbida a clorofila aumentando así la cantidad de luz disponible para la fotosíntesis (García *et al.*, 2006).

Como se puede observar en la figura 6.3, el contenido de clorofila en las plantas de *M. oleifera* a los 45 días después de la emergencia (dde), reveló mediante el análisis de varianza de medias, que el tratamiento en el que se encontró mayor contenido de clorofila es S + P + U con 43 unidades SPAD en comparación con los demás tratamientos, así el tratamiento S + P registró un contenido de clorofila de 41 unidades SPAD; es de importancia notar que los tratamientos con adición de insumos orgánicos como son: S + V y S + R tuvieron un comportamiento similar con 40 unidades SPAD, de igual manera el tratamiento S + R + V registró 39 unidades SPAD estando por debajo de los controles. La urea es un fertilizante ampliamente usado en la agricultura a escala global, esto debido a su bajo costo, su facilidad de manipulación, estabilidad química y su elevado contenido de nitrógeno en un 46%, tiene la característica principal de ser soluble en agua, lo que le permite descomponerse rápidamente en amonio (NH_4^+) (Wang *et al.*, 2008); como es bien sabido el nitrógeno incrementa la capacidad de intercambio de cationes de las raíces a la planta, lo que hace más eficaz la absorción de otros nutrientes así como también es un elemento necesario para la multiplicación celular y desarrollo de órganos vegetales, tiene una participación importante para la síntesis de clorofila y en el proceso de fotosíntesis (Raven *et al.*, 2007) asimilación y síntesis de productos orgánicos.

Por lo que el uso de urea proporcionó a las plantas de *M. oleifera* una mayor aportación de nitrógeno, lo que generó un aumento en el contenido de clorofila en las hojas y se vio reflejado ya que el color verde fue más intenso, así como una mayor producción de hojas. Resultados similares fueron reportados por Morales-Esquer (2005), encontró que en el cultivo de sandía (*Citrillus lannatus*), los valores mayores de clorofila se encontraron cuando se aplicó urea como fertilizante en una proporción de 1 Kg urea/ha ya que a mayor concentración de urea se generó una inhibición por alta concentración de nitrógeno.

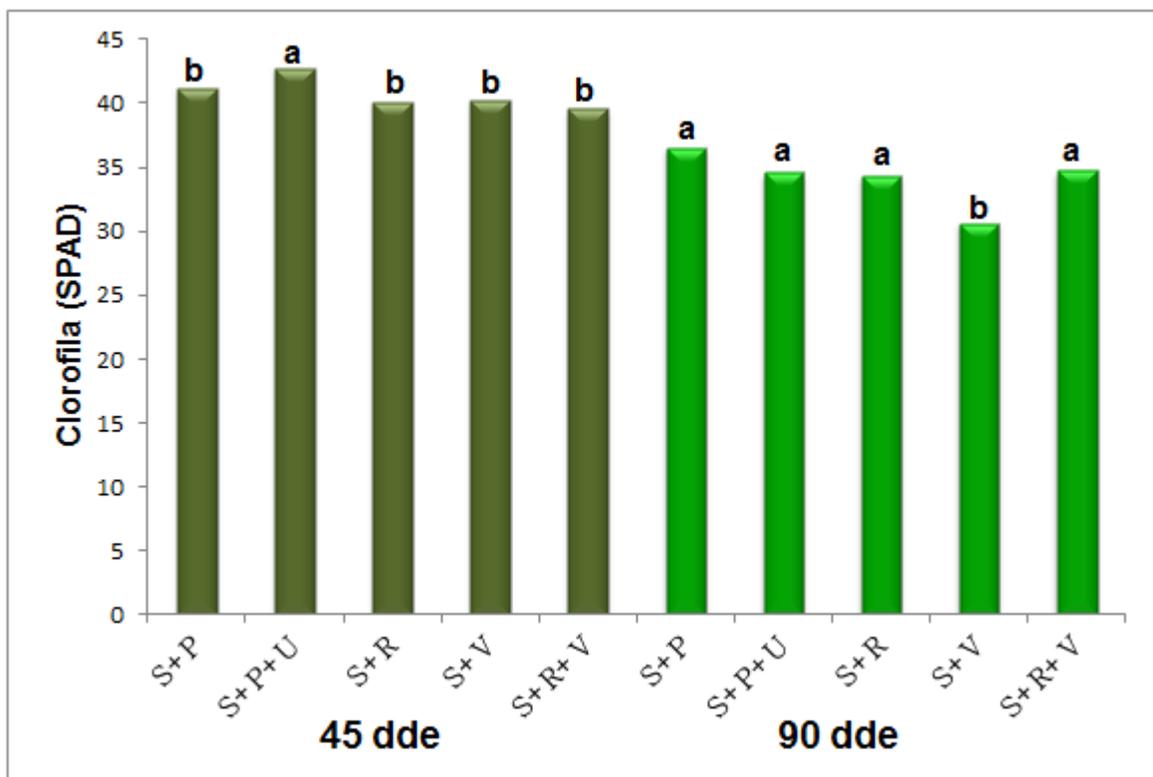


Figura 6.3. Contenido de clorofila de las plantas de *M. oleifera* a los 45 y 90 días después de la emergencia.

Por otro lado, los resultados obtenidos a los 90 días después de la emergencia (dde), los tratamientos de acuerdo al análisis de medias registró que el tratamiento con mayor contenido de clorofila fue el tratamiento S+P (suelo + planta) con 36 unidades SPAD, seguido de los tratamientos S+ R + V, S + R y S + P + U que presentaron 34 unidades SPAD, mostrando diferencia significativa respecto al tratamiento S+V con 30 unidades SPAD que presenta menor contenido de clorofila (Figura 6.3).

Esto puede atribuirse que a los 90 días la planta tiene mayor demanda de nutrientes para su desarrollo, así mismo el uso de insumos orgánicos como la vermicomposta y roca fosfórica genera beneficios importantes tanto al suelo como a las plantas, aporta al suelo características importantes entre ellas su capacidad buffer y pH del suelo (Babou et al. 2007; Duran y Henríquez, 2010); si bien genera una mayor solubilización de nutrientes; a su vez, el incremento de pH en el suelo; propicia en cuanto al fósforo una inmovilización, ya que a pH ácidos entre 5.5 a 6.5 existe una mayor movilidad de fósforo (Becerra *et al.*, 2007; Basantes, 2010). Así mismo las plantas que tienen un aporte insuficiente de nutrientes presentan muchos síntomas característicos de la propia deficiencia y son apreciados muchos de ellos a simple vista, en los que se encuentran la disminución en el crecimiento, clorosis entre otros (Martínez *et al.*, 2009); es por ello que el tratamiento de S+P al no tener adición de insumos orgánicos, generó en las plantas una adaptación en cuanto a la asimilación de los nutrientes y con condiciones más estables en cuanto al contenido de clorofila.

6.3 Análisis proteómico de *M. oleífera*

6.3.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

En cuanto al contenido de proteínas totales de las hojas de *M. oleífera* que se muestra en la figura 6.4 se pudo observar que a los 45 días se encontraron porcentajes que oscilaban entre los 27 y 30 % de proteína, de acuerdo con el análisis de varianza ($p < 0.05$), se obtuvo que el tratamiento S+R+V si bien no muestra diferencia estadísticamente significativa en comparación con los demás tratamientos y controles, fue el que obtuvo el mayor rendimiento con un 30.6% de proteína que equivale a un 3.1646 mg prot./g muestra, estudios realizados por Melo *et al.* (2013) reportan un 22.7% de proteína total en las hojas de *M. oleífera*, utilizando el método de kjeldahl (AOAC, 1995) y multiplicado por el factor de corrección 6.25, por otro lado Ramírez-Merchant (2015), reporto un contenido de proteína de 28.7 % utilizando el protocolo de extracción de Chen *et al.*, (2012) y para la cuantificación el método colorímetro de Bradford. De modo que en este estudio el tratamiento con mayor rendimiento tiene un contenido de proteína mayor a los estudios reportados, ya que al utilizar vermicomposta y roca fosfórica en el cultivo, hay un efecto positivo ya que se brindan las mejores condiciones y el aporte de nutrientes necesarios (N y P entre otros) tanto para el suelo como para las plantas ya que participan en muchos procesos celulares (Durán y Henríquez, 2010).

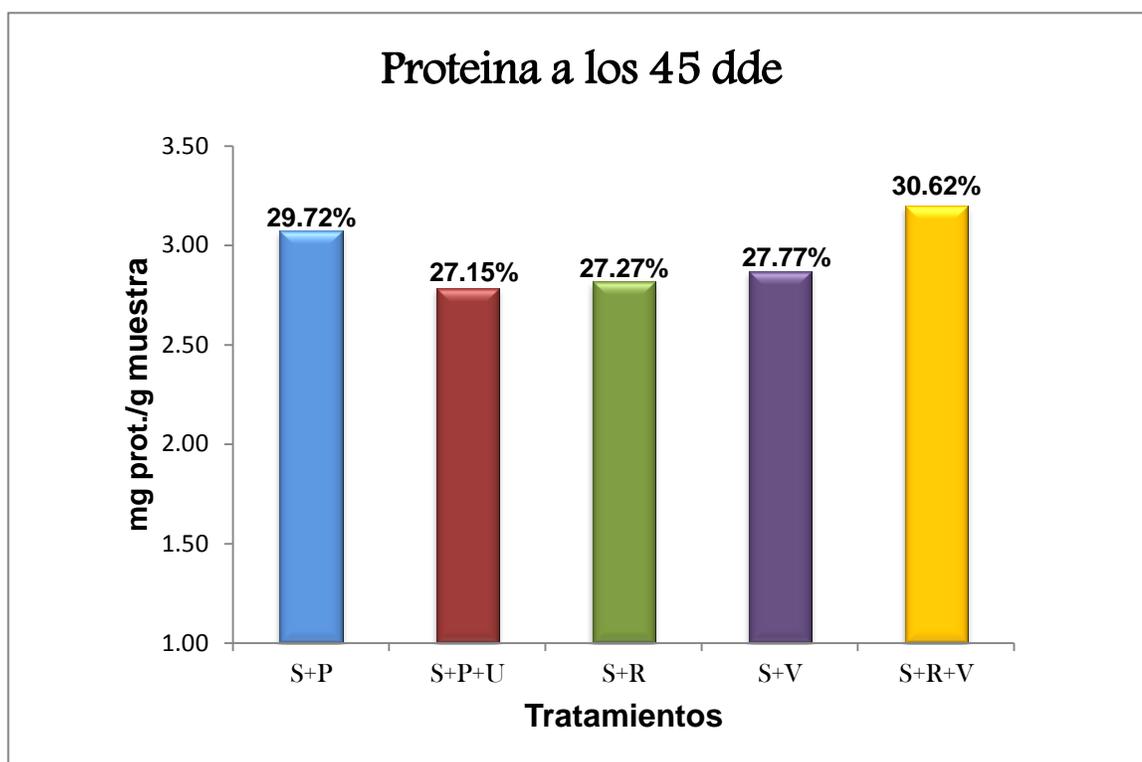


Figura 6.4. Contenido de proteína a los 45 días después de la emergencia (dde) en porcentaje y mg prot / g muestra, para los tratamientos: suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR).

En la figura 6.5, se muestran los resultados obtenidos a los 90 días después de la emergencia (dde) que el contenido de proteínas es menor oscilando entre 3.5 y 4.0 %, encontrado al tratamiento S+R+V con un 4.0 % de proteína equivalente a 0.8875 mg prot./g muestra, el cual presentó una diferencia significativa en cuanto a los demás tratamientos.

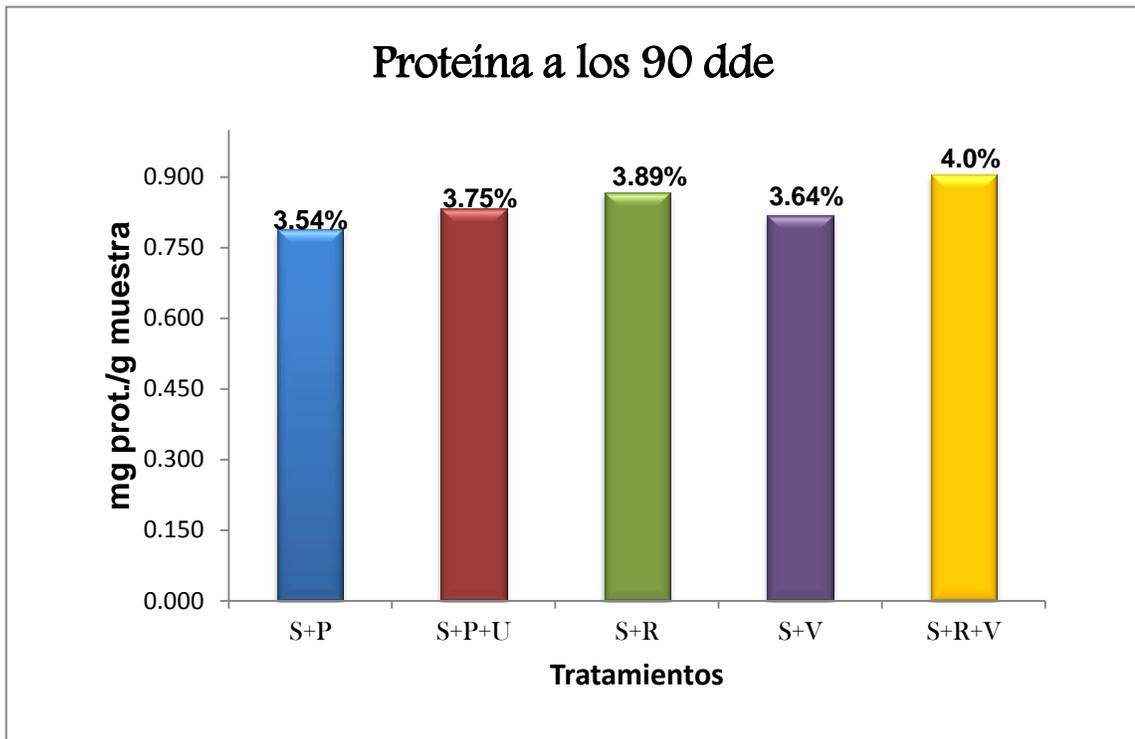


Figura 6.5. Contenido de proteína a los 90 días después de la emergencia (dde) en porcentaje y mg prot / g muestra, para los tratamientos: suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR).

Existen muchos factores que influyen en el contenido de proteínas en las plantas en los que se encuentran la propia edad de la planta en la cual conforme está va creciendo y desarrollándose presenta una mayor demanda de nutrientes, así también existe una pérdida de proteínas ya que muchas veces las plantas se enfrentan a un estrés principalmente por factores abióticos (Alcaraz-Ariza 2012; Montoliu-Vidal, 2010); por lo que los porcentajes bajos que se encontraron a los 90 días después de la emergencia (dde) en las plantas de *M. oleifera* se atribuye a que están iniciando la etapa de floración, aunado a esto se encontraron bajo un estrés provocado por las altas temperaturas así como una alta exposición a la luz solar.

6.3.2. Análisis del patrón electroforético de *M. oleifera*.

el perfil proteómico de cada una de las muestras obtenidas a los 45 días después de la emergencia fue separado de acuerdo a su peso molecular en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%, como se muestra en la figura 6.6; se pudo observar que las proteínas se separaron de manera homogénea, legible y uniforme para cada uno de los tratamientos, obteniendo así patrones de proteínas por el método de SDS-PAGE con un número significativo de bandas que abarcan todo el rango de los pesos moleculares oscilando en el rango de 20 a 150 kDa como se muestra en la figura 6.6, teniendo como banda predominante a los 45 kDa.

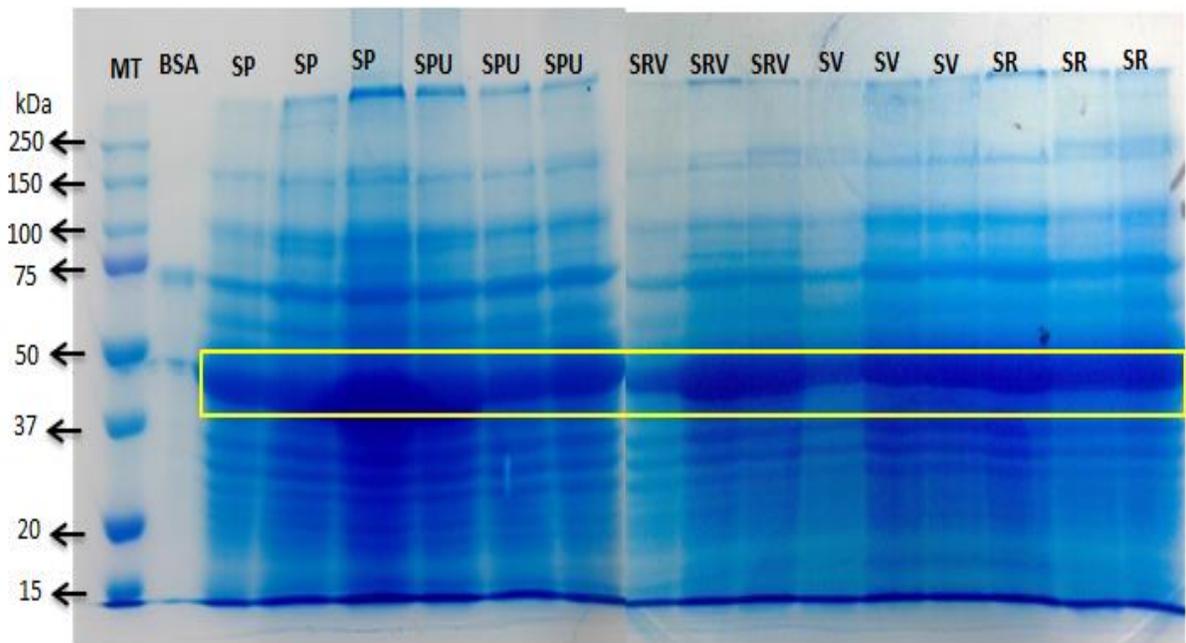


Figura 6.6. Gel de poliacrilamida 10% a los 45 días de muestreo, donde se muestran los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT), albumina de suero bovino (BSA), suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR).

Estudios realizados sobre el perfil proteómico de las hojas de *Moringa oleifera* ha reportado un peso molecular de 37 kDa utilizando el protocolo de extracción modificado de Chen *et al.*, (2012), (Ramírez-Merchant, 2015); a diferencia de los

estudios realizados no se tiene conocimiento de investigaciones en donde se reporte el perfil proteómico de las hojas de *moringa oleifera* cultivadas con enmiendas orgánicas como son vermicomposta y roca fosfórica.

A los 90 días después de la emergencia se observó en la electroforesis SDS-PAGE al 10% la disminución considerable de bandas en los geles a comparación de los 45 días después de la emergencia en la figura 6.6, ya que existen muchos factores que influyen en el contenido de proteínas en las plantas entre los cuales se encuentran edad de la planta, así también el estrés a los que la planta puede estar sometida principalmente por factores abióticos (Montoliu-Vidal, 2010). Esto influye en la disminución de nutrientes que son utilizados en la producción de nuevos brotes, floración y producción de semillas, así mismo para los procesos esenciales de la planta; lo que en se ve reflejado en las plantas de *M. oleifera* durante la electroforesis SDS-PAGE (figura 6.7).

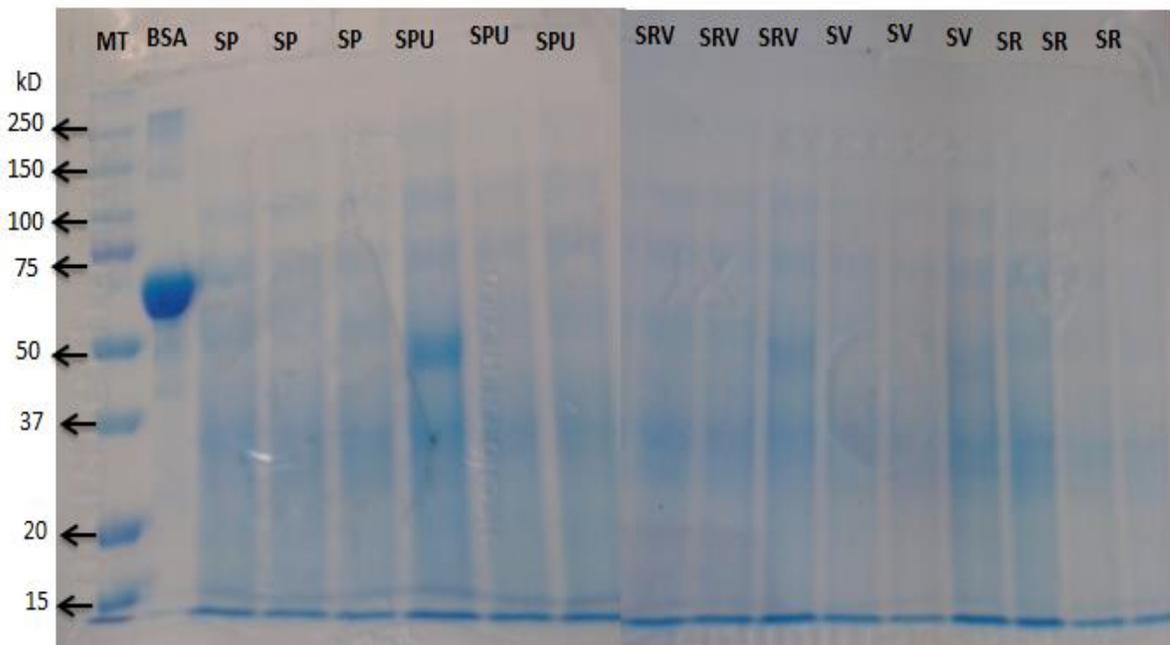


Figura 6.7. Gel de poliacrilamida 10% a los 90 días de muestreo, donde se muestran los pesos moleculares de Marcador de Tamaño (MT), albumina de suero bovino (BSA), suelo + planta (SP), suelo + planta + urea (SPU), suelo + roca fosfórica + vermicomposta (SRV), suelo + vermicomposta (SV), suelo + roca fosfórica (SR).

7. Conclusión

La aplicación de vermicomposta y roca fosfórica al suelo presentó diferencias estadísticamente significativas en las plantas de *M. oleifera*, siendo el tratamiento S+R+V (suelo + roca fosfórica + vermicomposta) el que presentó las mejores condiciones para la obtención de plantas con mayor altura, diámetro y contenido de proteína total a los 45 y 90 días después de la emergencia. El perfil proteómico de las hojas de moringa mediante electroforesis SDS-PAGE reveló una amplia gama de bandas teniendo como banda predominante en un peso molecular de 45 kDa que posiblemente puede corresponder a proteínas de la familia quinasa. El contenido de clorofila presentó como tratamientos con mayor rendimiento a S+P+U (suelo + planta + urea) y S+P (suelo + planta) a los 45 y 90 días respectivamente, principalmente a que la urea es una fuente de nitrógeno de mayor solubilidad; así como que los insumos orgánicos proporcionan características al suelo que pueden llegar a desfavorecer al mismo, para que no se obtuviera un mayor contenido de clorofila en los tratamientos con vermicomposta y roca fosfórica, si bien el contenido de clorofila no fue el esperado, podemos decir que el uso de vermicomposta y roca fosfórica resulta una alternativa para el mejoramiento de suelo, así como en el crecimiento y desarrollo de las plantas de *M. oleifera*.

8. Bibliografía

Achala, V., Savanth, V.V. y Reddy, M.S. 2007. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*, *Soil Biology Biochemical* (39): 695-699.

Alcázar-Ariza, F. J. 2012. Temperatura, luz, atmósfera, viento. Universidad de Murcia España.

Alfaro, N. C. y Martínez, W. 2008. Uso potencial de la Moringa (*Moringa Oleífera*) para la producción de alimentos nutricionales mejorados, CA: Seriprensa, S.A. INCAP y CONCYT Guatemala.

Alfaro, N.C., 2008. Rendimiento y uso potencial de Paraiso Blanco (*Moringa oleífera*), en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para su utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimenticia-nutricional de Guatemala, INCAP Guatemala, CONCYT, SENACYT, FONACYT. No. 26-2006. 135 pp.

Alvares-Contreras, I. E. 2001. Purificación y Caracterización Bioquímica de la Aminopeptidasa (tcAPE) de la semilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Maestría en Ciencias, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.

Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Bierman, P. 2006. Influences of vermicomposts on field strawberries: effects on soil microbial and chemical properties. *Bioresource Technology* 97, 831–840.

Arias-Marín, C. 2014. Estudio de las posibles zonas de introducción de la *Moringa oleífera* Lam en la península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias, Universidad Politécnica de Madrid, España.

Artavia, S.U.L., Saburío, F., Arauz, L.F. y Castro, L. 2010. Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la supresión de *Pythium myriotylum* en plantas de Tiquisque (*Xanthomosa sagittifolium*), Costa Rica.

Atiyeh, R.M., Subler, S., Edwards, C.A., Bachman, G., Metzger, J.D. y Shuster, W. 2000a. Effect of vermicompost and compost on plant growth in horticultural container media and soil, *Bioresource Technology* (44):579-590.

Babou, OJ; Shioh-Long, T; Zeng, Y. 2007. Relationship between compost pH buffer capacity and P content on P availability in a virgin Ultisol. *Soil Science* 172:56-68.

Basantes, M.E., 2010. Producción y fisiología de cultivos con énfasis en la fertilidad del suelo. Imprenta unión, 1ª edición pp. 433, Quito, Ecuador.

Becerra-Sanabria, L.A., Navia-de Mosquera, S.L. y Ñustez-López, C.E. 2007. Efecto de niveles de fosforo y potasio sobre el rendimiento del cultivar “*Criolla Guaneña*” de departamento de Nariño. *Revista latinoamericana de la papa*. 14(1): 51-60.

Bermejo, M.E. 2010. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* para la obtención de curcina. Centro de desarrollo de productos bióticos. Tesis de licenciatura. Departamento de biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos.

Bernal, J. y Espinoza, J. 2003. Manual de nutrición y fertilización de pastos. Instituto de la potasa y el fosforo. INPOFOS, Quito, Ecuador.

Bertone, P. y Snyder, M., 2005. Prospects and challenges in proteomics. *Plant physiology* 138, pp. 560-562.

Biswas, W. K. 2008. Life cycle assessment of Biodiesel production of *Moringa oleífera* oilseed, United States.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding analysis. *Biochemical* 72: 248-254.

Calderón-Vázquez, C., Alatorre-Cobos, F., Simpson-Villamson, J. y Herrera-Estrella, L. 2009. Maize under phosphate limitation. In Bennetzen and S.C. Hake (eds.) *Handbook of Maize. Biology* pp. 381-404.

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Facanha, A.L. y Facanha, A.R. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots, *Plant Physiology*, 130 (4): 1951-1957.

Castillo, A.E., Quarín, S.H. y Iglesias, M. 2000. Caracterización química y física de compost de lombrices elaborados a partir de residuos orgánicos puros y combinados, *Agricultura Técnica*, Chile 60: 74-79.

Castro-Márquez, A. M. 2013. El árbol de Moringa (*Moringa Oleífera Lam.*), una alternativa renovable para el desarrollo de los sectores económicos y ambientales de Colombia, Universidad Militar, Bogotá, Colombia.

Chen, K., Wu, H., Chen, J.F., Cheng, X.F., Jing, X. & Wang, X.Y. 2012. Somatic embryogenesis and mass spectrometric identification of proteins related to somatic embryogenesis in *Eruca sativa*. *Plant Biotechnology Reports*. 6: 113-122.

Cornejo-Sánchez, V. M. y Paredes, A. S. E. 2011. Evaluación de bloques multinutricionales con tres niveles de follaje de Terberinto (*Moringa oleífera*) como fuente proteica en el desempeño reproductivo de conejas de las razas neozelandés blanco, el Salvador.

De la Cuesta, M.F. 2010. Estudio del perfil proteico de tejido y secretoma de la arteria coronaria humana en la enfermedad Aterosclerótica, Universidad Complutense de Madrid, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Madrid, España.

Diáñez, F. y Santos, M., Tello J.C. 2007. Suppressive effect of grape marc. Compost on phytopathogenic omycetes, *Archevez of phytopatology and plant protection* 40: 1-18.

Domínguez, J., Edwards, C.A. y Webster, M. 2000. Vermicomposting of sewage sludge, Effect of bulking materials on the growth and reproduction of earthworm *eisnid andrei*, *Pedobiología*. 44: 24-32.

Duarte, F.J. y Flores, L. B. 2004. Producción de Biomasa de *Moringa oleífera* sometida a diferentes densidades de siembra y frecuencia de corte en el trópico seco de Managua, Nicaragua.

Duran, U.L. y Henríquez, H.C. 2010. El Vermicompost. Su efecto en algunas propiedades del suelo y la respuesta en la planta. *Agronomía Mesoamericana* 21 (1): 85-93.

Faurobert, M., Chaï, B.J. y pelpoir, E. 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods in Molecular Biology*, 335, Plant Proteomics, methods and protocols.

Fernández, C.C. 2013. Nuevos métodos proteómicos basados en ultrasonido y espectrometría de masas para la búsqueda de biomarcadores en enfermedades reumáticas. Instituto de investigación biomédica de Caruña, Caruña.

Foid, N., Makkar, H. y Becker, K. 2001. The potential of *Moringa oleífera* for agricultural and industrial uses, Nicaragua.

García, F.J., Rosello, J. y Santamarina, M.P. 2006, Introducción al funcionamiento de las plantas, editorial de la UPV, Valencia, España p.182.

García, L.M., Herrada, J.A., Torres, P.J., Guevara, G.R.G., Cruz, H.A., Campos, G.J, Gutiérrez, R.X., Vázquez, M.M.J., Hernández, S.M., Feregrino, P.A. A. 2012. Participation of modern analytical sciences (genomics, proteomics, metabolomics) in the plants studies.

García-Fayos, B. 2007. Metodología de Extracción In Situ de Coagulante Naturales para la Clarificación de Agua Superficial. Aplicación en Países en Vías de Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

García-Torres, A.G., Martínez-Cubias, R.K. y Rodríguez-Díaz, I. A. 2013. Evaluación de los usos potenciales del Terberinto (*Moringa Oleífera*) como generador de materia prima para la industria química, San Salvador.

Girotti, M.R., 2010. Análisis proteómico de los mecanismos moleculares de progresión tumoral relacionados con la proteína Sparc. Tesis doctoral. Universidad de Buenos aires, Argentina.

Gutiérrez-Miceli, F. A., Santiago-Borraz, J., Montes-Molina, J.A., Nafate, C.C., Abdud-Archila, M., Oliva-Llaven, M.A., Rincón-Rosales, R. y Deendoven, L. 2007. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Bioresource Technology*. 98: 2781-2786.

Hashemimajd, K., Kalbasi, M., Golchin, A. y Shariatmadari, H. 2004. Comparison of vermicompost and composts as potting media for growth of tomatoes. *Journal of Plant Nutrition*. 6: 1107-1123.

Hernández-Gómez, S.E. y Moza-Hernández, J.E. 2013. Elaboración de barras nutritivas de Mamey enriquecidas con Terberinto (*Moringa oleífera*) para niños y jóvenes en edad escolar, Tesis de licenciatura, Universidad Dr. José Matías Delgado. Antiguo Cuscatlan.

Jorrín-Novo, J., Maldonado, A., Echevarría-Zomeño, S., Castillejo, M., Curto, M., Valero, J., Sghaier, B., Donoso.Redondo, I. & Valledor, L. 2009. Plant proteomics update (2007–2008), Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of proteomics*. 72, 285– 314.

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms insustainable agriculture – A review. *Agronomy Sustainable Development* 27: 29–43.

Lehninger, A. L. 2009. Principios de bioquímica, 5ta. Edición. Editorial Omega.

López, M., Acebedo, I.C., Cardenas, M., Contreras, J.L y Torres D. 2014. Phosphoric fertilization and P solubilizing bacterial in the cultivation of bean (*Phaseolus vulgaris L.*), *Faculty Agronomy*. (Luz), supl. 1:44-53.

Magaña-Benítez, W. 2012. Aprovechamiento poscosecha de Moringa (*Moringa Oleífera*), Revista Iberoamericana de Tecnología poscosecha, México, 13 (2): 171-174.

Mann, M. y Jensen, O.N. 2003. Proteomic analysis of post-traductional, modifications. *Nature Biotechnology* 21, pp. 255-261.

Marroquín, C.W.A. 2006. Efecto del asocio Lupino (*Lupinus montanus HBK*), Maíz (*Zea mays L.*) en la nutrición fosfatada de un andosol de Guatemala. Tesis Licenciatura, Universidad San Carlos, Guatemala.

Martínez, F.E., Sarmiento, J., Fischer, G. y Jiménez, F. 2009. Síntomas de deficiencia de macronutrientes y boro en plantas de Uchuva (*Physalis peruviana L.*). *Agronomy. Colombiana* 27 (2).

McGinnis, M., Warren, S. y Bilderback, T. 2004. Vermicompos potential as pine bark amendement for the nursery, In: Nursery short course, North Carolina States university pp. 8-10.

Melo, V. , Vargas, N., Quirino, T. y Calvo C.M. 2013. *Moringa oleifera L.* An underutilized tree with macronutrients for human health. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Méxco D.F.

Montoliu-Vidal, A. 2010. Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. Tesis doctoral. Castellón de la plana.

Morales-Esquer, I.A.G. 2005. Aplicación de diferentes dosis de urea y sulfato de magnesio en planta joven de Sandía (*Citrillus lannatus*), bajo condiciones de invernadero, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora.

Morales-Sánchez, D. y Gallo-Ramírez, L. 2006. Plataformas de proteómica, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

Morillo, A., Sequera, O. y Ramírez, R. 2007. Roca fosfórica acidulada con fuente de fosforo en un suelo acido con o sin encalado, *Bioagro* 16(4): 161-168, Venezuela.

Muhl, Q.E., Dutolt, E. y Robbertse, P.J. 2011. Adaptability of *Moringa Oleífera Lam* (horse a dish) tree seedilings to three temperature regimes, *American Journal of plant science*. 776-778.

Muñoz, R. y Rodríguez, S. 2005. Empleo de un producto coagulante natural para clarificar agua, *Revista CENIC, Cuba*.

Navie, S. y Csurhes, S. 2010. Horse a dish tree, *Moringa oleífera* biosecurity queensland, Department of employment economic development and inovation, Brisbane, Alemania.

Nikolic´,Z., Đorpevic´, V., Torbica, A. y Mikic´, A. 2012. Legumes seed storage proteins characterization by SDS-PAGE and Lab-on-a-Chip electrophoresis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28: 75-80.

Nuñez, L.M., 2008. Análisis proteómico de la enfermedad Marchitez manchada en tomate (*Lycopersicon esculenum Mill.*), departamento agropecuario. Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional, Guasave, Sinaloa.

Odongo, E.N., Hyoungho, K., Chui, Hee-chul, Van-Straaten, P., Mc-Bride, B.W., y Romney, L.D. 2006. Improving rock phosphate availability through feeding mixing and processing whit composting manure, *Bioresour Thecnology* (15): 2911-8.

Oliva, M.A., Rincón, R., Zenteno, E., Pinto, A., Dendooven, L. y Gutiérrez, M. 2007. Vermicompost rol, against sodium chloride stress in the growth and photosynthesis in tamarind plante (*Tamarindus indica L.*) México. *Gayana botany* 65(1): 10-17.

Olson, M. E. 2009. Moringacea Martinov, Drumstick tree family, *Flora North América*, Vol.7 167-169.

Olson, M. E. y Fahey, J.W. 2011. *Moringa oleífera* un árbol multipropósito para las zonas tropicales secas, Revista Mexicana de Biodiversidad, 82: 1071-1082.

Pereira, M.G. y Zezzi-Arruda, M.A. 2004. Preconcentration of Cd (II) and Pb(II) using humic substance and flow systems coupled to flame atomic absorption spectrometry microchim. 215-222.

Pérez, C., 2012. *Moringa oleífera Lam.*, especie forestal de usos múltiples, Madrid.

Pérez, M.J. 2006. Efficiency of some leguminous crops to use from Phosphate rock. Faculty Agronomy. 24:113-132.

Pérez-Inocencio, J. 2012. Evaluación de la adición de vermicomposta y hongos micorrizicos en el crecimiento de plántulas de limón, Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México.

Radovich, T. 2009. Farm and forestry production and marketing profile for Moringa (*Moringa oleífera*), pp. 1-135.

Ramaekers, L., Remans, R., M.Rao, I., Blai, W.M. y Vanderleyden, J. 2010. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. Field crops research 117: 169-176.

Ramírez-Merchant, M.L. 2015. Establecimiento de protocolos para la extracción y separación de proteínas por SDS-PAGE de diferentes tejidos vegetales. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Raven, P., Ray, F., Eichhorn, S. 2007. Biologie, vegetale 2 ième, edition, ISBN 978-2-8041-5020-4.

Reyes-Sánchez, N. 2004. Marango cultivo y utilización en la alimentación animal, Universidad nacional Agraria, Suecia.

Romero, E., Salido, A., Cifuentes, C., Fernández-Bayo, J.D. y Nogales, R. 2006. Effect of Vermicomposting process on pesticide sorption capability using agro-industrial wastes, Int. J. environs analisys chemical, (86): 289-297.

Sachinelli-Pezzarossi, Karol B. 2004. Contenido de proteína y aminoácidos, generación de descriptores sensoriales de tallos, hojas y flores de *Moringa oleífera* (Moringaceae) cultivada en Guatemala, Guatemala.

Sánchez, Ch.A. 2007. Phosphorus in Baker, A. V. And Pilbean, D. J. (editors). Manual of plant nutrition 51-90.

Sánchez-Iza, M.V. 2011. Evaluación de tres abonos orgánicos en diferentes dosis de aplicación en el rendimiento de cultivo de rosas (*Rosa* sp), Ecuador.

Sánchez-Martín, J., 2004. Aplicación de floculantes naturales a la potabilización de aguas, España.

Schwaner, A.S.A. 2006. Solubilización de roca fosfórica de Carolina del norte por cepas de *Aspergillus niger van tieghem* y su evaluación en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en invernadero. Tesis de Licenciatura, Universidad austral de Chile, Valdivia, Chile.

Sharma, N., Park, S.W. Vepachedu, R., Barbieri, L., Ciani, M., Stirpe, F., Savary, B.J., y Vivanco J.M. 2004. Isolation and characterization of an Rip (Robozome inactivating protein)- like protein from tobacco with dual enzymatic activity. Plant Physiology 134: 171- 181.

Sims, J.T. y Vadas P.A. 2005. Phosphorus in Soils. Overview: In Hatfield, J.L., Scow, K.M., Powelson, D.S, Singer, M.J., Rosenzweig, C. and Sparks, D.L., (editors). *Encyclopedia of soils in the environment*, Vol. 3, Academic Press, pp. 202-210.

Sindoni, V.M., Hidalgo, L.P., Mariano, L. y Salcedo, F. 2009. Efecto del vermicompost como enmienda orgánica para el cultivo inicial de plantas de lechosa (*Carica papaya* L.) C.V. "Maradol Amarilla", Revista UDO agrícola 9 (2): 322-326

Singh, R., Sharma R.R., Kumar, S., Gupta, R.K. y Patil, R.T. 2008. Vermicomposting substitution influences growth physiological disorder, fruit yield

and quality of strawberry (*Fragaria X. ananassa Duch*). *Bioresoucece tecnology* 99: 8507-8511.

Soto, G. y Muñoz, C. 2002. Consideraciones teóricas y prácticas sobre el compost y su empleo en la agricultura orgánica, Costa Rica, *Agroecología* 65: 123-125.

Subhash, K.M., Rajiv, P., Rajeshwari, S. y Venckatesh, R. 2014. Spectroscopic analysis of vermicompost for determination of nutritional quality, *Journal Spectrochimica*, Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 135: 252-255.

Trees for life: Moringa book. 2011. Disponible en WWW. [Treesforlife.org/sites/default/files/documents/Moringa_book_sp\(screen\).pdf](http://Treesforlife.org/sites/default/files/documents/Moringa_book_sp(screen).pdf)., accesado el 11 de agosto 2014.

Vargas-Ramírez, S.J. 2012. Microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelo. Tesis de maestría, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucarmanga, Colombia.

Vischetti, C., Monaci, E., Cardinali, A., Casucci, C., Perucci, P. 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in biobed mixture. *Chempsphere* 72(11): 1739-1743.

Wakelin, S.A., Warren, R.A., Harvey, P.R., Ryder, M.H. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology Fertil Soils* 40: 36-43.

Wei, Z., Wie, H., Lin, Q., Cheng, X., Tong, M., Zhu, L., Chen, R. y He, B. 2009. Understanding rice plants resistance to the browm planthopper (*Nilaparvatalugens*). *A proteomic approach proteomic*, 9: 2798-2808.

9.0 Anexos

Anexo I

Preparación del gel de separación. Se realizó mezclando las soluciones a las concentraciones adecuadas de acuerdo a la cantidad que se muestra en el cuadro 9.1.

Cuadro 9.1. Composición del gel de separación

Soluciones	Cantidad
Acrilamida- Bis 30%	1.65 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.25 mL
SDS 10%	50 μ L
Persulfato de amonio 1%	250 μ L
dH ₂ O	2.31 mL
TEMED	5 μ L

Anexo II

El gel de apilamiento se preparó con la mezcla de las soluciones a las cantidades adecuadas que se muestran en el cuadro 9.2.

Cuadro 9.2. Preparación del gel de apilamiento

Soluciones	Cantidad
Acrilamida- Bis 30%	1.65 mL
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.25 mL
SDS 10%	50 μ L
Persulfato de amonio 1%	250 μ L
dH ₂ O	2.31 mL
TEMED	5 μ L

Anexo III

La preparación de la solución para teñir de azul de Coomassie fue de acuerdo a las cantidades del cuadro 9.3.

Cuadro 9.3. Composición de la solución de azul de Coomassie

Reactivos	Cantidad
Ácido acético 10%	20mL
Metanol 40%	80 mL
Azul de Coomassie 0.1%	0.1 g
dH ₂ O	100 mL

Anexo IV

La solución para desteñir se preparó con los reactivos y las cantidades que se muestran en el cuadro 9.4.

Cuadro 9.4. Preparación de la solución de lavado o para desteñir

Reactivo	Cantidad
Ácido acético 10%	50 mL
Metanol 40%	200 mL
dH ₂ O	250 mL