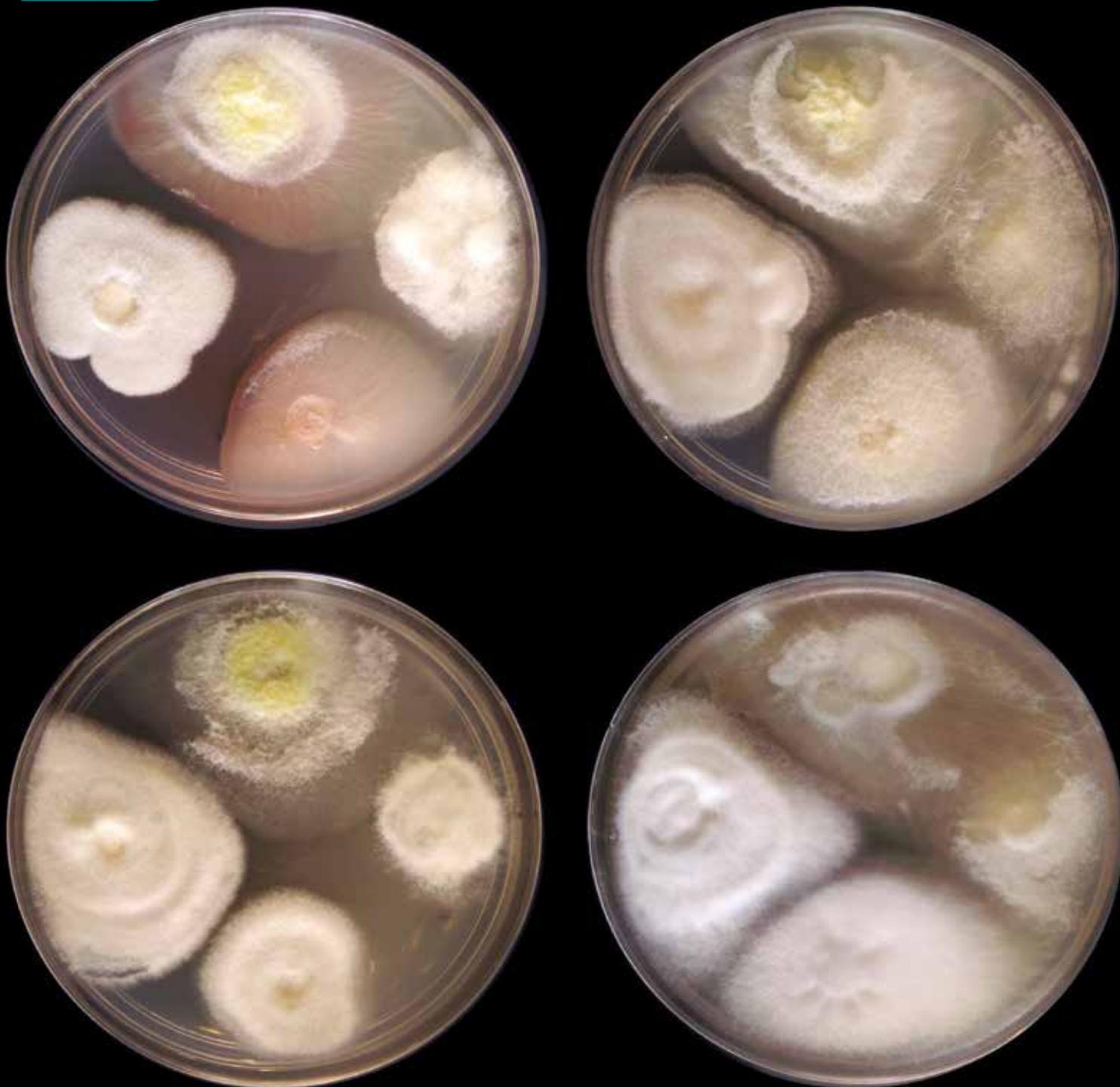


Biotecnología y Sustentabilidad

Revista de la Red Nacional de Cuerpos Académicos
«Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable»

Año 1
Número 1
Agosto 2016





Biotecnología y Sustentabilidad

Revista de la Red Nacional de Cuerpos Académicos
«Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable»

Editor responsable
Saúl Fraire Velázquez

Editor técnico
Alejandro Alvarado Gutiérrez

Consejo editorial
Julio Vega Arreguín
ENES-UNAM Campus León, Guanajuato

John Larsen
CIECO-UNAM Campus Morelia

Blondy Beatriz Canto Canché
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Salvador Guzmán González
Universidad de Colima

Miguel Alvarado Rodríguez
Universidad Autónoma de Zacatecas

Víctor Emmanuel Balderas Hernández
Instituto Potosino de Investigación Científica
y Tecnológica (IPICYT)

Gustavo Javier Acevedo Hernández
Universidad de Guadalajara

Gabriel Rincón Enríquez
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología
y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Porfirio Gutiérrez Martínez
Instituto Tecnológico de Tepic

Edición y diseño
Proyecto Editorial de la Coordinación de
Investigación y Posgrado, Universidad
Autónoma de Zacatecas



Contenido

- Efecto bactericida de extractos de hojas de aguacate criollo (*Persea americana* var. *Drymifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina **6**
Ernesto A. López-Correa | Irving Piñón-Trinidad | Miguel A. García-Moreno | Adriana Gutiérrez-Díez | Víctor E. Aguirre-Arzola
Facultad de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
- Actividad antibacteriana *in vitro* de una colección de actinomicetos contra *Pectobacterium carotovorum* cepa 71 **15**
Gabriel Rincón-Enríquez | Zahaed Evangelista-Martínez | Joaquín Qui-Zapata | Evangelina Quiñones-Aguilar
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño
- Control *in vitro* de *Dickeya dadantii* cepa 3937 con actinomicetos del suelo **19**
Evangelina Quiñones-Aguilar | Zahaed Evangelista-Martínez | Gabriel Rincón-Enríquez | Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño
- Evaluación y preselección de actinomicetos para el biocontrol de *Rhizoctonia solani*, fitopatógeno asociado a la marchitez del chile **23**
Jesús R. Trinidad-Cruz | Gabriel Rincón-Enríquez | Sinahi Pérez-Flores | Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño
- Expresión de los genes efectores durante la fase biotrófica en la interacción plátano-*Mycosphaerella fijiensis* **27**
Inés Arana-Guevara | Roberto Vázquez-Euán | Miguel Alonso Tzéc-Sima | Blondy Beatriz Canto-Canche | Unidades de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y de Biotecnología | CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN
Salvador Guzmán-González | Gilberto Manzo-Sánchez
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA
- Transferencia horizontal de una caleosina entre *Phaseolus vulgaris* y *Colletotrichum lindemuthianum* **31**
Alejandra Alcalá-Ramírez | Erick Saúl Leandro-Pérez | Lenin Sánchez-Calderón | Saúl Fraire-Velázquez | César Díaz-Pérez
Laboratorio de Biología Integrativa de Plantas y Microorganismos | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
- Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal andinas sobre el crecimiento de plántulas de lechuga bajo condiciones industriales **36**
Alexandra Stoll | Centro de Estudios de Zonas Áridas Ceaza
Víctor Olalde | Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN | CINVESTAV
Jaime Bravo | Universidad Politécnica de Pénjamo

Biotecnología y Sustentabilidad, año 1, número 4, octubre 2016, es una publicación anual editada por la Universidad Autónoma de Zacatecas «Francisco García Salinas», a través del Cuerpo Académico «Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable», Jardín Juárez 147, Zona Centro, Zacatecas, Zacatecas, 98000, Teléfono (01 492) 922 20 04, <http://cienciasbiologicas.uaz.edu.mx/web/bas> Editor responsable Saúl Fraire Velázquez. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo número 04-2045-060212251400-203 ISSN en trámite, otorgados ambos por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Alejandro Alvarado Gutiérrez. Fecha de última modificación 20 de octubre de 2016.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad Autónoma de Zacatecas «Francisco García Salinas».

- Diversidad, actividad fúngica y detección de genes biosintéticos en estreptomicetos aislados de suelo agrícola
Hugo Galindo-Flores | Departamento de Ingeniería y Tecnología | UNIVERSIDAD DE OCCIDENTE **41**
Melina López-Meyer | Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza | Departamento de Biotecnología Agrícola | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Luis Ángel Maldonado | Instituto de Ciencias del Mar y Limnología | UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Erika Teresa Quintana | Escuela Nacional de Ciencias Biológicas | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- Identificación de enzimas β -fructosidasas en *Lactobacillus casei*
Norma Angélica Gaytán-Saldaña | Edgar León Esparza-Ibarra | Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS **45**
Juan Alberto Osuna-Castro | Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA
- Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* de diferentes áreas costeras
Ninfa M. Rosas-García | Maribel Mireles-Martínez | Gildardo Rivera-Sánchez | J. Manuel Villegas-Mendoza | Francisco A. Paredes-Sánchez | Verónica Herrera-Mayorga | Centro de Biotecnología Genómica | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL **50**
- Arsénico y plomo en flora semiárida que crece dentro de un jale reforestado en Zacatecas
Miguel Ángel Salas-Luévano | Unidad Académica de Agronomía **54**
María Luisa González-Rivera | Unidad Académica de Ciencias Químicas
Consuelo Letichepía-de León | Víctor Martín Hernández-Dávila | Héctor René Vega-Carrillo | Unidad Académica de Estudios Nucleares | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
- Participación del óxido nítrico en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*
Javier Raya-González | Amira Garnica-Vergara | León F. Ruiz-Herrera | José López-Bucio | Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO **59**
Alfonso Méndez-Bravo | Red de Estudios Moleculares Avanzados | INSTITUTO DE ECOLOGÍA
- Efecto del ensodulfán en el crecimiento vegetativo y actividad enzimática ligninolítica de hongos de la pudrición blanca
Anluis Rodríguez-Carreón | Refugio Rodríguez-Vázquez | Centro de Investigación y de Estudios Avanzados | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL **63**
Wilberth Chan-Cupul | INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.
Enrique Alarcón-Gutiérrez | Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada | UNIVERSIDAD VERACRUZANA
- Actividad enzimática de *Trametes maxima* en cocultivo con micromicetos de suelo en agua sintética-agar (asa) con atrazina como fuente de «C» y «N»
María Fernanda Romo-García | Refugio Rodríguez-Vázquez | María del Carmen Montes-Horcasitas | CINVESTAV-IPN **68**
Wilberth Chan-Cupul | INECOL A.C.
Luis G. Torres-Bustillos | UPIBI-IPN
- Curtobacterium sp.* MR2 cepa que presenta dos mecanismos de resistencia al plomo y dependientes de la densidad celular **73**
Carlos Juan Alvarado-López | Luis Gerardo Treviño-Quintanilla | UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO DE MORELOS
Laura Stephania Colín-Rosette | Junta Local de Sanidad Vegetal de Caña de Azúcar y Granos Básicos
- Remoción de Cromo (VI) en solución por la cáscara de semilla de calabaza (*Cucurbita máxima* Duch) **78**
Karen Ruiz-Trujillo | Juan F. Cárdenas-González | María de Guadalupe Moctezuma-Zárate | Ismael Acosta-Rodríguez | Facultad de Ciencias Químicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Víctor M. Martínez-Juárez | Instituto de Ciencias Agropecuarias | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
- Biorremediación por bioestimulación y bioaumentación con microorganismos nativos de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos **82**
Alejandro Islas-García | Maribel Peralta-Rodríguez | Libia Vega-Loyo | Ricardo López-Aguilar | Refugio Rodríguez-Vázquez | Centro de Investigación y de Estudios Avanzados | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- Evaluación de la fidelidad genética de plantas micropropagadas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) mediante marcadores RAPD **86**
Luis Alfonso Muñoz-Miranda | Araceli Rodríguez-Sahagún | Gustavo Javier Acevedo-Hernández | Osvaldo Adrián Castellanos-Hernández | Centro Universitario de la Ciénega | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
- Propagación *in vitro* de *Cuillauzina pendula* la llave & lex. (Orchidaceae) como una alternativa para su conservación **91**
Verónica Adriana Pérez-Decelis | Irene Ávila-Díaz | Facultad de Biología | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Rafael Salgado-Garciglia | Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
- Regeneración de *Sechium edule* mediante organogénesis y uso de marcadores ramp para evaluar la fidelidad genética **96**
Victor O. Cruz-Martínez | Gustavo J. Acevedo-Hernández | Osvaldo A. Castellanos-Hernández | Araceli Rodríguez-Sahagún | Centro Universitario de la Ciénega | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
- Inducción de poliploidía en *Cordia congestiflora* Hemsl., especie vegetal con potencial para remediar suelos contaminados con metales pesados **100**
Yesenia López-López | Miguel Alvarado-Rodríguez | Unidad Académica de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
Lenin Sánchez-Calderón | Saúl Fraire-Velázquez | Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Contenido

- Fitobactobiorremediación como alternativa de mejoramiento de suelos contaminados con petróleo y su posterior uso como suelos agrícolas
Viviana Matilde Mesa-Cornejo | Centro Universitario de los Lagos
| UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA **106**
Milton Fajardo | Olga Lucía Sanmiguel | UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Graciela Chalela-Álvarez | Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
- Bioacumulación de plomo en chile de árbol (*Capsicum frutescens* L.) cultivado en Guadalupe, Zacatecas
Consuelo Letechipía-de León | Héctor René Vega-Carrillo
| Víctor Martín Hernández-Dávila | Unidad Académica de Estudios Nucleares | Universidad Autónoma de Zacatecas **110**
Irma Cruz Gavilán-García | Facultad de Química
| UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Miguel Ángel Salas-Lúevano | Unidad Académica de Agronomía
| UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS
- Control de *Dendroctonus mexicanus* en zonas forestales de Durango empleando bioinsecticidas
Gabriel Nicolás Aviña-Martínez, Jesús García-Pereyra
| Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana **115**
- Transformación genética de dos especies de cítricos asistida por *Agrobacterium tumefaciens* usando el gen reportero *gusA* y el péptido antimicrobiano *Ata*
Marco Tulio Buenrostro-Nava | Christian Omar Gómez-Díaz
| Aremi Mendoza-Espinoza | Salvador Guzmán-González
| Gilberto Manzo-Sánchez | Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA **120**
- Calidad fisiológica en líneas endogámicas de maíz para el Bajío
María Isabel Presa-Figueroa | Enrique Andrio-Enríquez
| J. Guadalupe Rivera-Reyes | Mariano Mendoza-Elos
| Francisco Cervantes-Ortiz | Instituto Tecnológico de Roque **125**
- Evaluación del efecto del daño mecánico sobre la eficacia de transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens*
Salvador Guzmán-González | Aided Evelina Montes-Peniche
Marco Tulio Buenrostro-Nava | Pedro Valadez-Ramírez
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA **129**
Julio Vega-Arreguín | Escuela Nacional de Estudios Superiores
| UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Unidad León, Guanajuato
- Uso de bioinsecticidas para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el cultivo de maíz
Rosa Bertha Rubio-Graciano | Jesús García-Pereyra | Gabriel Aviña-Martínez | INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL VALLE DEL GUADIANA **134**
- Fermentación líquida como herramienta biotecnológica para la obtención de quitinasas con *Beauveria bassiana*
Sandra E. Jiménez-Alejandro | Óscar Núñez-Gaona | Laura P. Ramírez-Coutiño | UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN campus Tuxtepec **139**
- Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán
Consuelo López-Vielma | Alejandro Solís-Sánchez | Evangelina Quiñones-Aguilar | Joaquín Qui-Zapata | Gabriel Rincón-Enríquez
| Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco **143**
- Validación del extracto proteico de semilla de higuera (*Ricinus communis* L.) sobre el frijol variedad flor de mayo
Daniela Mar-Pérez, J. Gabriel Ramírez-Pimentel, C. Leobardo Aguirre-Mancilla | Instituto Tecnológico de Roque **147**
J. Antonio Rangel-Lucio | Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria
- Expresión del gen *Mf-Eft* en cepas de *Mycosphaerella fijiensis*
Yamily Y. Burgos-Canul | Roberto Vázquez-Euán | Miguel Tzec-Simá
| Cecilia M. Rodríguez-García | Leticia Peraza-Echeverría
| Nuvia Kantún-Moreno | Andrew-James | Rosa Grijalva-Arango
| Blondy B. Canto-Canché | Unidad de Biotecnología
| CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN **151**
Ignacio Islas-Flores | Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas | CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN
Luciano Martínez-Bolaños | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Editorial

La socialización del conocimiento es una tarea irrenunciable e inagotable, puesto que es un proceso a través del cual los individuos y colectivos se concientizan sobre la necesidad de generar espacios, medios y encuentros de diálogo en los diversos temas de la ciencia. El objetivo es democratizar la apropiación social de avance científico y tecnológico, para transformar la realidad, justo ahí donde el conocimiento científico se convierte en agente potencializador de desarrollo social. En este contexto se ubica la presente revista cuyo propósito es la difusión y apropiación del conocimiento bajo un ejercicio interpretativo y desarrollo de prácticas reflexivas.

Con relación a la biotecnología y sustentabilidad, es importante considerar que el crecimiento de la población mundial implica cada vez mayores necesidades de productos agroalimentarios e industriales, aunado al deterioro del medio ambiente incluido el impacto en la biodiversidad. La presión constante para intensificar la productividad agropecuaria con criterios de sustentabilidad, conlleva incremento de rendimientos sin rebasar la frontera de la superficie agrícola, sin elevar los costos de producción ni impactar de modo negativo al medio ambiente. De igual modo, influye la coerción social hacia el abastecimiento de productos alimentarios libres de riesgos de contaminantes que comúnmente se manejan en la producción agrícola convencional y en los procesos de industrialización. Ante estas necesidades sociales y la realidad de los efectos adversos en el medio ambiente por las actividades agrícolas e industriales exacerbadas además por el cambio climático, se hace impostergable la aplicación de tecnologías con un enfoque integrativo de los avances en ciencia y tecnología, lo que impone nuevos retos en materia de innovaciones biotecnológicas. La biotecnología es un área multidisciplinaria que llegó para quedarse y se refiere a «toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos». En la biotecnología moderna se contempla el manejo de la información e ingeniería genética para hacer más eficientes un sinnúmero de tareas biológicas en los organismos, para fines de producción industrial o de biorremediación en sustratos o áreas contaminadas.

Esta naciente revista *Biotecnología y Sustentabilidad* es un esfuerzo que surge en el seno de una Red de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación cuyo nombre es Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable, la avalan ocho instituciones educativas y de investigación de nivel superior en el país: Universidad de Colima, Escuela Nacional de Estudios Superiores de la UNAM campus León Guanajuato, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Instituto Tecnológico de Tepic, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM campus Morelia, Universidad Autónoma de Zacatecas «Francisco García Salinas» y Universidad de Guadalajara. Los miembros del grupo editorial deseamos que la publicación de esta revista se prolongue temporalmente y que además tenga un impacto regional y nacional, en la medida que se mantengan e incrementen las aportaciones de los investigadores que trabajan en materia de biotecnología y sustentabilidad.

Saúl Fraire Velázquez



Efecto bactericida de extractos de hojas de aguacate criollo (*Persea americana* var. *Drymifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Ernesto A. López-Correa | Irving Piñón-Trinidad | Miguel A. García-Moreno
| Adriana Gutiérrez-Diez | Víctor E. Aguirre-Arzola

Facultad de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

correo-e: veaguirre@gmail.com

Resumen

México es el centro de origen de muchas especies vegetales entre las que se encuentra el aguacate. Sin embargo, numerosos cultivares localizados en el centro de origen son únicos en el país y se subutilizan debido a numerosos factores, lo cual pone en riesgo la continuidad de la especie. Por tal motivo, para dar un uso alternativo a ese recurso vegetal, se evaluaron los extractos de hojas de 18 cultivares de aguacate de la raza mexicana *Persea americana* var. *drymifolia* contra tres cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, para medir su efecto como bactericida y sobre la inhibición del *Quorum sensing*. Los 18 cultivares tuvieron efecto bactericida, de los cuales el cultivar «María Elena» presentó mayor halo de inhibición y provocó una disminución en los niveles de expresión del operón Agr en la fase estacionaria. En este trabajo se evalúa por primera vez uno de los efectos de hojas de aguacate mexicano contra una cepa multiresistente a fármacos como *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, bactericida, aguacate mexicano.

Introducción

México es el centro de origen de muchas especies vegetales como maíz, cacao, papaya, jitomate, vainilla, entre otros. Dentro de esas especies se encuentra el aguacate (*Persea americana*). En el país se cultivan variedades criollas en huertos comerciales y en traspatios, o bien se encuentran de forma silvestre. El estado de Nuevo León forma parte del centro de origen de la raza mexicana de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*).

La región es una zona montañosa que se encuentra entre Tamaulipas y Nuevo León. Los habitantes de las poblaciones cercanas utilizan de forma tradicional las hojas de los árboles de aguacate «criollo» como remedio etnobotánico contra la diarrea, la amibiasis y las enfermedades helmínticas (Acosta Díaz *et al.*, 2013). Un posible uso alternativo es el empleo de extractos de hojas del aguacate mexicano criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) como agente bactericida contra patógenos de creciente importancia.

Staphylococcus aureus ha demostrado una rápida evolución para adaptarse a los antibióticos, estas especies poseen mecanismos de resistencia a los beta lactámicos codificados en un casete cromosomal,

compuesto en general por los genes *mecA*, *mecRI*, *mecI*; sin embargo cada año se reportan variantes de este operón, lo cual demuestra la capacidad de la bacteria para resistir a nuevos fármacos (David y Daum, 2010).

Otro factor involucrado en el fenómeno de resistencia en *S. aureus* es el *Quórum sensing*. Este microorganismo desarrolla una estrategia bifásica para generar su patogenicidad. En concentraciones celulares altas, la síntesis de varios factores proteicos se reprime y comienza a secretar factores de virulencia modulados por el operón *Agr*. Dicho operón está compuesto por *AgrD*, que sintetiza el autoinductor peptídico (AIP), *AgrC* que sintetiza la histidín-quinasa encargada de transmitir la señal desde la membrana plasmática hasta la molécula reguladora de la respuesta transcripcional. *AgrA* sintetiza la molécula reguladora de la respuesta transcripcional y *AgrB* la proteína exportadora (excretora) que modifica el anillo de tiolactona del autoinductor peptídico (Roux *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto sobre el *Quorum sensing* y el efecto bactericida de los extractos etanólicos de hojas de 18 cultivares de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) del sur del estado de

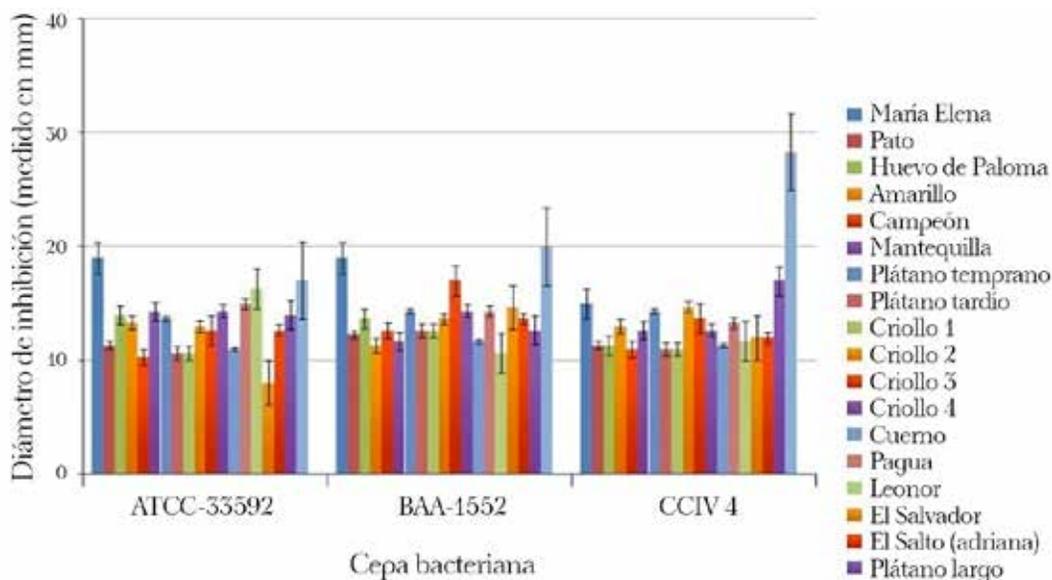


Figura 1. Diámetro de inhibición de los diferentes extractos contra tres cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (análisis de medias de Tukey, $p=0.05$).

Nuevo León sobre tres cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Metodología

Obtención de los extractos

Fueron utilizadas hojas verdes de las variedades nativas del sur del estado de Nuevo León de los municipios de Zaragoza y Aramberri. Las colectas fueron realizadas en verano. El nombre de los cultivares se basó en la denominación otorgada por los pobladores del sitio. Los cultivares evaluados fueron María Elena, Pato, Huevo de Paloma, Amarillo, Campeón, Mantequilla, Plátano temprano, Plátano tardío, Criollo 1, Criollo 2, Criollo 3, Criollo 4, Cuerno, Pagua, Leonor, el Salvador, el Salto y Plátano largo. Las hojas frescas de cada cultivar fueron secadas y tratadas con etanol al 70% por el método Soxhlet y el solvente fue evaporado con un evaporador rotatorio. Los extractos fueron esterilizados por filtración, almacenados a 4 °C y protegidos de la luz hasta su uso.

Efecto bactericida

Para este trabajo fueron usadas tres cepas de *S. aureus* resistente a meticilina: ATCC 33592, ATCC BAA-1556 y una cepa aislada de ganado bovino con mastitis (CCIV-4), todas con resistencia a meticilina. Las cepas crecieron en caldo de soya tripticacina por 18 h y se ajustó la concentración del microorganismo a 1 MacFarland, posteriormente fue inoculado en placas de agar Müller-Hinton. En cada placa se colocaron sensidiscos con 30 µl del extracto. Las placas fueron incubadas durante 24 h y posteriormente fue medido el diámetro de la zona de inhibición (Bauer *et al.*, 1966). La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida fueron determinadas por el método de microplaca de acuerdo con lo reportado por Eloff (1998).

Medición de la expresión del gen *AgrA*

Los niveles de expresión del gen *AgrA* perteneciente al operón de *Quorum sensing* de la bacteria fueron medidos con Sybr Green en un termociclador LightCycler 480 mediante cuantificación relativa, usando el RNA 16S como referencia, los primers usados fueron los siguientes: rt-*agrA*-f (AAAGTTGCAGCGATGGATTT), rt-*agrA*-r (ATGGGCAATGAGTCTGTGAG), que flanquean una región de 150 pb del gen *AgrA* y los primers rt-16S-f (CGTGGAGGGTCATTGGA) y rt-16S-r CGTTTACGGCGTGACTA) que flanquean una región de 150 pb del gen del 16S RNA (Zhao *et al.*, 2010). Las condiciones fueron 1 min a 90 °C, seguido por 40 ciclos 10 s a 90 °C, 10 s a 55 °C, 10 s a 72 °C y una curva de asociación (melting) desde 50 °C hasta 90 °C. El resultado se expresa mediante el cociente del CT del gen *AgrA* dividido entre el CT del gen 16S (Pfaffl, 2004).

Resultados y discusión

Se obtuvieron 18 muestras provenientes de cultivares diferentes, de ellas destacan los cultivares el Salto (ya que es un árbol silvestre) y María Elena (debido a que son hojas muy aromáticas). Los resultados de los halos de inhibición de los extractos por triplicado de cada uno muestran que en las tres cepas de MRSA probadas no existe diferencia significativa entre el efecto del control de kanamicina con respecto a la variedad María Elena ($p=0.004$) (figura 1). Los análisis de la expresión muestran que el extracto es capaz de minimizar la señalización por *Quorum sensing*, disminuyendo la expresión del gen *AgrA* (figura 2).

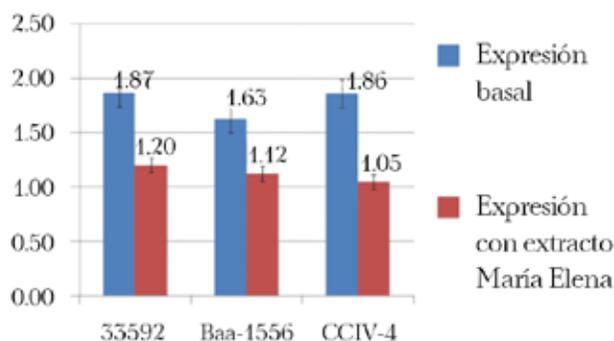


Figura 2. Análisis de la expresión del gen *AgrA* de las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina. Las barras expresan el índice de CT *Agr*/16S. Azul: cepa sin extracto; rojo: cepa estresada con el extracto (ANOVA $p=0.05$).

Conclusiones

El análisis de los extractos con compuestos bioactivos contra cepas bacterianas resistentes a los fármacos representa una oportunidad de encontrar nuevos antibióticos en la naturaleza. En el presente trabajo, se muestra que los cultivares nativos de aguacate del sur de Nuevo León (*Persea americana* var. *drymifolia*) tienen un efecto relevante *in vitro* contra una bacteria de gran importancia agroalimentaria y de salud, con un efecto bactericida. Además, el extracto reprime significativamente la expresión del gen *Agr*. Existe evidencia de que el operón *Agr* regula la actividad de múltiples operones como *Sae*, *IcaR*, *Sar*, los cuales se conectan con la producción de toxinas, así como con la expresión de genes de adhesión. Sin embargo, también se ha observado que la baja expresión del operón *Agr* tiene un papel trascendental en la reducción de la resistencia a vancomicina en MRSA con resistencia heterogénea a vancomicina (Agah *et al.*, 2014). Lo anterior brinda la oportunidad de buscar compuestos específicos que inhiban el *Quorum sensing* de la bacteria. En este trabajo se reporta el efecto anti-*Quorum Sensing* (*Quorum quenching*) y el efecto bactericida de los extractos de *Persea americana* var. *drymifolia*.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con proyecto PAICYT clave CA-4041-11.

Referencias

- Acosta Díaz, E., Almeyda, H., Hernández, L. (2013). Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4:531-542.
- Agah, S., Poulos, S., Banchs, C., Faham, S. (2014). Structural characterization of MepB from *Staphylococcus aureus* reveals homology to endonucleases. *Protein Science*, 23(5):594-602.
- Bauer, A.W., Kirby W., M.M., Sherris J., C.T., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4):493.
- David, M., Daum, R. (2010). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23:646-687.
- Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta médica*, 64(8):711-713.
- Pfaffl, M.W. (2004). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45.
- Roux, A., Todd, D.A., Velázquez, J.V., Cech, N.B., Sonenshein, A.L. (2014). CodY-Mediated Regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr System Integrates Nutritional and Population Density Signals. *Journal of bacteriology*, 196(6):1184-1196.
- Zhao, L., Xue, T., Shang, F., Sun, H., Sun, B. (2010). *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence. *Infection and immunity*, 78(8):3506-3515.



Aislamiento y caracterización de hongos con propiedades de biocontrol sobre *Phytophthora capsici* L. en el estado de Zacatecas

Montzerrat Betzabé Muñoz-Medina | Saúl Fraire-Velázquez | Víctor E. Balderas-Hernández
Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: balderas.victor@gmail.com

Resumen

En el estado de Zacatecas el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es una de sus principales actividades socioeconómicas. Sin embargo, el cultivo es afectado por diferentes agentes patógenos, tales como *Phytophthora capsici* L. Este oomiceto es el agente causal de la destructiva enfermedad marchitez o secadera de la planta de chile, que causa enormes pérdidas de las áreas cultivadas. Una alternativa económica y amigable con el ambiente al uso de fungicidas es el uso de agentes de biocontrol (bacterias y hongos). El objetivo del presente trabajo fue realizar el aislamiento de hongos nativos de la entidad con actividad antagonica contra *P. capsici* L. y la evaluación del efecto protector en planta de *C. annuum* L. Se obtuvieron cultivos puros de hongos a partir de suelos agrícolas y derivados de la minería y de plantas asociadas a ellos (rizósfera, hojas y raíces), todos colectados en el estado. Se confrontaron 50 cepas de hongos contra *P. capsici* L. para obtener cinéticas de crecimiento-inhibición; 20 cepas causaron inhibición del crecimiento de *P. capsici* L. del 75 al 100%. La co-inoculación de plántulas de *C. annuum* L. con *P. capsici* L. y con cepas seleccionadas de hongos con características de biocontrol resultó en una notable reducción de síntomas de secadera en comparación con las plántulas infectadas únicamente con el fitopatógeno. Los resultados anteriores demuestran que los aislados fúngicos con actividad de biocontrol son agentes potenciales para protección de plantas de chile contra la enfermedad de la secadera.

Palabras clave: chile, secadera, *Phytophthora capsici*, biocontrol, hongos antagonistas.

Introducción

En el estado de Zacatecas el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es una de sus principales actividades socioeconómicas. En el periodo 2010-2012 se produjeron 309 612 toneladas de chile, con un valor de producción de 2.16 billones de pesos en promedio (SAGARPA, SIAP). Sin embargo, el cultivo de chile enfrenta varios retos, como el riesgo de infección por diferentes micro-organismos patógenos, como *Phytophthora capsici* L., causante de la enfermedad conocida como de marchitez o secadera, que ha llegado a afectar de 60 a 100% la superficie cultivada (Delgadillo *et al.*, 2009). El oomiceto infecta la raíz o la base del tallo de planta de chile, lo que provoca pudrición y un estrangulamiento en la base del tallo que bloquea el xilema e interrumpe el paso de nutrientes y agua, lo que causa la marchitez de las hojas y conlleva a una defoliación, pudrición del fruto y muerte de la planta (Velásquez *et al.*, 2004; Hausbeck y Lamour, 2004).

Para el control de fitopatógenos se aplican grandes cantidades de fungicidas, que además de ser inespecíficos y costosos, provocan el desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno y problemas de contaminación y toxicidad al ecosistema (Rodríguez, 2002). Una alternativa al uso de fungicidas es el uso de bacterias y hongos como agentes de biocontrol, los cuales ejercen su efecto antagónico contra los hongos patógenos por medio de competencia de espacio o nutrientes, producción de metabolitos, parasitismo directo e incluso inducir la resistencia en plata (Balvatin *et al.*, 2009). Con lo anterior se hace necesaria la búsqueda de agentes de biocontrol (hongos) como opción para disminuir la pérdida de cultivos de chile por afección de *P. capsici* L.

El objetivo de este trabajo fue el aislamiento y la caracterización de cepas de hongos autóctonos del estado de Zacatecas, la evaluación de su efecto antagónico contra el crecimiento de *P. capsici* L. y la determinación de la capacidad de las cepas de hon-

gos seleccionados para proteger plántulas de *C. annuum* L. de la enfermedad causada por *P. capsici* L.

Metodología

Sitios de colecta de muestras

Se colectaron las muestras en los municipios de Guadalupe, Ojocaliente, Vetagrande y Sombrerete. Los sitios de colecta se eligieron tomando en cuenta si eran tierras destinadas al cultivo (de chile, alfalfa o maíz) o sitios derivados de procesos mineros posiblemente contaminados con metales pesados. También se tomaron muestras de rizósfera de plantas silvestres de los sitios de colecta de raíz, tallo y hojas; asimismo se colectaron muestras de cuerpos de agua y lodos. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico tipo ziploc para su transporte al laboratorio.

Procesamiento de muestras, obtención y preservación de las cepas de microorganismo

Las muestras sólidas (10 g sólidos) se resuspendieron en solución salina (NaCl 0.85%). Del sobrenadante se seleccionaron las alícuotas necesarias para hacer diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} . Posteriormente, se tomaron 100 μ L de cada dilución y se sembraron en placas de medio papa dextrosa agar (PDA), suplementado con 400 μ g/mL de kanamicina y 250 μ g/mL de estreptomycin, para el aislamiento de hongos. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C, hasta que se presentó desarrollo de colonias de microorganismos (3 a 5 días). Con las diferentes cepas de hongos obtenidos se realizaron resiembras hasta obtener cultivos con morfologías únicas en medio PDA. A partir de los hongos aislados se realizaron cultivos líquidos en medio caldo papa dextrosa y se prepararon stocks de glicerol para la preservación del hongo a -80 °C.

Evaluación del efecto antagónico de las cepas de hongos aislados contra *P. capsici* L.

En cajas Petri de 5.3 cm con medio PDA se colocó en un extremo la cepa de hongo aislada y en el lado contrario a *P. capsici* L., con ayuda de un sacabocados de 0.5 cm de diámetro; las cajas Petri se incubaron a 28 °C. El desarrollo de los hongos se evaluó midiendo el crecimiento radial de las colonias de los hongos hacia el centro de la caja, las mediciones se realizaron cada 24 h por ocho días. Se tuvieron como controles el crecimiento de *P. capsici* L. y el de cada cepa de hongo aislado. Cada confrontación y control se realizó por triplicado. De cada cinética de crecimiento se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. capsici* L. que cada cepa de hongo causó.

Evaluación del efecto de biocontrol en plántula de chile *in vitro*

Las semillas de *C. annuum* L. pasaron por un proceso de lavado y estratificado, después se colocaron en cajas Petri con medio Agar-Agua 1%, se dejaron en oscuridad por dos semanas, después se colocaron en cámara de fotoperiodo (16 h luz, 8 h oscuridad). Las plántulas con dos semanas de post-germinación se sembraron en medio Murashige & Skoog (MS) 40%, sin sacarosa, pH=5.8, 4 plántulas por caja. Para el caso de las confrontaciones, entre cada plántula sembrada se colocó un inóculo de 0.5 cm de diámetro de la cepa del hongo aislado alternado con un inóculo de 0.5 cm de diámetro de *P. capsici* L. Se incluyeron los controles solamente con el inóculo de las cepas de hongos aislados o bien de *P. capsici* L. Se evaluaron los daños que ocasionaron los hongos a la plántula durante quince días.

Resultados y discusión

Aislamiento de cepas de bacterias y de hongos

A partir del procesamiento de las distintas muestras colectadas a lo largo del estado de Zacatecas se obtuvieron 724 cepas de hongos. De ellas se tienen cultivos puros almacenados a -80 °C.

Efecto antagónico de las cepas de hongos aislados contra *P. capsici* L.

Del total de las cepas de hongos obtenidas, 50 cepas de hongos se confrontaron con el agente patógeno *P. capsici* L. en medio PDA. El fitopatógeno *P. capsici* L. cultivado en medio PDA presentó micelio blanco algodonoso y crecimiento radial que cubrió la totalidad de la superficie de la placa en ocho días (datos no incluidos). Del total de las 50 cepas de hongos confrontadas con el fitopatógeno, 23 cepas de hongos inhibieron de 75 a 100% el desarrollo de *P. capsici* L. El hongo aislado M7-3, el cual se obtuvo a partir de suelo destinado al cultivo de chile en el municipio de Trancoso, ocasionó un 86% de inhibición en el desarrollo del hongo patógeno (figura 4a).

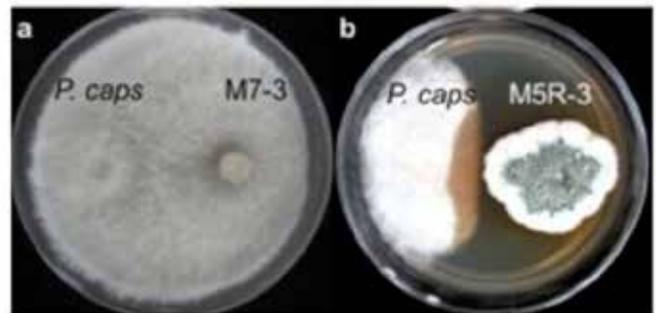


Figura 4. Confrontación de *P. capsici* L. con la cepa de hongo (a) M7-3 y (b) la cepa de hongo M5R-3. Tercer día de incubación a 28 °C en medio PDA.

En la cinética de crecimiento se puede observar que a las 72 h la cepa del hongo M7-3 presentó el máximo crecimiento, cubriendo por completo la superficie de la placa, evitando con ello el crecimiento

de *P. capsici* L. (figura 2), el cual no se restableció en los siguientes días de evaluación.

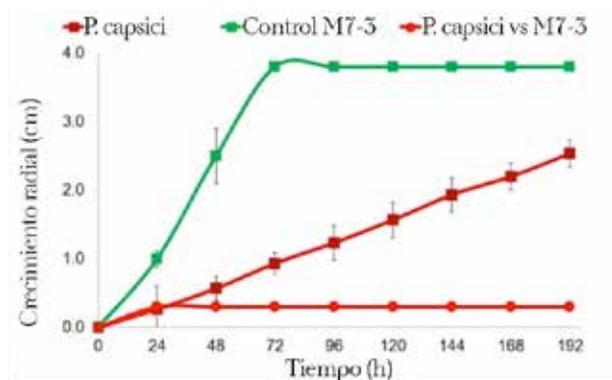


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de *Phytophthora capsici* ■, cepa de hongo M7-3 ■, y crecimiento de *P. capsici* en confrontación con M7-3 ●.

Para el caso de la cepa de hongo M5R-3 (figura 1b), la cual fue aislada a partir de la raíz de una planta silvestre (no identificada) en el municipio de Sombrerete, causó un 68% de inhibición en el crecimiento de *P. capsici* L. La cepa M5R-3 impidió el desarrollo de *P. capsici* L. a las 48 h de iniciada la confrontación, como se puede observar en la figura 3.

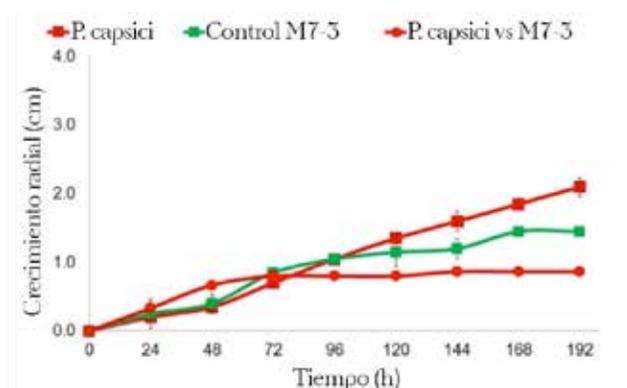


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de *Phytophthora capsici* ■, cepa de hongo M5R-3 ■, y crecimiento de *P. capsici* en confrontación con M5R-3 ●.

Evaluación del efecto de biocontrol en plántula de chile *in vitro*

En primera instancia se determinó el grado de afectación que causa el fitopatógeno *P. capsici* L. en plántulas de chile, para ello las plántulas se infectaron con un inóculo de 0.5 cm de diámetro de *P. capsici* L. Al quinto día posterior a la inoculación, se observó la presencia de pudrición (manchas café) en tallo y en hojas, que fueron progresando hasta cubrir por completo a la plántula, a los quince días de post-inoculación las plántulas estaban completamente secas, sin turgencia y con defoliación (figura 2a).

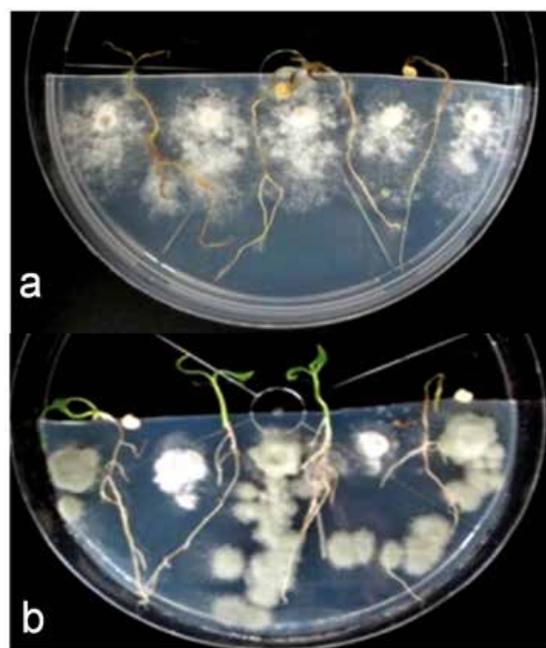


Figura 2. Plántulas de *C. annuum* (a) inoculadas con *P. capsici* L. (b) inoculadas con la cepa de hongo M5R-3 y con *P. capsici* L., con días de inoculación en medio ms 10%.

Concerniente a las plántulas de chile co-inoculadas con *P. capsici* L. y con el hongo M5R-3, las plántulas de chile mantuvieron su coloración verde y su turgencia (figura 2b) aún a los quince días post-inoculación, observándose notablemente la disminución de los síntomas de marchitez anteriormente vistos en el cultivo control infectado con el fitopatógeno (figura 2a).

Conclusiones

Se aislaron cepas de hongos con diferente grado de inhibición del crecimiento de *P. capsici* L., las cuales podrían ser utilizadas como agentes de biocontrol para prevenir la enfermedad de secadera en plántulas de *C. annuum* L.

Agradecimientos

A los apoyos obtenidos del FORDECYT-Doctores-174509 y del Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC-Promep-UAZ-PTC-189.

Referencias

- Balvantín, G.C., Martínez, H.J.L., Cerda, R.F., Lira, S.R.H. (2009). Biotecnología en el control de microorganismos fitopatógenos. *Ciencia cierta*, 19:6.
- Delgadillo, S.F., Paredes, M.R., Godoy, H.H., González, C.M.M., Villondo, P.E., Pons, H.J., Anaya, L.J., Gámez, V.F., Mectina, C.T., Rodríguez, G.R. (2009). *Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato*. Guadalajara: Prometeo.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88(12): 1292-1303.
- Rodríguez, V. (2002). *Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprófitos contra Rhizoctonia solani, un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate* (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Velásquez, V.R.M., Medina, A.M.M., Luna, R.J.J. (2004). Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista mexicana de fitopatología*, 19(2): 175-181.



Actividad antibacteriana *in vitro* de una colección de actinomicetos contra *Pectobacterium carotovorum* cepa 71

Gabriel Rincón-Enríquez | Zahaed Evangelista-Martínez
| Joaquín Qui-Zapata | Evangelina Quiñones-Aguilar
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño

correo-e: equinones@ciatej.mx

Resumen

La pudrición blanda es una enfermedad asociada al grupo de bacterias antiguamente pertenecientes al género *Erwinia*, actualmente este género ha sido dividido en dos grupos: *Dickeya* sp. y *Pectobacterium* sp. De manera particular *P. carotovorum* (sin *Erwinia carotovora*) es una enterobacteria Gram negativa que provoca pudrición blanda en diversos cultivos de importancia agrícola. Generalmente el control de esta fitobacteria se realiza mediante métodos químicos (antibióticos y productos a base de cobre). No obstante, el control biológico puede ser una alternativa viable. En ese sentido, el empleo de actinomicetos ha sido poco explorado, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria de aislamientos de actinomicetos sobre el crecimiento de *P. carotovorum*. Se realizó un experimento completamente al azar con 81 tratamientos y tres repeticiones. Se evaluó la inhibición de *P. carotovorum* cepa 71 mediante una escala ordinal de inhibición, los datos fueron analizados con la prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). El análisis mostró diferencias estadísticas significativas: los actinomicetos ABV63 y ABV79 presentaron mayor inhibición del crecimiento de *P. carotovorum*, por lo que los resultados revelan el potencial empleo de estos actinomicetos como agentes de control biológico de *P. carotovorum*, mediante estrategias específicas para el combate de enfermedades causadas por esta bacteria fitopatógena.

Palabras clave: pudrición blanda, *Erwinia carotovora*, actinobacterias.

Introducción

La pudrición blanda de diversos cultivos de plantas es una enfermedad que provoca cuantiosas pérdidas en cultivo como la papa (*Solanum tuberosum*) (Perombelon, 2002). En 1984 Sawyer estimó una pérdida mundial de la producción de papa en un 24%. Los mecanismos por los cuales *P. carotovorum* provoca la enfermedad se resumen en los siguientes: producción y secreción de enzimas pectolíticas como pectinasas, poligalacturonasas, proteasas y celulasas (Barras *et al.*, 1984); lipo-polisacáridos; asimilación de hierro y movilidad de las células bacterianas. Estos factores de virulencia contribuyen para que la fitobacteria sea capaz de macerar los tejidos constituyentes de la pared vegetal, provocando así la pudrición de la planta.

Las medidas de control de este fitopatógeno están basadas principalmente en el empleo de estrategias culturales, físicas, químicas y biológicas (Czajkowski *et al.*, 2014). Respecto a las medidas de control biológico se han empleado principalmente microorganismos antagonistas con capacidad para competir por espacio, nutrientes, antibiosis, inducción del sistema de resistencia vegetal. De manera similar se ha usado péptidos provenientes del metabolismo secundario con actividad antibacteriana (Arce *et al.*, 1999). También son utilizados enemigos naturales de la fitobacteria para combatirla como los virus bacterianos (bacteriófagos) o bacterias depredadoras (*Bdellovibrio bacteriovorus*) (Rendulic *et al.*, 2004). Igualmente se ha propuesto el uso de microorganismos que inhiban los factores de virulencia del fitopatógeno como el quorum-sensing (Jafra *et al.*, 2006) o la formación de biofilms (Ragunath *et al.*, 2012).

A pesar de esto, el uso de microorganismos del grupo de los actinomicetos ha sido poco estudiado. En ese sentido, el desarrollo de tecnologías con herramientas biotecnológicas como los actinomicetos podría contribuir al diseño de nuevas estrategias de control biológico de enfermedades que afectan a

los cultivos agrícolas, reduciendo las pérdidas económicas y disminuyendo el impacto ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de una colección de actinomicetos aislados de suelos agrícolas (colección ABV del CIATEJ), contra la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* en condiciones *in vitro*.

Metodología

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ. La cepa de la bacteria fitopatógena empleada en las pruebas de antagonismo microbiano fue *P. carotovorum* (Pc) cepa 71. Se estableció un experimento bajo un diseño completamente al azar con un total de 81 tratamientos (cada cepa de actinomiceto confrontada con Pc) y un tratamiento testigo (sólo con la bacteria fitopatógena). Cada tratamiento con tres repeticiones.

La confrontación *in vitro* de actinomicetos contra Pc cepa 71 se realizó en condiciones *in vitro* entre los aislamientos de actinomicetos (ABV01 a ABV80) con *P. carotovorum* y un testigo que sólo comprendió la bacteria fitopatógena. Se empleó como medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) a pH de 7.0. El experimento permaneció durante cinco días en incubación a 26 °C y la inhibición de Pc se evaluó cuando las placas con el testigo que contenía al fitopatógeno presentó un crecimiento total sobre la superficie inicialmente inoculada en el medio de cultivo.

Como variable de respuesta se evaluó la inhibición del crecimiento de Pc mediante una escala ordinal de inhibición propuesta por Quiñones-Aguilar *et al.* (2013) y que explica que los valores 0, 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a porcentajes del crecimiento bacteriano de Pc del 0, $\leq 25\%$, $\leq 50\%$, $\leq 100\%$ y $> 100\%$, respectivamente. Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis e intervalos de confianza de la mediana ($P \leq 0.05$) mediante el programa estadístico StatGraphics (StatGraphics, 2005).

Resultados y discusión

La prueba estadística de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticas altamente significativas (0.0001) entre los aislamientos de actinomicetos para la variable de respuesta de la inhibición del crecimiento bacteriano de *P. carotovorum*. De igual forma, en la figura 1 se aprecian los resultados del experimento para todos los aislamientos, esos datos revelan que varios de los actinomicetos aislados podrían ser potencialmente aprovechados como inóculo en el desarrollo de algún producto para control biológico (como el caso del Actinovate) o como sustancia o compuesto derivado del actinomiceto (metabolitos secretados por el microorganismo e implicados en la inhibición del crecimiento bacteriano) para el control de la bacteria fitopatógena Pc.

Varios de los evaluados mostraron una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano de Pc: por ejemplo, el aislamiento ABV63, presentó un valor de 0 en la escala ordinal de inhibición (figura 1), lo cual muestra una inhibición total del crecimiento de Pc por parte del actinomiceto. Otras cepas que mostraron fuerte inhibición del crecimiento de Pc fueron ABV03 y ABV79 (figura 1). Sin embargo, otros aislamientos de actinomicetos no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano de Pc (valor 4 y 5 en la escala ordinal de inhibición, figuras 1 y 2) e incluso algunas fueron invadidas por el crecimiento de la bacteria fitopatógena (valores 4 y 5 en la escala ordinal de inhibición, figura 1).

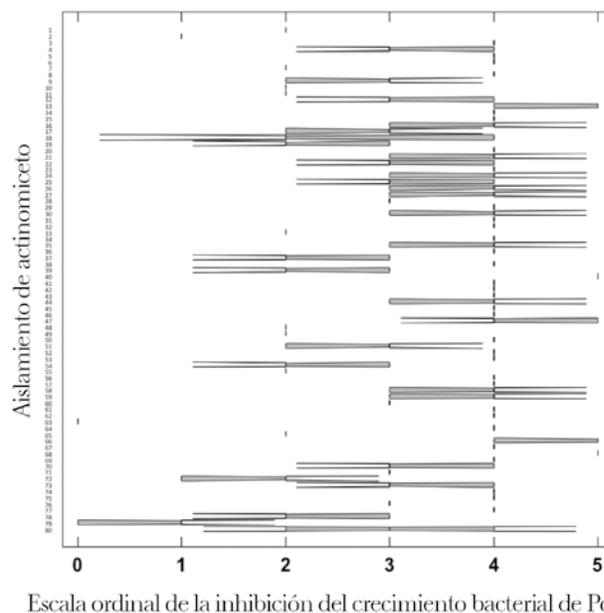


Figura 1. Efecto de 80 aislamientos de actinomicetos sobre el crecimiento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* cepa 71 (Pc). La prueba de Kruskal-Wallis produjo un estadístico de 203.66 con un valor de $P \leq 0.0000$. Las líneas prolongadas de las medianas indican un intervalo de confianza a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

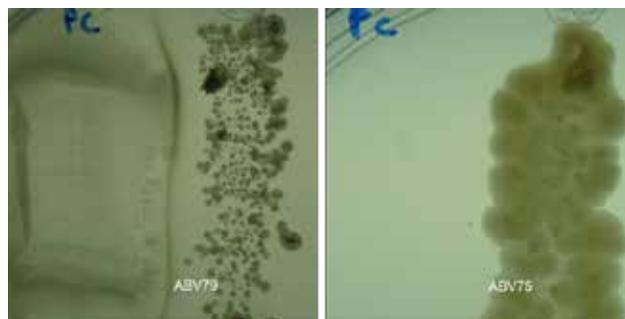


Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* cepa 71 (Pc) sobre medio PDA en presencia de dos cepas de actinomicetos. El aislamiento ABV75 no fue capaz de inhibir a Pc mientras que ABV79 inhibió el crecimiento de Pc (en flechas).

Cabe mencionar que la utilización de actinomicetos como agentes de control biológico puede ser efectivo; por ejemplo, el producto Actinovate comercializado como biofungicida es elaborado a base de esporas de *Streptomyces lydicus*. El empleo de este producto es recomendado contra diversos fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de importancia comercial como chile, fresa, uva, jitomate y algunas cucurbitáceas. Por otro lado, diversos trabajos

de investigación científica muestran la efectividad de los actinomicetos del género *Streptomyces* contra microorganismos fitopatógenos, como *S. rochei* contra *Phytophthora* que afecta a chile (Ezziyyani *et al.*, 2007) y *S. griseoviridis* contra *Fusarium* que afecta a jitomate (Minuto *et al.*, 2006).

En el caso de bacterias se han evaluado con éxito contra *Ralstonia solanacearum* (Boukaew *et al.*, 2011) y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2013). Los actinomicetos, también pueden ser utilizados como promotores de crecimiento, lo cual constituye un beneficio adicional pues como bioinsumo puede proporcionar a los agricultores un uso como biofertilizantes o agentes de control biológico (biofungicidas o biobactericidas), lo cual constituye una alternativa viable para reemplazar el uso de fertilizantes y pesticidas.

Conclusiones

Existen aislamientos de actinomicetos capaces de inhibir en distinto grado el crecimiento bacteriano de *Pectobacterium carotovorum* cepa 71. El aislamiento que inhibió por completo el crecimiento de la bacteria fitopatógena fue ABV79.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto AGS-2011-02-181930 del FOMIX Aguascalientes-Conacyt.

Referencias

Arce, P., Moreno, M., Gutierrez, M. *et al.* (1999). Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cecropin SB-37 genes. *American Journal of Potato Research*, 76:169-77.

Barras, F., van Gijsegem, F., Chatterjee, A.K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32:201-234.

Boukaew S., Chuenchit, S., Petcharat, V. (2011). Evaluation of *Streptomyces spp.* for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *BioControl*, 56:365-374.

Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veenb, J.A., van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60(6):999-1013.

Ezziyyani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C., Candela, M.E. (2007). Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology*, 155(6):342-349.

Jafra S., Przynsowa J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P., van der Wolf, J.M. (2006). Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(10):1006-10015.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2006). Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces cesgriseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, 25(5):468-475.

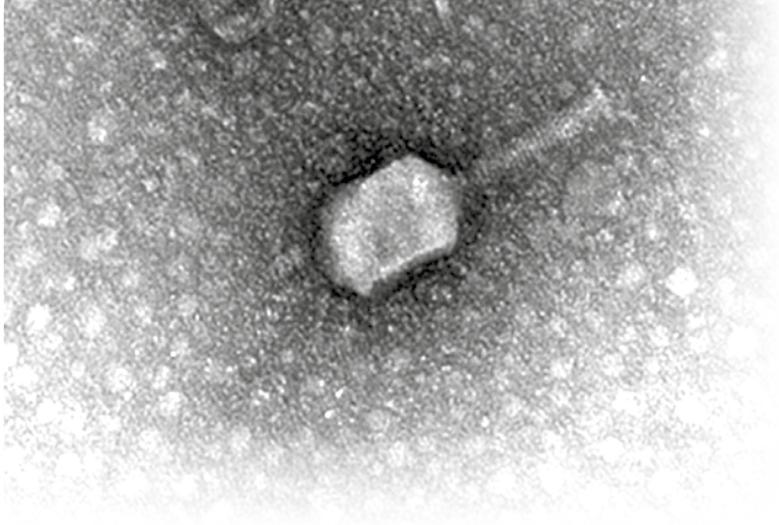
Perombelon, M.C.M. (2002). Potato diseases caused by soft rot Erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Path*, 51(1):1-12.

Quiñones-Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., Qui-Zapata, J.A. (2013). Actividad inhibitoria de actinobacterias del suelo para el biocontrol del agente causal del tizón de halo en frijol. Memoria en extenso del XXXVIII Congreso de la SMCS AC. 24-29 de Noviembre de 2013. *Terra Latinoamericana* 31, Suplemento especial III(1):277-281.

Ragunath, C., Shanmugam, M., Bendaoud, M., Kaplan, J.B., Ramasubbu, N. (2002). Effect of a biofilm-degrading enzyme from an oral pathogen in transgenic tobacco on the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Plant Pathology*, 61(2):346-354.

Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A. *et al.* (2004). A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, 303(5658):689-692.

Sawyer, R.L. (1984). Potatoes for the Developing World. *International Potato Center*.



Control *in vitro* de *Dickeya dadantii* cepa 3937 con actinomicetos del suelo

Evangelina Quiñones-Aguilar | Zahaed Evangelista-Martínez | Gabriel Rincón-Enríquez
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño

correo-e: grincon@ciatej.mx

Resumen

La pudrición blanda en plantas es provocada principalmente por bacterias fitopatógenas, entre las que se encuentran *Dickeya* sp. y *Pectobacterium* sp. Esta enfermedad provoca cuantiosas pérdidas económicas en distintos cultivos de importancia alimenticia, industrial y ornamental; por ejemplo, en papa (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays*), crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), agave (*Agave* sp.). *Dickeya dadantii* es una enterobacteria Gram negativa asociada a problemas de pudrición blanda en varios cultivos como agave y ornamentales. Las estrategias de control de este fitopatógeno no han mostrado efectividad total, por lo cual se exploran otros métodos de control, de los que destacan los relacionados con control biológico a través de microorganismos, como los actinomicetos. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de diversos actinomicetos aislados de suelos agrícolas contra *D. dadantii* en condiciones *in vitro*. Se realizó un experimento con 81 tratamientos y tres repeticiones en un diseño completamente al azar. Se evaluó la inhibición de *D. dadantii* cepa 3937 empleando una escala ordinal de inhibición, los datos fueron analizados mediante Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). Los resultados mostraron que los actinomicetos ABV55 y ABV79 inhibieron por completo el crecimiento de *D. dadantii*, lo que sugiere su potencial empleo en estrategias de control biológico.

Palabras clave: pudrición blanda, *Erwinia chrysanthemi*, actinobacterias.

Introducción

D. dadantii (anteriormente *Erwinia chrysanthemi*) es uno de los agentes causales de la pudrición blanda en cultivos de importancia agrícola en México como agave, papa, cultivos ornamentales (crisantemo, violeta africana), entre otros. El principal mecanismo que presenta esta bacteria fitopatógena para producir la enfermedad es la producción de enzimas pectolíticas (Barras *et al.*, 1994) que degradan los componentes de la pared vegetal y provocan con ello una maceración del tejido de la planta. En Europa se está proponiendo a *Dickeya solani* como una nueva especie responsable de la pudrición en papa (Toth *et al.*, 2011). Por tanto, el grupo de las especies del género *Dickeya* se halla entre las 10 fitobacterias de importancia agrícola a nivel mundial (Mansfield *et al.*, 2012).

El combate de ese tipo de bacterias se realiza principalmente mediante métodos químicos que involucran estrategias de prácticas culturales para evitar la propagación del inóculo: empleo de material de propagación sano (semilla, propágulos vegetativos); estrategias de generación de variedades resistentes o tolerantes a las enfermedades por métodos de mejoramiento genético tradicional o biotecnológico (transgénesis); métodos químicos que implican el empleo de antibióticos (estreptomicina y sus derivados, oxytetraciclina, kasugamicina o virginiamicina) y compuestos a base de sales como el cobre; finalmente, estrategias donde se involucra el control biológico.

En el trabajo presentado por Czajkowski *et al.* (2011) se mencionan las principales estrategias de control biológico empleadas contra *Dickeya sp.* Destacan el empleo de microorganismos antagónicos que compiten por nutrientes, espacio, antibiosis o por la inducción del sistema de resistencia de la planta, como *Pseudomonas sp.* (con o sin fluorescencia), bacterias ácidos lácticas, *Bacillus subtilis*, *Bdellovibrio bacteriovorus*. Igualmente se comenta el empleo de bacteriófagos (virus patógenos de bacterias)

en el control de las especies de *Dickeya*; no obstante, Czajkowski *et al.* (2011) mencionan que estos virus no han sido exitosos por la falta de movilidad de las partículas virales y porque las bacterias rápidamente crean mecanismos de resistencia.

A pesar de estos esfuerzos en el área del control biológico, el empleo de actinomicetos no ha sido evaluado para combatir este tipo de bacterias fitopatógenas; por ello, el objetivo del estudio consistió en evaluar la actividad inhibitoria de actinomicetos aislados de suelos agrícolas contra el agente causal de la pudrición blanda (*D. dadantii*).

Metodología

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ). La cepa de la bacteria fitopatógena empleada en las pruebas de antagonismo microbiano fue *Dickeya dadantii* (Dd) cepa 3937. La confrontación *in vitro* de actinomicetos contra *Dickeya dadantii* se efectuó entre la colección de actinomicetos ABV (ABV01 a ABV80) con *D. dadantii* y un testigo que comprendía únicamente a la bacteria fitopatógena. Se empleó como medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) a pH de 7.0.

El experimento permaneció durante cinco días en incubación a 26 °C y la inhibición de Dd se evaluó cuando las placas control presentaban un crecimiento total sobre la superficie inicialmente inoculada sobre el medio de cultivo. El experimento se estableció usando un diseño completamente al azar con un total de 81 tratamientos (cada cepa de actinomiceto confrontada con Dd) y un tratamiento testigo (sólo con la bacteria fitopatógena). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

Se evaluó la inhibición del crecimiento de Dd mediante una escala ordinal propuesta por Quiñones-Aguilar *et al.* (2013), que se resume en 0, 1, 2, 3, 4 y 5, números que corresponden a porcentajes del crecimiento bacteriano del 0, ≤25%, ≤50%, ≤100% y

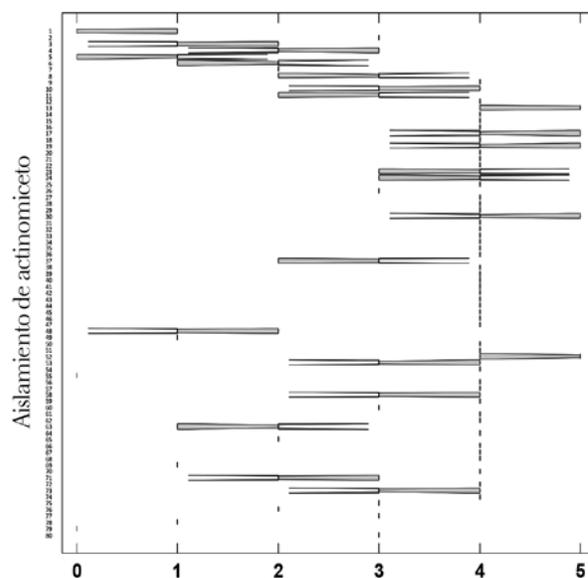
>100%, respectivamente. Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis e intervalos de confianza de la mediana ($P \leq 0.05$) a través del programa estadístico StatGraphics (StatGraphics, 2005).

Resultados y discusión

El análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticas altamente significativas (0.0004) entre la capacidad de inhibición de Dd por parte de los distintos actinomicetos aislados (figura 1). Estos resultados revelan que varios de los actinomicetos evaluados podrían ser empleados en el desarrollo de productos, ya sea directamente como inóculos comerciales a base de estos microorganismos o como productos derivados del metabolismo de los aislamientos seccionados por su capacidad de inhibir a Dd. Los aislamientos ABV55 y ABV79 mostraron un valor de 0 en la escala ordinal de inhibición, lo que muestra una completa inhibición del crecimiento bacteriano de *Dickeya dadantii* (figuras 1 y 2) y constituye un ejemplo de inhibición total por parte del actinomiceto.

Otros aislamientos de actinomiceto que inhibieron el crecimiento bacteriano de Dd entre un 1-25% fueron: ABV03, ABV05, ABV48, ABV49, ABV63, ABV69 y ABV78 (figura 1). De manera similar, algunos aislamientos no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de Dd (ABV37, etcétera) e incluso Dd llegó a crecer sobre ellos (ABV40, etcétera) (figura 2).

Estos resultados denotan que el empleo de actinomicetos como agentes de control biológico puede ser efectivo, inclusive existen algunos productos comerciales (como Actinovate) comercializados como biofungicidas y elaborados a base de esporas de actinomicetos (*Streptomyces lydicus*). Este tipo de productos es recomendado contra diversos fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de importancia comercial como chile, fresa o uva.



Escala ordinal de la inhibición del crecimiento bacteriano de Dd.

Figura 1. Efecto de 80 actinomicetos aislados del suelo, sobre el crecimiento bacteriano de *Dickeya dadantii* cepa 3937 (Dd), agente causal de la pudrición blanda en distintas plantas hospederas. La prueba de Kruskal-Wallis produjo un estadístico de 219.4 con un valor de $P \leq 0.00004$. Las líneas prolongadas de las medianas indican un intervalo de confianza de la mediana de la escala ordinal de severidad a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

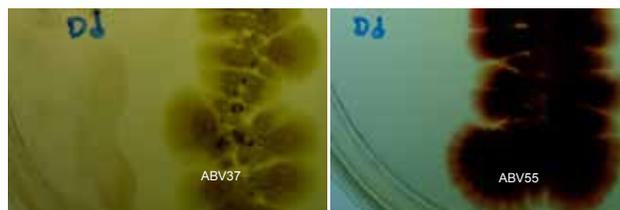


Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *Dickeya dadantii* cepa 3937 (Dd) sobre medio PDA en presencia de dos cepas de actinomicetos. El aislamiento ABV37 no fue capaz de inhibir a Dd mientras que ABV55 no permite ningún crecimiento de Dd (flechas).

Por otro lado, numerosos trabajos de investigación científica han mostrado que los actinomicetos son promisorios agentes de control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas. Varios estudios han informado acerca de los efectos de antagonismo microbiano por parte de actinomicetos del género *Streptomyces* contra microorganismos fitopatógenos.

Boukaew *et al.* (2011) aislaron y evaluaron la actividad inhibitoria de 265 cepas de *Streptomyces spp.*

contra *Sclerotium rolfsii*, causante de la pudrición de raíz y tallo en Chile; posteriormente los 14 mejores aislamientos probados contra *S. rolfsii* fueron usados contra *Ralstonia solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana en Chile, en el que se encontraron tres cepas efectivas contra ambos fitopatógenos, identificados como *S. mycarofaciens* y dos como *S. philanthi*. Los actinomicetos pueden ser una alternativa viable al empleo de agroquímicos.

Conclusiones

Existen aislamientos de actinomicetos capaces de inhibir en distinto grado el crecimiento bacteriano de *Dickeya dadantii* cepa 3937. Las cepas que inhibieron por completo el crecimiento de la bacteria fitopatógena fueron ABV55 y ABV79.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo del proyecto AGS-2011-02-181930 del FOMIX Aguascalientes-Conacyt.

Referencias

- Barras, F., van Gijsegem, F., Chatterjee, A.K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32:201-234.
- Boukaew, S., Chuenchit, S., Petcharat, V. (2011). Evaluation of *Streptomyces spp.* for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *BioControl*, 56(3):365-374.
- Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veenb, J.A., van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60(6):999-1013.
- Quiñones-Aguilar, E.E., Rincón-Enríquez, G., Qui-Zapata, J.A. (2013). Actividad inhibitoria de actinobacterias del suelo para el biocontrol del agente causal del tizón de halo en frijol. Memoria en extenso del XXXVIII Congreso de la SMCS AC. 24-29 de Noviembre de 2013. *Terra Latinoamericana* 31, Suplemento especial III(1):277-281.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6):614-629.
- Statgraphics centurion (version XV) [software]. User manual. StatPoint, Inc. USA.
- Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Helia, V., Pirhonen, M., Tsror (Lahkim), L., Elphinstone, J.G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3):385-399.



Evaluación y preselección de actinomicetos para el biocontrol de *Rhizoctonia solani*, fitopatógeno asociado a la marchitez del chile

Jesús R. Trinidad-Cruz | Gabriel Rincón-Enríquez
| Sinahi Pérez-Flores | Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño

correo-e: equinones@ciatej.mx

Resumen

En México el cultivo del chile es de gran relevancia económica; sin embargo, diversos problemas fitosanitarios afectan su producción y uno de los fitopatógenos vinculados a la marchitez es el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (RS). Actualmente se requieren tecnologías para el control biológico de fitopatógenos que permitan el desarrollo de la agricultura sustentable. El uso de actinomicetos como agentes de control biológico puede ser una opción alternativa a los agroquímicos. En ese sentido, el objetivo de la investigación fue evaluar y preseleccionar actinomicetos con capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Se evaluó el grado de inhibición de 86 actinomicetos aislados de suelo, a través de confrontaciones *in vitro* contra RS, de los cuales 85 actinomicetos pertenecen a la colección (ABV) de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ y uno aislado del producto comercial Actinovate (*Streptomyces lydicus*). El 21.5% de los actinomicetos logró inhibir el crecimiento de RS con promedios que oscilan entre 2 y 50%. El aislado ABV45 obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de RS al ser estadísticamente igual ($p \leq 0.05$) a otros siete aislamientos de actinomicetos, los cuales pueden ser utilizados como posibles agentes de control biológico de fitopatógenos.

Palabras clave: compuestos bioactivos, inhibición, antibiosis, actinobacterias.

Introducción

Para México, el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es de gran importancia económica: en 2013 se registró una producción de chile verde de poco más de 2 millones de Mg con un rendimiento de 17.26 Mg ha⁻¹, con un valor de producción aproximado de 15 mil millones de pesos (SIAP, 2013). No obstante, varios problemas fitosanitarios afectan la producción y el rendimiento del cultivo, tal es el caso de Rs, hongo fitopatógeno con una gran incidencia en el cultivo del chile (Velásquez-Valle *et al.*, 2007; Montero-Tavera *et al.*, 2013); debido a ello se requieren alternativas para su control.

El uso de microorganismos constituye una alternativa biotecnológica que permite un desarrollo sustentable del cultivo. Los actinomicetos son una fuente de bioactivos que faculta el control biológico de dichos fitopatógenos (Palaniyandi *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo fue evaluar y pre-seleccionar actinomicetos con capacidad de inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani in vitro*.

Metodología

Se utilizaron 85 cepas de actinomicetos pertenecientes a la colección denominada ABV (ABV01-ABV85) del laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIATEJ. Las cepas de actinomicetos fueron aisladas de muestras de suelo rizosférico de plantas de *Agave cupreata*, además de una cepa aislada del producto comercial Actinovate (*Streptomyces lydicus*). La cepa de Rs aislada de plantas enfermas de chile fue provista por el investigador fitopatólogo Onésimo Moreno Rico, de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

La actividad inhibitoria de los actinomicetos se determinó por confrontación directa a través de un ensayo *in vitro* en cajas Petri (90 mm de diámetro) en medio de cultivo agar dextrosa papa (PDA, Difco) estéril (121 °C durante 20 min), el pH fue ajustado a 7 (NaOH 4 M) antes de su esterilización. En cada caja se colocaron discos de actinomicetos de 6 mm de diá-

metro en cada uno de los cuatro puntos cardinales de la caja y al centro un disco de Rs de la misma medida (figura 1). Las cajas control sólo se inocularon con un disco de Rs en el centro de la caja.

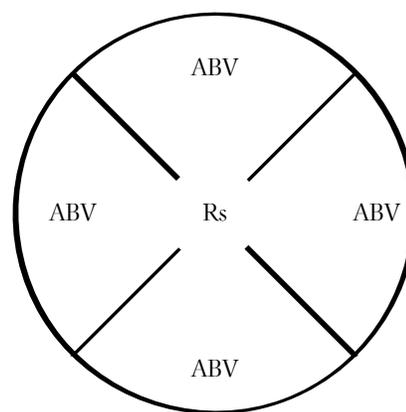


Figura 1. Representación gráfica de la inoculación de las cepas de actinomicetos (ABV) y el fitopatógeno *R. solani* (Rs).

Las cajas inoculadas con los actinomicetos y el hongo Rs fueron incubadas a 26 ± 1 °C durante ocho días antes de su evaluación, en ese tiempo la caja con el fitopatógeno (caja control) presentó un crecimiento radial completo sobre el medio de cultivo.

El área de inhibición de Rs (AIRS) se determinó por su medición en un cuarto de la caja, donde se inoculó alguna cepa de actinomiceto (figura 1), los resultados se expresaron en porcentajes. Se efectuó un diseño experimental completamente al azar con un total de 87 tratamientos [85 cepas de actinomicetos (ABV) y Actinovate (*S. lydicus*) confrontadas contra Rs] y uno control que sólo comprende a Rs.

Se hicieron tres repeticiones por tratamiento, cada repetición fue un disco de actinomiceto de 6 mm de diámetro. Con los datos se efectuó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias Tukey HSD ($p \leq 0.05$) mediante el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

Resultados y discusión

A los ocho días de la inoculación, la actividad inhibitoria de los 86 aislamientos de los actinomicetos mostró un efecto variable en el porcentaje de inhibición del crecimiento de Rs de 0 a 50%. Únicamente el 21.5% de los aislamientos de actinomicetos presentó un efecto de inhibición del crecimiento de Rs (figura 2).

Las barras en rojo en la figura 2 resaltan los ocho aislamientos de actinomicetos (ABV45, 07, 47, 49, 48, 65, 37 y 64) que manifestaron entre 30 y 50% de inhibición; en tanto, la barra negra corresponde al Actinovate. Con esos resultados se pueden seleccionar los actinomicetos cuyo efecto es inhibir el crecimiento de Rs y considerarlos como potenciales agentes de control biológico contra Rs.

Diversos mecanismos implicados en la inhibición son consecuencia de la producción de antibióticos, enzimas degradadoras de la pared celular y competencia por nutrientes (Banga *et al.*, 2008; Palaniyandi *et al.*, 2013). Al respecto, Zhao *et al.* (2012) encontraron que el uso de metabolitos extracelulares producidos en el medio líquido del actinomiceto *Streptomyces bikiniensis* HD-087 inhibió el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* por mecanismos directos como la degradación de la pared celular de las hifas, el daño a los conidios como la fragmentación y el encogimiento con relación al control. En el caso presente es necesario evaluar los mecanismos de los actinomicetos (ABV) implicados en la inhibición del crecimiento de Rs.

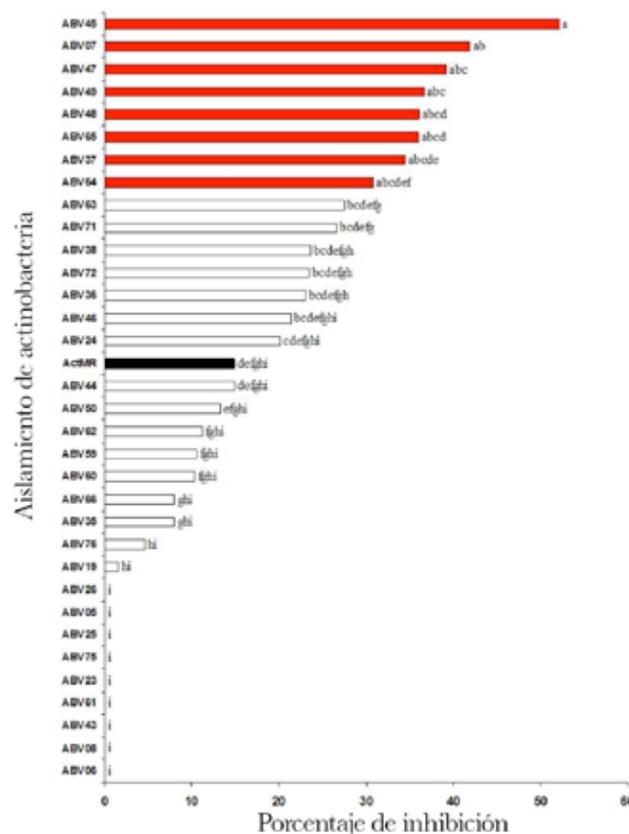


Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *R. solani* por efecto de varios aislamientos de actinomicetos. Letras distintas en cada barra indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). ActMR=*Streptomyces lydicus* (Actinovate).

Conclusiones

De los 86 aislamientos de actinomicetos utilizados para inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* a través de confrontaciones *in vitro*, únicamente el 21.5% de los aislados tuvo un efecto en la inhibición del crecimiento; sólo ocho actinomicetos presentaron inhibición del crecimiento de Rs de 30 a 50%, éstos pueden considerarse como potenciales agentes de control biológico contra Rs, por lo que las pruebas *in planta* son aún necesarias.

Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto titulado «Desarrollo de una tecnología para el control biológico de la marchitez del chile por medio de actinomicetos

nativos del estado de Aguascalientes», financiado por el Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Aguascalientes (clave del proyecto AGS-2011-C02-181930). J.R. Trinidad-Cruz agradece a dichas instituciones por la beca otorgada para participar como investigador asociado al proyecto.

Referencias

- Banga, J., Praveen, V., Singh, V., Tripathi, C.K.M., Bi-hari, V. (2008). Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. *Medicinal Chemistry Research* 17(2):425-436.
- Montero-Tavera, V., Guerrero-Aguilar, B.Z., Anaya-López, J.L., Martínez-Martínez, T.O., Guevara-Olvera, L., González-Chavira, M.M. (2013). Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(7):4043-4054.
- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Zhang, L., Suh, J.W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22):9621-9636.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2013). Cierre de la producción agrícola por cultivo. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Statgraphics centurion (version XV) [software]. StatPoint, Inc. USA.
- Velázquez-Valle, R., Amador-Ramírez, M.D., Medina-Aguilar, M.M., Lara-Victoriano, F. (2007). Presencia de patógenos en almácigos y semillas de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(4):75-79.
- Zhao, S., Du, C.M., Tian, C.Y. (2012). Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber fusarium wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9):2919-2927.



Expresión de los genes efectores durante la fase biotrófica en la interacción plátano-*Mycosphaerella fijiensis*

Inés Arana-Guevara | Roberto Vázquez-Euán | Miguel Alonzo Tzéc-Sima | Blondy Beatriz Canto-Canche

Unidades de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y de Biotecnología

| CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN

Salvador Guzmán-González | Gilberto Manzo-Sánchez

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

correo-e: jainfr@hotmail.com

Resumen

El hongo hemibiotrófico *M. fijiensis* es el causante de la enfermedad foliar de plátanos y bananos denominada Sigatoka negra, en la actualidad es el principal problema fitosanitario en todas las zonas bananeras del mundo. La gran mayoría de los trabajos reportados en *M. fijiensis* se han dirigido al estudio durante su etapa necrotrofica, mientras que la fase biotrófica ha sido soslayada por las dificultades técnicas que implica el análisis de expresión génica del hongo en tejidos asintomáticos de la planta. No obstante, esta fase es de gran interés, pues es clave para entender cómo se inicia la enfermedad y eventualmente poder controlarla o contrarrestarla desde sus inicios.

Palabras clave: Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, biotrofia.

Introducción

El banano es un alimento rico en vitaminas y minerales, es considerado uno de los principales frutales en cuanto a consumo a escala mundial; además, genera empleo y brinda sustento a productores agrícolas con una derrama económica considerable en países productores (Aceves *et al.*, 2008). Es pertinente mencionar que el banano es afectado por diversas plagas y enfermedades. Muestra de ello es la Sigatoka negra (sn), causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, la principal enfermedad en el mundo para ese cultivo.

Antes de iniciar las etapas sintomáticas conocidas de la enfermedad, el hongo prolifera asintóticamente de manera biotrófica, colonizando el tejido foliar, para después iniciar la fase necrotrófica (Ploetz, 2004). Debido a que las fases necrotróficas son visibles, la mayoría de los estudios se ha enfocado en esas etapas. Sin embargo, los ensayos efectuados han permitido detectar la presencia del hongo en la hoja durante la fase biotrófica, que muestra que no permanece en completa latencia. Un punto importante para abordar la enfermedad es el estudio de genes que pudieran controlarla desde la fase asintomática.

El estudio de efectores que desencadenan el mecanismo de defensa de la planta, antes de que se inicie la etapa necrotrófica, es un aspecto clave para estudiar y entender cómo controlar la enfermedad. En esta investigación se trabajó con la etapa biotrófica del hongo usando herramientas biotecnológicas, como la PCR en tiempo real para el estudio de la expresión de los genes *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2* durante la infección del banano.

Metodología

La cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* presente en hojas de banano asintomáticas con Sigatoka negra se efectuó mediante cuantificación absoluta con curva estándar. Se extrajo ADNg de una

cepa pura de *M. fijiensis*, con él se realizaron las diluciones seriales requeridas. Posteriormente se extrajo ADN de hojas de banano asintomáticas colectadas en campo y se llevó a cabo el ensayo para detectar la presencia del hongo. En la cuantificación de la biomasa por medio de PCR en tiempo real se utilizaron los cebadores específicos y la sonda TaqMan para el gen de β -tubulina de *M. fijiensis* (Arzanlou *et al.*, 2007) y las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo PCR Step One Plus de 96 pozos, siguiendo las instrucciones del proveedor (Applied Biosystems).

Sobre la cuantificación de la expresión con curva estándar, se utilizó como templado el ARN extraído de la cepa pura de *M. fijiensis* en las diluciones seriales requeridas en la curva estándar. A las muestras de hojas de banano asintomáticas que resultaron positivas (con *M. fijiensis* en la prueba con ADNg) se les extrajo el ARN. Posteriormente se les dio tratamiento con DNasa I (INVITROGEN) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación se hicieron con el ARN como templado; el ADN obtenido de micelio del hongo fungió como control positivo, mientras que el control negativo fue el agua ultra pura.

Resultados y discusión

La PCR en tiempo real permitió realizar la cuantificación de biomasa del hongo *M. fijiensis* y el análisis de la expresión de los genes *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2* en muestras asintomáticas de banano infectadas con Sigatoka negra, es decir, durante la fase biotrófica.

En la figura 1 los números de las abscisas corresponden a los asignados a las muestras durante la colecta en el campo y las ordenadas a la cantidad en ng del ADN de *M. fijiensis* por gramo de peso fresco. Las muestras fueron arregladas con base en la cantidad creciente de ADNg de biomasa del patógeno porque se esperaba que la cantidad correlacionara con el grado de infección.

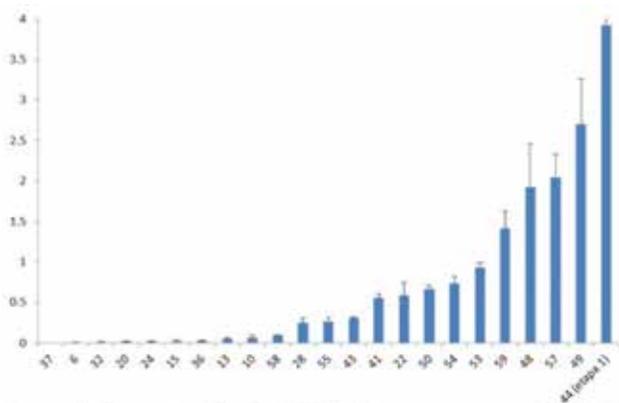


Figura 1. Concentración de ADN del hongo por gramo de hoja de plátano (peso fresco) en las muestras positivas a SN en hojas asintomáticas de banano.

Para el análisis de expresión se hizo la cuantificación relativa con curva estándar, empleando el ARN extraído del micelio del hongo. En cada muestra de banano asintomática positiva se evaluó la expresión de *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2* con respecto al control endógeno.

Las gráficas de la figura 2 exhiben variación en la expresión de *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2*, en la cual los perfiles de expresión no mostraron una correlación estricta con el incremento de biomasa de *M. fijiensis* en la muestra, pues aunque las muestras de banano se ordenaron según el contenido de *M. fijiensis*, las expresiones de *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2* no mostraron incremento constante ni tendencia a aumentar o disminuir de modo paulatino.

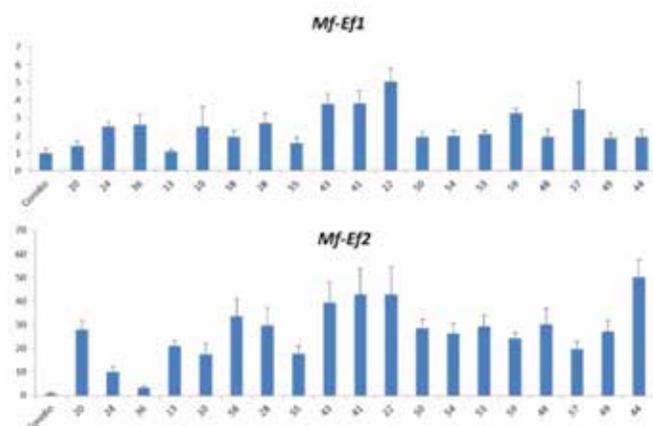


Figura 2. Expresión relativa de genes efectores *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2* utilizando células asexuales como calibradores.

Durante la biotrofia, en las primeras etapas de infección, el patógeno se halla de manera asintomática en el hospedante, probablemente a través de la supresión de la muerte celular programada (PCD), o bloqueando las respuestas de defensa del hospedante (Beveraggi *et al.*, 1995). La biomasa de *M. fijiensis* se incrementa en los espacios extracelulares (apoplástico). Los resultados de la elevada expresión de los genes evaluados durante la fase biotrófica en la Sigatoka negra sugieren un papel importante. No se conoce la función de todos los efectores (Stergiopoulos *et al.*, 2010).

Conclusiones

Mf-Ef1 y *Mf-Ef2* se expresan durante la fase biotrófica, sus perfiles de expresión no manifestaron una correlación perfecta con el incremento de biomasa de *M. fijiensis* en la muestra, lo que sugiere que no sigue una acumulación directamente vinculada con el aumento de la biomasa y sus funciones deben tener relación con determinados momentos.

Con base en los resultados se encontró que los genes efectores *Mf-Ef1* y *Mf-Ef2* del hongo patógeno *M. fijiensis* tienen una expresión durante la etapa biotrófica y de manera regulada con incrementos en algunas fases de la etapa, cuyo significado aún se desconoce.

Agradecimientos

Al FORDECyT (clave 446886) por el financiamiento del proyecto y la beca otorgada a I.A.G.

Referencias

- Arzanlou, M., Abeln, E., Kema, G., Waalwijk, C., Carlier, J., de Vries, I., Guzmán, M., Crous, P. (2005). Molecular diagnostics for the sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 97(9):1112-1118.
- Beveraggi, A., Mourichon, X., Sallé, G. (1995). Comparative study of the first stages of infection in sensitive and

resistant banana plants with *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*), responsible for black leaf streak disease. *Canadian Journal of Botany*, 73(9):1328-1337.

Ploetz, R. (2004). Enfermedades y plagas: un análisis de su importancia y manejo. *Infomusa*, 13(2):11-16.

Stergiopoulos, I., van den Burg, H.A., Ökmen, B., Beenen, H.G., van Liere, S., Kema, G.H., de Wit, P.J. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16):7640-7645.



Transferencia horizontal de una caleosina entre *Phaseolus vulgaris* y *Colletotrichum lindemuthianum*

Alejandra Alcalá-Ramírez | Erick Saúl Leandro-Pérez
| Lenin Sánchez-Calderón | Saúl Fraire-Velázquez | César Díaz-Pérez

Laboratorio de Biología Integrativa de Plantas y Microorganismos | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: cdp276@gmail.com

Resumen

Con el avance de los proyectos de secuenciación masiva se ha encontrado que existen eventos de transferencia horizontal de genes entre eucariotes, sobre todo entre aquellos que comparten nichos ecológicos. El patosistema *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Colletotrichum lindemuthianum* es importante desde el punto de vista económico en México, por lo que el estudio de la interacción entre esas dos especies ha sido abordado anteriormente. En tales investigaciones se percibió que ambas especies compartían un gen con una identidad de más del 90%, lo que sugiere un evento de transferencia de genes. Por su parte, en este trabajo se encontró que el gen pertenece a la superfamilia de las caleosinas; además, presenta un dominio conservado en dicha familia y cuenta con un segmento transmembranal, lo que concuerda con las proteínas de ese tipo. Asimismo, se verificó que se efectuó un evento de transferencia de genes de la planta de frijol al hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

Palabras clave: HGT, transferencia génica lateral, caleosina.

Introducción

La transferencia horizontal (o lateral) de genes (HGT) se define como el intercambio y la integración de material genético entre diferentes especies (Doolittle, 1999). Se pensaba que la HGT en eucariotes era limitada, sin embargo, con el rápido avance de los proyectos de secuenciación de eucariotas se ha notado un impacto mayor de la HGT en la evolución de los eucariotes (Fitzpatrick, 2012).

Debido al impacto económico que causan los hongos a los cultivos, más de 400 especies fúngicas han sido secuenciadas; ello permitió observar casos de HGT en Ascomicetos y en sistemas planta-hongo fitopatógeno, donde la HGT ha sido tanto del hongo hacia la planta como de la planta hacia el hongo (Richards *et al.*, 2009).

Las caleosinas también están presentes en cuerpos lipídicos de semillas de angiospermas, son responsables de dirigir a los cuerpos oleosos nacientes. Los genes que codifican para caleosina se localizan en algas y hongos (Jiang y Tzen, 2010).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las especies económicas más sobresalientes en México. Varios patógenos originan enfermedades en la planta, entre estos, *Colletotrichum lindemuthianum* como agente causal de la antracnosis, considerada como la principal causa de la baja productividad de frijol en América Latina (Gepts *et al.*, 2008).

En la respuesta de defensa temprana de plantas contra el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*, se encontró la sobreexpresión de una proteína de unión a calcio. Ese gen se manifiesta en ambos genomas (planta y hongo) (Alvarado-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo estudiar la proteína de unión a calcio, conocer la secuencia completa de la misma, y verificar en posible evento de HGT de ese gen entre frijol y *C. lindemuthianum*.

Metodología

Amplificación de los genes de caleosina

Las cepas de *C. lindemuthianum* fueron cultivadas en medio Harina de Maíz-Agar. *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* fueron cultivados en medio PDA. La extracción del DNA genómico se hizo con el método NTES. Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes caleosina fueron: 5'-AGGCAAACATGGAAGTGACA-3' y 5'-TGGGAAATACAAGAATGATGAAG-3'.

3'. Se corrieron 35 ciclos (94°C por 1 minuto, 56°C por 45 segundos y 72°C por un minuto).

Análisis bioinformáticos

Se efectuaron búsquedas de dominios en el programa CDD del NCBI. La búsqueda de marcos de lectura abiertos se hizo con GENESCAN (Burge y Karlin, 1997), el análisis de segmentos transmembranales (STM) se hizo con el programa Toppred2.

Filogenia molecular de la familia de caleosinas

Se indagó la secuencia del completa del gen de caleosina en el ensamblado del genoma de frijol, se usó el fragmento de la secuencia reportado (AAZ23153). Para obtener las secuencias para construir la filogenia, la secuencia del gen se tradujo y se empleó para hacer una búsqueda con blastp. Las secuencias se descargaron, catalogaron y depuraron. Se alineó el grupo final con ayuda de clustalw 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) y se realizó una corrección del alineamiento a mano. Para reconstruir la filogenia se utilizó el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2014) con el método de ML (Maximum Likelihood). Como prueba estadística se efectuó análisis Bootstrap de 1000 repeticiones para cada árbol.

Resultados y discusión

Se reportó la existencia de un gen similar a calmodulina en frijol y en el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* (Alvarado-Gutiérrez *et al.*, 2008). Los genes reportados tienen más del 90% de identidad entre ellos, por lo que es factible que se haya dado un evento de HGT entre esos dos organismos eucariotas.

Para hallar más información sobre aquel gen se hizo una búsqueda de dominios conservados en el servidor CDD del NCBI, se obtuvo que el gen tiene un dominio de la superfamilia de las caleosinas (número de acceso cl40635). Por lo anterior, el gen se nombró como caleosina en lugar de calmodulina.

Las caleosinas han sido recientemente descritas como una clase de proteínas de unión a calcio presentes en plantas y hongos que se unen a cuerpos lipídicos y al retículo endoplasmático (RE). En *Brassica napus* la isoforma 25-kDa se ubica sólo en tejidos como embriones en desarrollo y cotiledones, que contienen cuerpos de lípidos de almacenamiento. En contraste, la isoforma 27-kDa de unión al RE se sitúa en raíces, tallos y hojas.

La relativa abundancia y la localización de caleosinas en RE y en cuerpos lipídicos posiblemente tienen un rol en el tráfico membrana/lípidos (Hernández-Pinzón *et al.*, 2004). Recientemente se ha notado que las caleosinas también se expresan en respuesta a patógenos y estrés (Partridge y Murphy, 2009; Feng *et al.*, 2011), lo que concuerda con lo advertido para la caleosina de frijol (Alvarado-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Para observar si ese gen se encuentra en otras variedades de *C. lindemuthianum* se llevó a cabo una reacción de PCR diseñando oligos para la secuencia reportada de la caleosina de *C. lindemuthianum* (número de acceso EU045571), en las diferentes cepas de hongos fitopatógenos. Hubo amplificación de este gen en distintas cepas de *C. lindemuthianum*, pero no se vio amplificación en *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* ni en *Rhizoctonia solani* (figura 4); ello

sugiere que la transferencia sólo se ha dado en *C. lindemuthianum*.

Se tuvo acceso a los supercontigs del genoma ensamblado de frijol a fin de conseguir la secuencia del gen de caleosina en frijol. Se obtuvo una secuencia con parecido a la caleosina, la cual se extrajo de la base de datos más 5 Kb en ambos sentidos para averiguar el gen completo. Se buscaron los marcos de lectura abiertos en esa secuencia; se halló un solo marco de lectura de 205 aa, que tiene 100% de identidad con el fragmento (35 aa) de la secuencia traducida de la caleosina de frijol, por lo que se concluye que ese es el gen completo.

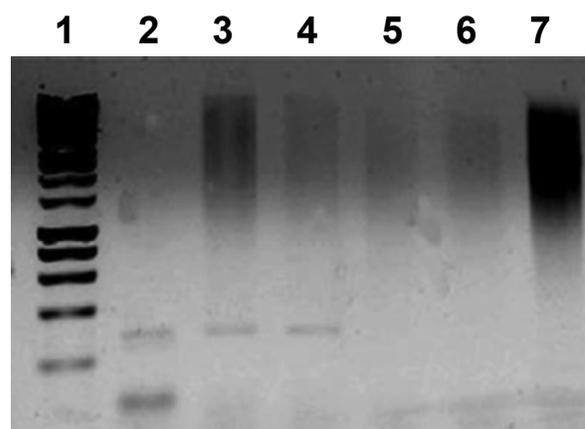


Figura 4. Amplificación del gen de caleosina en diferentes cepas de *C. lindemuthianum*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) *C. lindemuthianum* cepa 2. 3) *C. lindemuthianum* cepa 448. 4) *C. lindemuthianum* cepa 1472. 5) *Fusarium oxysporum*. 6) *Fusarium solani*. 7) *Rhizoctonia solani*.

Las caleosinas son proteínas asociadas a membrana, por lo que se buscaron STM a la caleosina de frijol; se encontró un posible STM, que sugiere la localización en membrana de esa caleosina. Para probar que exista una HGT entre los genes de *C. lindemuthianum* y frijol, se procedió a reconstruir la filogenia de la superfamilia de caleosinas. Se obtuvieron 226 proteínas de esa familia con base en una búsqueda por similitud, se usó como plantilla la proteína completa de frijol.

La superfamilia de caleosinas tiene miembros en plantas, hongos y una bacteria; se distribuye en

cuatro grupos. Los grupos I, II y III agrupan proteínas de plantas principalmente; el grupo IV está formado por caleosinas de hongos (figura 2A). La caleosina de *C. lindemuthianum* se sitúa en el grupo I, junto a la caleosina de frijol en un grupo compuesto exclusivamente por proteína de plantas (figura 2B), ello confirma el evento de HGT de planta a hongo patógeno.

Hace poco fue reportado un evento similar de HGT donde el gen de una subtilisina se transfirió entre *C. gloeosporioides* y maíz (Jaramillo *et al.*, 2013), lo que sugiere que el intercambio de genes entre plantas y especies de *Colletotrichum* no es raro.

Conclusiones

Se obtuvo la secuencia completa de un gen que codifica para una caleosina, la cual fue transferida desde el frijol (*P. vulgaris*) a *C. lindemuthianum*.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con fondos de los proyectos Conacyt-Fordecyt-Doctores No. 174509, Promep/103.5/13/6977, Promep-Red de Cuerpos Académicos Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable.

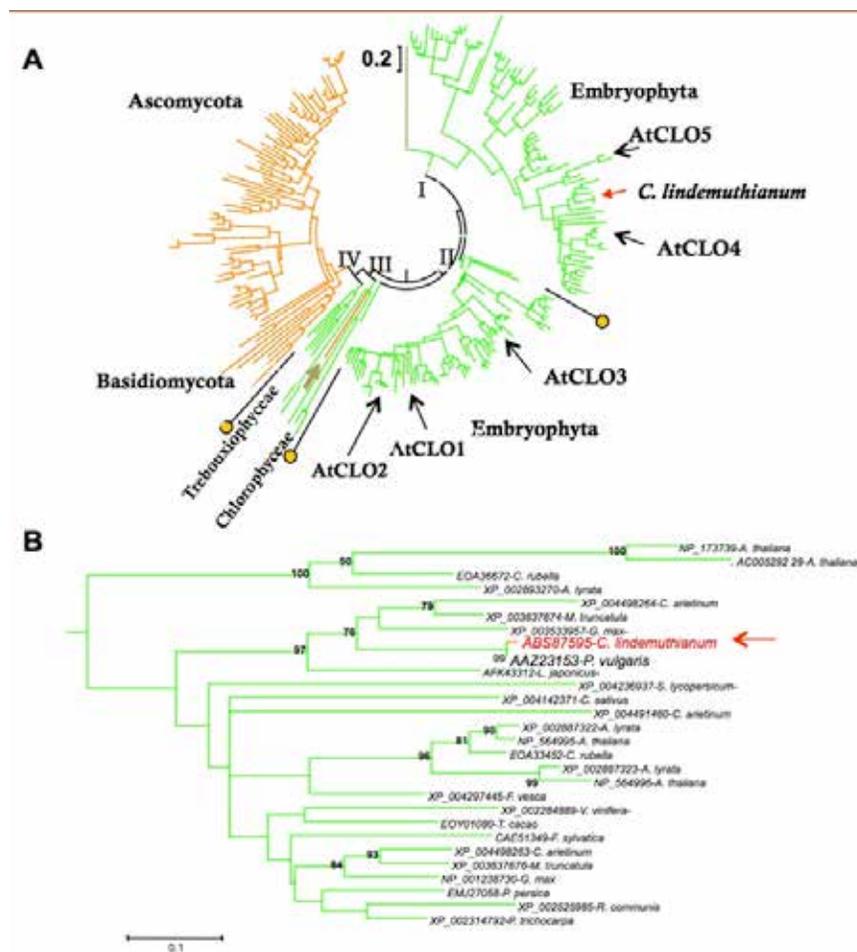


Figura 2. Árbol filogenético de la familia de las caleosinas. a) La familia de las caleosinas se dividen en cuatro grupos. Las flechas señalan secuencias de hongos en grupos donde predominan proteínas de plantas. b) Rama del grupo I donde se ubican las caleosinas de *P. vulgaris* y *C. lindemuthianum* (flecha roja).

Referencias

- Alvarado-Gutiérrez, A., Del Real-Monroy, M., Rodríguez-Guerra, R., Almanza-Sánchez, L., Lozoya-Gloria, E., Fraire-Velázquez, S. (2008). A Phaseolus vulgaris EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against Colletotrichum lindemuthianum and by abiotic stress: Sequences shared between interacting partners. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6):111-121.
- Burge, C., Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology*, 268(1):78-94.
- Doolittle, W.F. (1999). Lateral genomics. *Trends in Cell Biology*, 9(12):M5-M8.
- Feng, H., Wang, X., Sun, Y., Wang, X., Chen, X., Guo, J., Duan, Y., Huang, L., Kang, Z. (2011). Cloning and characterization of a calcium binding EF-hand protein gene TaCab1 from wheat and its expression in response to *Puccinia striiformis f. sp. tritici* and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 38(6):3857-3866
- Fitzpatrick, D.A. (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 329:1-8.
- Gepts, P., Aragão, F.J., de Barros, E., Blair, M.W., Brondani, R., Broughton, W., Galasso, I., Hernández, G., Kami, J., Lariguet, P. (2008). Genomics of Phaseolus beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*, (1)113-143.
- Hernandez-Pinzon, I., Patel, K., Murphy, D.J. (2004). The Brassica napus calcium-binding protein, caleosin, has distinct endoplasmic reticulum-and lipid body-associated isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(7-8):615-622.
- Jaramillo, V.D.A., Vargas, W.A., Sukno, S.A., Thon, M.R. (2013). Horizontal transfer of a subtilisin gene from plants into an ancestor of the plant pathogenic fungal genus Colletotrichum. *PloS one*, 8(3):e59078.
- Jiang, P.L., Tzen, J.T. (2010). Caleosin serves as the major structural protein as efficient as oleosin on the surface of seed oil bodies. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4):447-449.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948.
- Partridge M., Murphy, D. (2009). Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant physiology and biochemistry*, 47(9):796-806.
- Richards T.A., Soanes, D.M., Foster, P.G., Leonard, G., Thornton, C.R., Talbot, N.J. (2009). Phylogenomic analysis demonstrates a pattern of rare and ancient horizontal gene transfer between plants and fungi. *The Plant Cell Online*, 21(7):1897-1911.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):273.



Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal andinas sobre el crecimiento de plántulas de lechuga bajo condiciones industriales

Alexandra Stoll

Centro de Estudios de Zonas Áridas Ceaza

Víctor Olalde

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN | CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS

Jaime Bravo

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE PÉNJAMO

correo-e: jaime.patricio@uppenjamo.edu.mx

Resumen

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) pueden utilizarse para fortalecer el crecimiento sustentable de las plantas. En el presente trabajo se seleccionaron 200 aislados obtenidos de pastos andinos de las zonas áridas de la cordillera de los Andes y de agroecosistemas del norte de Chile. Los aislados mostraron gran capacidad de solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno, producir fitohormonas y sideróforos. Además, potenciaron significativamente el desarrollo de plántulas de lechuga variedad *desert storm* (escarola), respecto a su altura (45%), peso fresco (30%), longitud radicular (35%) y contenido de clorofila (lecturas de un 50% más de OD) a menores dosis de fertilización (33%). Los resultados obtenidos sugieren que las BPCV identificadas pueden emplearse para la producción de plántulas de lechuga, bajo condiciones de invernadero, con fertirriego automatizado.

Palabras clave: biofertilizantes, solubilizadora de fosfato, fijadores de nitrógeno.

Introducción

Las bacterias benéficas que promueven el crecimiento de las plantas (BPCV) ejercen su efecto mediante mecanismos directos e indirectos (Figueiredo *et al.*, 2010). Un mecanismo indirecto involucra biodisponer nutrimentos básicos que la planta necesita para fortalecer su crecimiento y desarrollo.

En ese contexto, BPCV capaces de producir ácidos orgánicos funcionales para disponer el fosfato retenido en suelos calcáreos o alcalinos y aquellas BPCV fijadoras de nitrógeno (BNF), constituyen una opción eco-amigable para el diseño de insumos agrícolas multifuncionales.

De igual modo, se seleccionó y caracterizó un grupo de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), provenientes de la rizósfera de la planta nativa *Jarava frigida*, que forma parte de los pajonales altoandinos más desérticos de sudamérica y algunos fijadores de nitrógeno provenientes de terrenos agrícolas localizados en la zona de Pan de azúcar, IV Región de Coquimbo, Chile.

Finalmente, se evaluó la funcionalidad de inóculos BPCV simples y mixtos sobre cultivos de hortalizas bajo condiciones de producción industrial automatizada. Esta es la primera vez que se demuestra el efecto positivo que las bacterias nativas andinas ejercen en cultivos de interés agronómico.

Metodología

Aislamiento de BSF, BNF y evaluación de características bioquímicas básicas

15 gr de la rizósfera proveniente de *Jarava frigida* fueron utilizados para realizar siembras seriadas en medios PVK (Pikovskaya, 1948). Bacterias prometedoras con capacidad solubilizante (BSF) *in vitro* fueron seleccionadas de acuerdo con la fórmula semicuantitativa: $E = \frac{\text{diámetro de halo}}{\text{diámetro de colonia}} \times 100$ (Nguyen *et al.*, 1992).

Todos los aislados con razones mayores a 220 fueron seleccionados.

Bacterias fijadoras de nitrógeno fueron seleccionadas en medios NFB. Parámetros bioquímicos para determinar la producción de IAA, ACC deaminasa, fosfatasas alcalinas y ácidas y la producción de sideróforos se realizaron según protocolos previos y la estandarización por nuestro grupo.

Evaluación bajo condiciones industriales

Semillas de lechuga variedad *desert storm* (escarola) fueron previamente germinadas conforme a las condiciones del productor. Las plántulas fueron inoculadas a nivel raíz con los aislados BN0024, BNF039 y una combinación de BN0035+BNF039 crecidas a 10^5 /UFC.

Se evaluó el crecimiento bajo las condiciones productivas, aplicando tres niveles de fertirriego automatizado al 0%, 33% y 100% de dos a tres veces por día. Los parámetros examinados fueron: peso fresco, longitud radicular, altura y contenido de clorofila para un total de 500 plántulas por cada tratamiento.

Análisis estadísticos

Los datos experimentales fueron analizados con la prueba Turkey, ANOVA ($P < 0.05$) y paquetes estadísticos para software gráficos, XLSTAT y Sigma Plot.

Resultados y discusión

Se obtuvo un total de 200 aislados provenientes de pastos andinos y agroecosistemas del extremo norte de Chile. Análisis bioquímicos sugieren que los aislados BN0024, BN0035 y BNF039 fueron identificadas como dos cepas altamente solubilizadoras de fosfatos y un fijador de nitrógeno, respectivamente. Los tres aislados mostraron ser gram positivos, no expusieron actividad de ACC deaminasa y sólo el aislado BNF039 manifestó actividad de fosfatasa

alcalina y ácida, así como una fuerte actividad de sideróforos.

Es conocido que los fosfatos de calcio, incluyendo rocas minerales de fosfato (fluorapatita, francolita), son insolubles y no soportan las tasas necesarias para sostener los niveles agronómicos exigidos en los cultivos (Goldstein, 2000).

A nivel rizosférico y en suelos calcáreos, algunos BSF son capaces de generar ácidos carboxílicos que son liberados al medio ambiente e inducen una acidificación zonal del suelo (5). Como consecuencia, se capturan a alta afinidad las moléculas de calcio, liberando al fósforo retenido y haciéndolo más bio-disponible para las plantas (Fankem *et al.*, 2006). Ello proyecta a este tipo de microorganismos como una opción viable para potenciar la producción de los cultivos.

Asimismo, en ese estudio los tres aislados evaluados evidenciaron una producción de IAA de 20.4, 27.1 y 21.9 mg/L, respectivamente (cuadro 4). Es ampliamente conocido que IAA puede inducir crecimiento y desarrollo de los pelos radiculares y raíces secundarias, fortaleciendo la toma de nutrientes y la productividad vegetal.

En *Azospirillum*, el paso limitante en la producción de IAA dependiente de triptófano es catalizado por el gen *ipdC*, que codifica a una IPA descarboxilasa (Lambrecht *et al.*, 2000), ello indica la presencia de ese gen en nuestros aislados (dato no mostrado).

Los resultados indican que las plántulas de lechuga variedad *desert storm* inoculadas con los tres tratamientos, y crecidos bajo condiciones industriales, son potenciados significativamente en el peso fresco y longitud radicular respecto de su control (figura 4); esto sugiere un mejor establecimiento en campo.

Cuadro 4
Caracterización bioquímica básica
de los aislados bajo estudio

ID aislado	Reacción Gram		IAA mg/L	Fosfatasa		Sideróforos	Fijación de N	Fosfato solubilizado
	+	-		Alcalina	Ácida			
BN0024	+	-	20,4	-	-	-	+	++
BN0035	+	-	27,1	-	-	-	+	++
BNF039	+	-	21,9	+	+	++	++	+

Dicha estimulación permite aminorar las dosis de fertilización hasta en un 33% al comparar con plantas no inoculadas y fertilizadas al mismo nivel. El tratamiento B3 fue el más eficiente en plantas no fertilizadas y fertilizadas al 33%, respectivamente, lo cual señala un efecto sinérgico entre ambos aislados.

Este hecho es consistente con resultados publicados que demuestran que las BPCV son más efectivas cuando se agregan en combinación con fertilizantes, lo que potencia la floración, el peso de semillas, la elongación de tallos, el peso fresco del fruto o el tamaño de las hojas (Kumar *et al.*, 2009); y con el efecto positivo que algunos microorganismos ejercen sobre el maíz, al disminuir las concentraciones de fertilizantes inorgánicos fosfatados y nitrogenados a dosis de 50 y 100 kg por hectárea, respectivamente (Sarajuoghi *et al.*, 2012).

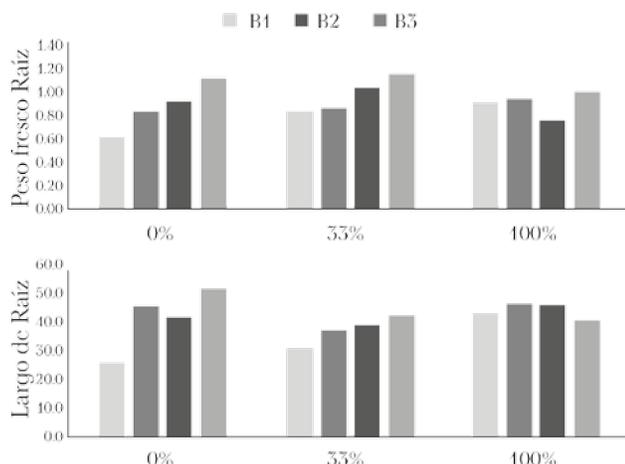


Figura 1. Evaluación de los aislados sobre el peso fresco (gr) y longitud radicular (cm). Las barras ■ y ■ representan el control sin inocular, tratamiento B1 y tratamiento B3, respectivamente. La barra ■ representa el tratamiento B2. los porcentajes 0%, 33% y 100% presentan los niveles de fertilización. Los cálculos se realizaron a los 20 días de crecimiento.

Los resultados mostrados están en sintonía con la estimulación que las bacterias del género *Azospirillum* (bajo condiciones de invernadero) ejercen sobre plantas de lechuga, al potenciar su biomasa, número de hojas, tamaño y peso seco (Chamangasht *et al.*, 2012) y la estimulación existente sobre plantas de tomate donde se ven favorecidas las métricas del crecimiento radicular, ancho de tallo y longitud del internodo (Ibiente *et al.*, 2012).

Se ha probado también que en hortalizas las BPGV del tipo *Bacillus* potencian no sólo el crecimiento de las plantas si no también la calidad del fruto (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007). Además, se evaluó la altura y el contenido de clorofila en plantas inoculadas y no inoculadas con los tres tratamientos y se demostró que existe un efecto potenciador significativo (figura 2).

Los tratamientos B1, B2 y B3 resultaron ser eficientes para potenciar la altura de la plántula bajo condiciones de fertilización al 0% y 33%. A la vez fortalecen el contenido de la clorofila a dosis del 0%, 33% y 100% de fertilización respecto de su control, lo que sugiere una estimulación fisiológica en las plantas inoculadas.

Conclusiones

Las BPCV aisladas desde pastos nativos andinos y desde agroecosistemas del extremo norte de Chile revelaron ser eficientes en promover el crecimiento y desarrollo de las plántulas de lechuga bajo condiciones de producción automatizada. Los tratamientos permitieron generar plántulas más rápido a menores dosis de fertilización (33%) durante el periodo de permanencia en el almácigo.

Tal hecho sugiere que las BPCV pueden ser adaptadas a instalaciones automatizadas y ser utilizadas para potenciar el crecimiento de los cultivos bajo escenarios climáticos exigentes. Futuros análisis bioquímicos y moleculares son necesarios para comprender el lenguaje integral existente entre las plantas y los BPCV, a fin de mejorar la actividad de los mismos y optimizar el crecimiento de las plantas bajo escenarios climáticos de aridez.

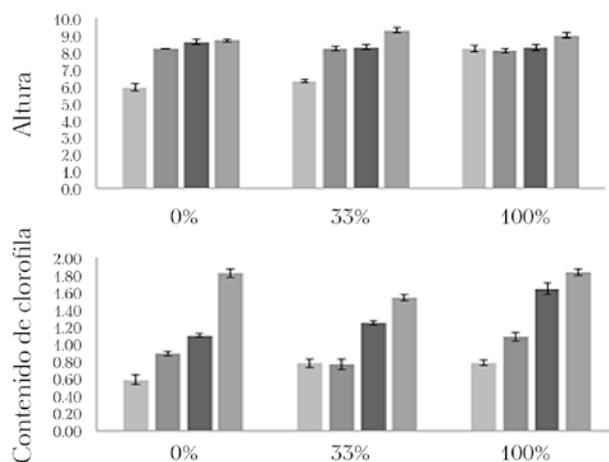


Figura 2. Efecto de los BPCV sobre la altura (cm) y el contenido de clorofila (OD) de plantas de lechuga a los 20 días de crecimiento.

Agradecimientos

Al Fondo de Innovación para la Competitividad Proyecto BIP-30127532, del Gobierno de Chile. A Stefani Maldonado y a Andrés Rodríguez por la asistencia técnica en la caracterización de los aislados y el seguimiento industrial.

Referencias

- Chamangasht, S., Ardakani, M.R., Khavazi, K., Abbaszadeh, B., Mafakheri, S. (2012). Improving Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Growth and Yield by the Application of Biofertilizers. *Annals of Biological Research*, 3(4):4876-79.
- Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., Etoa, F.X. (2006). Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 5(24):2450-60.
- Figueiredo, M.V.B., Seldin, L., do de Araujo, F.F., Mariano, R.L.R. (2010). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. doi: 10.1007/978-3-642-13612.2.2.
- Goldstein, A.H. (2000). Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. In Proceedings of the *4th International Fertilizer Association Technical Conference*. IFA, Paris.
- Ibiene, A.A., Agogbua, J.U., Okonko, I.O., Nwachi, G.N. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicon esculentum*. *Journal of American Science*, 8(2):318-24.
- Kumar, K.V., Srivastava, S., Singh, N., Behl, H.M. (2009). Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *Journal of Hazardous Materials*, 170(4):54-7.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande, Broek, A., Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 8: 298-300.
- Mena-Violante, H.G., Olalde-Portugal, V. (2007) Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB. *Scientia Horticulturae*, 113:103-06.
- Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F., Lapayrie, F. (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccariabicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant and Soil*, 143:193-99.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17:362-70.
- Sarajuoghi, M., Reza, M.A., Nurmohammadi, Kashani, A., Rejali, F., Mafakheri, S. (2012). Response of Yield and Yield Components of Maize (*Zea mays* L.) to Different Biofertilizers and Chemical Fertilizers. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(3):315-20.



Diversidad, actividad fúngica y detección de genes biosintéticos en estreptomicetos aislados de suelo agrícola

Hugo Galindo-Flores

Departamento de Ingeniería y Tecnología | UNIVERSIDAD DE OCCIDENTE

Melina López-Meyer, Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza

Departamento de Biotecnología Agrícola | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Luis Ángel Maldonado

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología | UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Erika Teresa Quintana

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

correo-e: hugo.galindo@udo.mx

Resumen

Las bacterias del Genero *Streptomyces* están ampliamente distribuidas en todos los ecosistemas, es por ello que juegan un papel ecológico trascendental. El aislamiento de esos microorganismos ha sido enfocado para entender su diversidad y sobre todo para encontrar nuevas biomoléculas. En México son pocas las investigaciones orientadas a la distribución y la diversidad de tales bacterias. El objetivo del presente estudio fue analizar la diversidad de 45 especies confirmadas como estreptomicetos aislados de suelos agrícolas, seguido de la evaluación de capacidad antagónica contra dos patógenos de cultivos agrícolas *Sclerotinia sclerotiorum* y *Macrophomina* sp, y finalmente detectar rutas biosintéticas para biomoléculas relacionadas con la síntesis de antibióticos. Se obtuvieron catorce grupos filogenéticos a partir de la técnica de BOX-PCR. Se detectaron genes biosintéticos PKS I, PKS II y NRPS en todos los grupos. Un 40% de los aislados mostraron actividad antagónica contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Macrophomina* sp.

Palabras clave: estreptomicetos, genes biosintéticos, BOX-PCR, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Introducción

Los estreptomicetos son organismos que habitan ambientes muy diversos, donde juegan un papel ecológico importante como reguladores de comunidades microbianas. En programas de búsqueda de nuevos fármacos los estreptomicetos de suelo son los principales organismos que se aíslan y se caracterizan por su capacidad de síntesis de una gran diversidad de metabolitos secundarios.

Algunos estreptomicetos se han estudiado con detalle; sin embargo, en México no existen estudios con una perspectiva global de diversidad, distribución y ecología de estreptomicetos (Quintana *et al.*, 2013; Evangelista-Martínez, 2014; Becerril-Espinosa *et al.*, 2012). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la diversidad y el potencial biotecnológico de estreptomicetos aislados de suelos agrícolas.

Metodología

200 aislados bacterianos de mezclas mixtas de suelos agrícolas fueron aislados a partir de su caracterización morfológica agrupados como estreptomicetos, y luego confirmados mediante oligos género-específicos (González *et al.*, 2005). Se partió del ADN de 36 de los aislados confirmados como estreptomicetos y se recurrió a la técnica de huella molecular BOX-PCR para evaluar la diversidad entre los aislados (Maldonado *et al.*, 2008).

Se llevó a cabo un escrutinio para evaluar el potencial biotecnológico; se recurrió a la detección de regiones conservadas de genes que codifican para proteínas denominadas poliquetidos (PKS) sintasas, que ensamblan metabolitos secundarios (Monciardini *et al.*, 2002). Se hicieron bioensayos *in vitro* de los aislados contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Macrophomina sp.*, dos patógenos de importancia comercial en la región.

Resultados y discusión

170 de los 200 aislados (85%) fueron confirmados como estreptomicetos, lo que corrobora la eficiencia del método de aislamiento y caracterización morfológica. Del ADN de los aislados corroborados como estreptomicetos en el paso anterior, se hizo otra reacción de PCR utilizando el oligo BOX-A1R; lo anterior, a fin de obtener un patrón de bandeo que permite efectuar el análisis de huella genética de cada uno de los aislados, así como encontrar la similitud que existe entre ellos.

Con los patrones de bandeo obtenidos en BOX-PCR se procedió al análisis de similitud. A un 80% de similitud se pudieron agrupar 14 grupos de los aislados a partir del patrón de bandeo que presentan, lo que indica que los aislados son diversos entre ellos. Al realizar el análisis de los resultados de BOX-PCR junto con la detección de genes biosintéticos se hallaron desemejanzas en cuanto al número de genes que tiene cada aislado; ello indica una alta heterogeneidad genética entre los grupos de los estreptomicetos aislados.

En el escrutinio de genes biosintéticos se obtuvieron distintos perfiles de amplificación entre los aislados para los genes modulares poliquetido sintasa I (PKS I), poliquetido sintasa II (PKS II) y una sintasa de péptidos no ribosomales (NRPS); eso sugiere que los aislados cuentan en su genoma con la maquinaria necesaria para la síntesis de metabolitos secundarios de interés biotecnológico.

En los bioensayos *in vitro*, 40% de los aislados mostró diferente nivel de inhibición del crecimiento de los patógenos, pero no necesariamente el que tuvo mayor detección de genes biosintéticos fue quien evidenció mayor inhibición; lo que quizá se deba a que sólo se está retando a los aislados contra dos patógenos, y que la naturaleza bioquímica de los metabolitos secundarios puede no ser efectiva para tales patógenos. Además, únicamente se probó una condición de crecimiento, en la cual es posible que no se expresen los genes que

codifican para las enzimas que ensamblan dichos metabolitos.

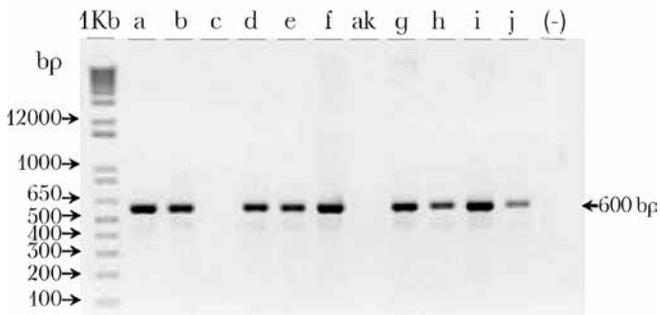


Figura 1. Amplicones obtenidos con oligos Sm6F/Sm5R específicos para estreptomicetos. Carriles a-j, aislados; carril 1Kb, marcador de peso molecular; carril (-), control negativo.

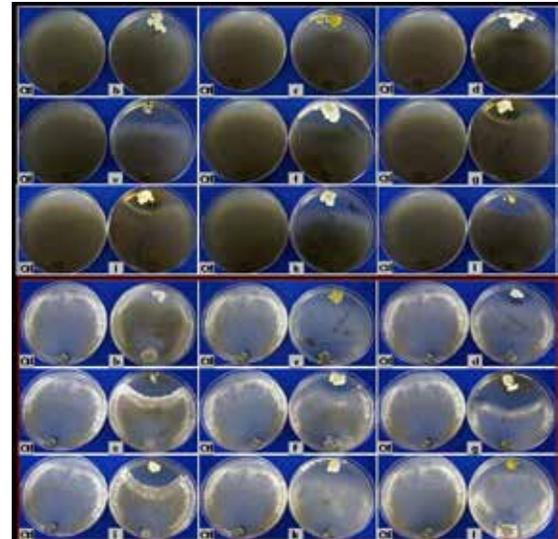


Figura 3. Bioensayo para determinar actividad antifúngica *in vitro* de los aislados. A, contra *Macrophomina sp.* y B, contra *Sclerotinia sclerotiorum*. (b-l, aislados; Ctl, control).

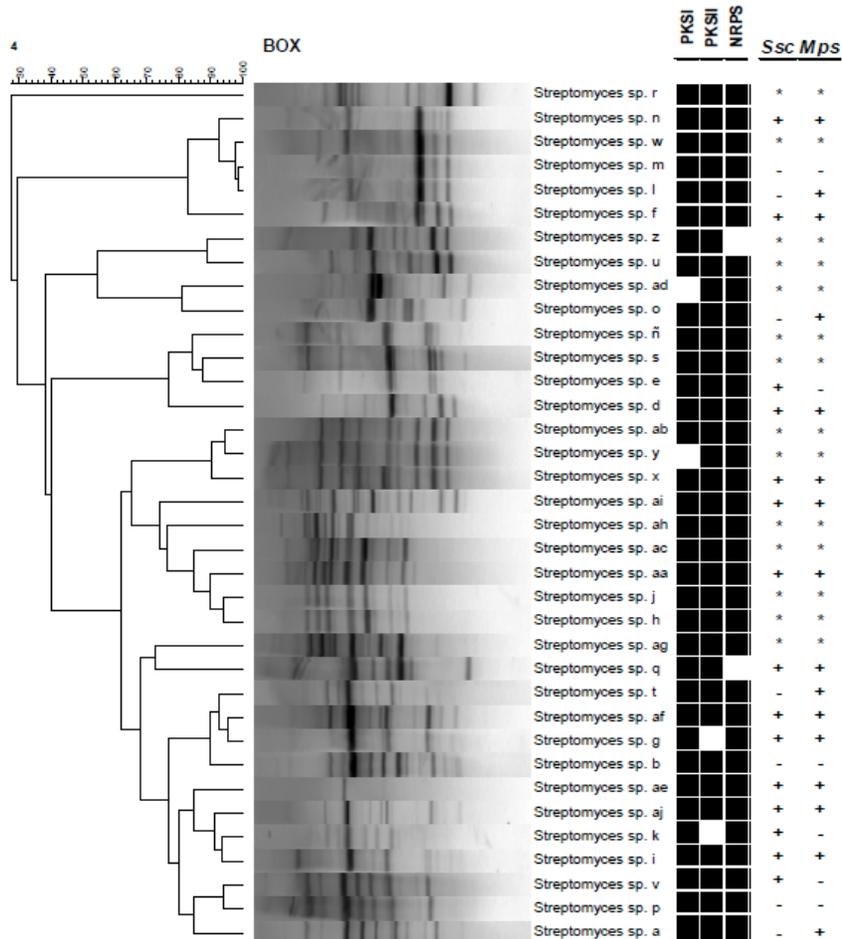


Figura 2. Dendrograma de similitud con BOX-PCR, detección de genes biosintéticos (PKS I, PKS II y NRPS) y actividad antifúngica ((+), (-) sin actividad, (*) los aislados no crecieron en el medio usado para el bioensayo)).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que el suelo constituye un reservorio natural de estreptomicetos desconocidos, que pueden ser objeto de estudio y evaluación en escrutinio para productos naturales aún desconocidos. Por lo anterior, es indispensable conocer su diversidad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Conacyt proyecto CO-J50021-Z y COFAA-IPN proyecto PIFI-SEP 2013.

Referencias

- Becerril-Espinosa, A., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N., Soria-Mercado, I.E. (2012). Antitumor activity of actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(2):317-325.
- Evangelista-Martínez, Z. (2014). Isolation and characterization of soil Streptomyces species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5):1639-1647.
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(3):401-445.
- Maldonado, L., Stach, J., Ward, A., Bull, A., Goodfellow, M. (2008). Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(2):289-298.
- Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., Donadio, S. (2002). New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3):419-429.
- Quintana, E.T., Badillo, R.F., Maldonado, L.A. (2013). Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a Mexican extremophile environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(1):63-70.



Identificación de enzimas β -fructosidasas en *Lactobacillus casei*

Norma Angélica Gaytán-Saldaña | Edgar León Esparza-Ibarra

Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Juan Alberto Osuna-Castro

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

correo-e: gaytanangelica1@gmail.com

Resumen

Los fructanos, polímeros de fructosa, comprenden una excelente fuente para la obtención de fructooligosacáridos (FOS), donde la hidrólisis enzimática parcial resulta ser un proceso ventajoso. El aislamiento de cepas con capacidad para sintetizar enzimas β -fructosidasas para la adquisición de FOS ofrece aportaciones para investigaciones futuras en el contexto de los prebióticos y probióticos. En este estudio a partir de la savia de *Agave* sp. denominada aguamiel, se aisló *Lactobacillus casei* con actividad de β -fructosidasa. La síntesis de enzimas β -fructosidasas de *L. casei* se indujo en medio con fructanos de agave como única fuente de carbono. El extracto proteínico extracelular mostró un halo de actividad enzimática en zimogramas co-polimerizado con inulina; se determinaron por electroforesis desnaturizante dos proteínas con un peso molecular estimado de 105 y 116 kDa.

Palabras clave: agave, aguamiel, electroforesis SDS-PAGE, fructanos.

Introducción

Los fructanos son polímeros de fructosa sintetizados a partir de una molécula de sacarosa (Chalmers, 2005), a la cual las unidades de fructosa se unen adyacentemente mediante enlaces β -fructosil-fructosa. En el reino vegetal se encuentran en el 15% de las angiospermas. En agaves, los fructanos constituyen el 60% del peso seco (Mancilla-Margalli y López, 2006); se emplean para la elaboración de bebidas (tequila, mezcal, bacanora y pulque).

Los FOS son fructanos considerados como prebióticos con propiedades benéficas para el humano; son sintetizados a partir de sacarosa a través de enzimas fructosiltransferasas y/o por la hidrólisis enzimática parcial de fructanos. Las enzimas que hidrolizan los enlaces β -fructosil-fructosa son las β -fructosidasas.

El aislamiento de *Lactobacillus* se ha reportado en gramíneas (Müller y Lier, 1994) y en fermentos de *Agave salmiana* (Escalante-Minakata, 2008). La presencia de *Lactobacillus* en gramíneas y bebidas ricas en fructanos indica que las bacterias asimilan fructanos mediante la producción de enzimas que degradan los polisacáridos a sus monosacáridos constituyentes. La búsqueda de *Lactobacillus spp.* en aguamiel de *Agave sp.* con actividad hidrolítica sobre fructanos fue el propósito de este estudio.

Metodología

Una alícuota de aguamiel se diluyó en caldo MRS (Difco-USA) y se incubó a 45°C (Jaramillo, 2010). Enseguida se realizaron diluciones en caldo MRS y se sembraron en placas con MRS-agar. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones aeróbicas y anaeróbicas durante 24-72 h. Fueron seleccionadas las colonias con morfología colonial correspondiente a *Lactobacillus spp.*

Determinación fenotípica y bioquímica

Las cepas fueron determinadas según los criterios de MacFaddin (2003) y el *Manual Bergey* (Garrity *et al.*, 2005) para establecer bacterias ácido lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*.

Determinación de actividad

β -fructosidasa. Las cepas seleccionadas se evaluaron con base en su capacidad de fermentar fructanos, siguiendo la metodología de oxidación o fermentación de la glucosa de McFaddin (2003). Se clasificaron cuatro grupos de acuerdo con el carbohidrato empleado: grupo G (glucosa), FA (fructanos de agave), I (inulina de achicoria) y C (control).

Determinación molecular mediante amplificación y secuenciación del gen 16S DNAr

El ADN genómico de las cepas con capacidad de β -fructosidasa fue aislado con el método de Petrick *et al.* (1988). La región 16S DNAr se amplificó utilizando primers universales reportados por Liu *et al.* (2012), el amplicon se envió a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos Langebio del CINVESTAV Unidad Irapuato, Guanajuato. Se precisó la especie al comparar la secuencia del 16S DNAr obtenida con las secuencias disponibles en el GenBank.

Identificación de la actividad de β -fructosidasa

La cepa seleccionada se inoculó en medio de cultivo líquido (medio MRS sin la adición de glucosa) con fructanos de agave y/o inulina al 2% (ρ/v) e incubado a 37°C durante 48 h. Las proteínas secretadas al medio se recuperaron por centrifugación, se concentraron con la metodología diálisis-congelación-centrifugación de Virgen *et al.* (2012).

La actividad de β -fructosidasa se identificó mediante SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970) y en geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizado con inulina de achicoria al 2% (p/v). Los extractos se disolvieron en buffer de muestra en condiciones no reductoras, y se sometieron a electroforesis a 60 V.

El SDS-PAGE fue teñido con azul de Coomassie, mientras que el gel co-polimerizado con inulina fue teñido con el sistema ácido periódico-Schiff (PAS-Sigma Aldrich). Como control positivo se usó inulinasa comercial *Frucozyme L* (Sigma) de *Aspergillus niger*.

Resultados y discusión

Aislamiento, selección y determinación fenotípica y bioquímica

Se formó un banco total de seis cepas aisladas sobre medio MRS, a partir de aguamiel tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Las cepas tuvieron características del género *Lactobacillus*, según su morfología celular en forma bacilar, su tinción Gram positiva, su capacidad de crecer en ausencia de O_2 , y carencia de endosporas.

Determinación de la actividad de β -fructosidasa

La fermentación de los carbohidratos ensayados produjo la formación de productos ácidos, revelado por el vire de color violeta a amarillo del indicador de pH contenido en el medio. De las seis cepas, la cepa Am3 fermentó glucosa (como se esperaba), fructanos de agave y fructanos de inulina. Este perfil fermentativo Am3 coincide con los resultados de Makras *et al.* (2005), donde *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* fermentó FOS e inulina a ácido láctico y otros metabolitos.

La cepa Am3 al fermentar dichos carbohidratos generó un cambio de color visible en el medio, lo que sugiere que la cepa Am3 asimila fructanos

de agave e inulina a través de la producción de enzimas con actividad β -fructosidasa. *Determinación molecular.* El alineamiento de la secuencia obtenida correspondiente al gen 16S del DNAr, demostró que la cepa Am3 presentó un 100% de identidad con la secuencia del gen 16S del DNAr de *Lactobacillus casei*.



Figura 1. Fermentación de glucosa (G), inulina (I) y fructanos de agave (FA) de la cepa Am3. Control (C).

Identificación de la actividad β -fructosidasa

El extracto de proteínas extracelular inducido con fructanos de agave generó un halo de digestión (figura 2B, carril 2). No obstante, los extractos extracelulares inducidos por glucosa o inulina no exhibieron actividad enzimática sobre el gel co-polimerizado con inulina (figura 2B).

El patrón electroforético del extracto de proteínas extracelular inducido con fructanos de agave (figura 2A, carril 2) mostró dos bandas diferenciales (indicadas con flechas), observadas en el SDS-PAGE, que corresponden justo donde se percibe el halo de actividad de β -fructosidasa (flecha en la figura. 2B, carril 2). Las bandas corresponden a un peso estimado de 105 y 116 kDa. Por lo anterior puede establecerse que halla dos o más bandas de proteína o isoformas con actividad β -fructosidasa.

Aunque *L. casei* fue capaz de crecer en medio con inulina, el extracto enzimático extracelular no mostró actividad enzimática. Contrario a ese resultado, Kuzuwa *et al.* (2012) encontraron que el extracto de proteínas extracelulares de *L. casei* IAM1045 degradan inulina cuando se creció en presencia de ésta.

En otro estudio se obtuvo una β -fructofuranosidasa intracelular en *L. plantarum* cuando se creció en FOS de cadena corta (Saulnier, 2007), lo que señala que las propiedades de las enzimas dependen del sustrato que se usa para inducir las. Esto sugiere la posibilidad de que la inulina induzca en *L. casei* una enzima fructanhidrolasa de pared celular o citoplasmática.

Por su parte, no se notó actividad β -fructosidasa cuando *L. casei* creció en presencia de glucosa. Goh *et al.* (2007) encontraron que *L. casei* 1195 cuando se creció en FOS en presencia limitada de glucosa, la síntesis de β -fructosidasa para la utilización de FOS está sujeta a represión catabólica por glucosa.

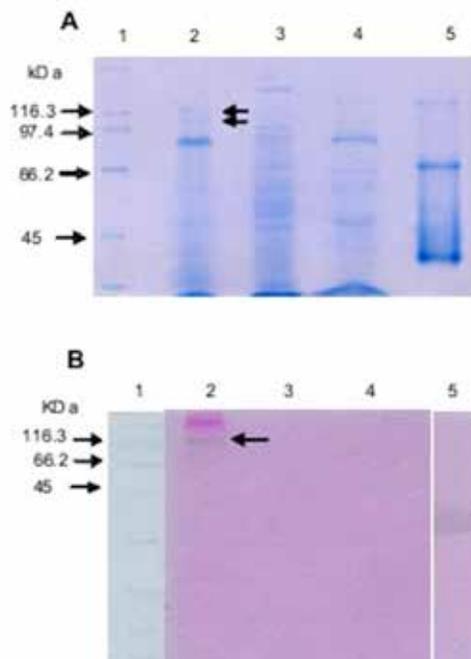


Figura 2. Perfil electroforético de las proteínas extracelulares de *L. casei* en SDS-PAGE (A) y gel de poliacrilamida 10% copolimerizado con inulina 2%, (p/v) (B). Carril 1, marcador de peso molecular Broad Range. Extracto de proteínas extracelular inducido con: fructanos de agave (carril 2), inulina (carril 3), glucosa (carril 4). Inulinasa de *Aspergillus niger* (carril 5).

Conclusiones

A partir de aguamiel se logró aislar *Lactobacillus casei* con actividad enzimática de β -fructosidasa. El extracto de proteínas extracelular de *L. casei* inducido con fructanos de agave reveló actividad enzimática sobre inulina contenida en geles de poliacrilamida.

Agradecimientos

A Lucía Delgadillo Ruiz y Perla Ivonne Gallegos Flores por su valioso apoyo y asesoría en la elaboración de este proyecto.

Referencias

- Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J., Spangenberg, G. (2005). Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal*, 3(5):459-474.
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H.P., Barba de la Rosa, A.P., Santos, L., De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcalt fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6): 626-630.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Volumen 2 The proteobacteria). USA: Springer.
- Goh, Y.J., Lee, J.H., Hutkins, R.W. (2007). Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18):5716-5724.
- Jaramillo, G.D., Meléndez, A.P., Sánchez, M.O.F. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de lactobacilos y bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2):193-209.
- Kuzuwa, S., Yokoi, K., Kondo, M., Kimoto, H., Yamakawa, A., Taketo, A., Kodaira, K.I. (2012). Properties of the inulinase gene levH1 of *Lactobacillus casei* IAM 1045; cloning, mutational and biochemical characterization. *Gene*, 495(2): 154-162.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-695.
- Liu, C., Gong, F., Li, X., Li, H., Zhang, Z., Feng, Y., Nagano, H. (2012). Natural populations of lactic acid bacteria in douchi from Yunnan Province, China. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 13(4):298-306.
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Makras, L., Van Acker, G., De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environment Microbiology*, 71(11):6534-6537.
- Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20):7832-7839.
- Müller, M., Lier, D. (1994). Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(4):406-411.
- Petrick, H.A.R., Ambrosio, R.E., Holzapfel, W.H. (1988). Isolation of a DNA probe for *Lactobacillus curvatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2): 405-408.
- Saulnier, D.M., Molenaar, D., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Kolida, S. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Applied and Environment Microbiology*, 73(6):1753-1765.
- Virgen-Ortiz, J.J., Ibarra-Junquera, V., Osuna-Castro, J.A., Escalante-Minakata, P., Mancilla-Margalli, N.A., Ornelas-Paz, J.J. (2012). Method to concentrate protein solutions based on dialysis-freezing-centrifugation: Enzyme applications. *Analytical Biochemistry*, 426(1):4-12.



Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* de diferentes áreas costeras

Ninfa M. Rosas-García | Maribel Mireles-Martínez | Gildardo Rivera-Sánchez
| J. Manuel Villegas-Mendoza | Francisco A. Paredes-Sánchez | Verónica Herrera-Mayorga
Centro de Biotecnología Genómica | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

correo-e: veronica_qfb@hotmail.com

Resumen

Spodoptera frugiperda es una plaga polífaga y constante de la cual se han identificado especies morfológicamente iguales pero genéticamente diferentes, llamadas biotipos. En el presente trabajo se planteó la identificación de variaciones genéticas entre los individuos de *S. frugiperda* de distintas áreas costeras, a fin de conocer los biotipos existentes y analizar qué factores interfieren. Se obtuvieron muestras de dos poblaciones: Mante, Tampaulipas, Guasave, Sinaloa, a partir de plantas de maíz y una población control de Chiefland, Florida, de plantas de pasto Bermuda. Se realizó la identificación molecular de biotipos en 50 individuos mediante la técnica PCR-RFLP. Se utilizó la enzima *MspI* obteniendo productos de amplificación de 569 pb y productos de digestión de 497 y 72 pb, característicos del biotipo maíz en individuos de Mante y Guasave y 569 pb, sin productos de digestión para el biotipo arroz en los individuos de Chiefland, Florida. El estudio demuestra la presencia del biotipo maíz en dos poblaciones de México, con una posible relación hacia la planta hospedera y no hacia el aislamiento geográfico.

Palabras clave: biotipos, *Spodoptera frugiperda*, PCR-RFLP.

Introducción

El estudio se plantea en un insecto plaga cuyo nombre científico es *Spodoptera frugiperda*, un insecto lepidóptero perteneciente a la familia de los noctuidos. Se conoce con el nombre común de «gusano cogollero», una plaga que causa el daño durante el estadio larval al alimentarse de diferentes cultivos.

Su característica polífaga ha facilitado el desarrollo de un proceso de adaptación fisiológica a los cambios en su medio ambiente (Pogue, 2002). Por lo tanto causa graves repercusiones económicas para los agricultores; además, ocasiona serios problemas ambientales al tener que incrementar las dosis y el número de aplicaciones de insecticidas químicos.

Debido a lo anterior, durante más de cuatro décadas se han propuesto e innovado técnicas para el control de poblaciones de *S. frugiperda*. Sin embargo, se ha observado que dos de los principales problemas para su control continúan siendo la diversidad genética y el desarrollo de resistencia.

La primera problemática fue encontrada en la década de los 1980 por Pashley *et al.* En 1986 dicho estudio mostró la presencia de dos cepas que llamaron biotipo arroz y biotipo maíz. Los biotipos son especies hermanas con diferenciaciones genéticas marcadas que manifiestan bajas tasas de hibridación o cuya hibridación no ocurre (Dres y Mallet, 2002).

Se habla de especies fenotípicamente iguales pero genéticamente disímiles, y con comportamientos diferentes como: *a)* preferencia por plantas hospederas, por ejemplo el biotipo de maíz tiene preferencia por plantas hospederas de maíz, sorgo y algodón y el biotipo de arroz por arroz y pastos (Pashley, 1986; Pashley, 1998; Nagoshi y Meagher, 2003a, 2004; Pashley, *et al.*, 2004); *b)* aislamiento reproductivo; *c)* resistencia a distintas estrategias de control.

La implementación de múltiples técnicas moleculares ha facilitado la identificación de los biotipos. Algunos autores han realizado la identificación y han atribuido ese proceso de co-evolución al aislamiento geográfico; algunos otros, a la preferencia por el hos-

pedero, pero la resistencia a las distintas estrategias de control continúa (Pashley, 2004; Nagoshi y Meagher, 2007).

Metodología

Se obtuvieron 20 muestras de larvas de *S. frugiperda* de cultivos de maíz localizados en Mante, Tamaulipas y 10 de Guasave, Sinaloa. Se emplearon 20 muestras como control positivo, previamente caracterizadas como biotipo arroz de Chiefland, Florida.

Las muestras de cada individuo se colocaron a -70°C , para la extracción del ADN se utilizó el protocolo del estuche comercial PROMEGA, la genotipificación de individuos se llevó a cabo mediante una PCR-RFLP de la región COI del ADN mitocondrial, se usaron los cebadores indicados por Nagoshi y Meagher en 2003.

El ADN genómico se amplificó mediante PCR en 25 μl de mezcla de reacción, que contuvo 5 μl de buffer de *Taq* polimerasa (5X), 0.5 μl de dNTPs (2.5 mM), 1.0 μl de cebador forward JM76 (5' GAGCTGAATTAGG(G/A)ACTCCAG 3'), 1.0 μl de cebador reverse JM77 (5' ATCACCTCC(A/T)CCTGCAGGATC 3'), 0.2 μl (5 U/ μl) de *Taq* ADN polimerasa, 16.3 μl de agua y 1.0 μl de ADN (50 ng).

La PCR se realizó con un ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 92°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto, y un ciclo de extensión final de 72°C por 3 minutos. Posteriormente se efectuó una digestión con la enzima de restricción *MspI*; se utilizó 40 μl del producto de PCR y 2.5 unidades de la enzima *MspI*; se incubaron a 37°C por 2 h. y se analizaron en un gel de agarosa al 2.5% con sybr 0.4%.

Resultados y discusión

Se examinó un total de 50 muestras, 20 de un estado del área costera del golfo de México, 10 pertenecientes a un estado de la zona costera del pacífico, las cuales mostraron un fragmento de 569 pb como

producto de amplificación y digestiones con la enzima *MspI* de 497 y 72 pares de bases característicos del biotipo maíz. Se caracterizaron 20 individuos de una cepa previamente caracterizada como biotipo arroz para verificar una correcta amplificación, presentó el producto de amplificación de 569 pares de bases y no tuvo digestión enzimática (figura 1).

Los resultados de esta investigación indican que posiblemente el aislamiento geográfico no está interviniendo en el proceso de co-evolución de este insecto, ya que no hubo variaciones entre las poblaciones de áreas costeras diferentes. Ello difiere con los resultados de López-Edwards *et al.* en 1999, donde evaluaron rasgos de comportamiento y resistencia en cinco poblaciones de gusano cogollero.

Sus resultados advierten que existen dos cepas o biotipos entre las poblaciones de gusano cogollero del maíz, lo cual atribuyeron quizá al aislamiento reproductivo debido al aislamiento geográfico. Mencionan una cepa formada por las poblaciones de Yucatán, Nuevo León y Aguascalientes, localizadas en la Costa del Golfo de México, y la segunda por Colima y Sinaloa, situadas en la Costa del Océano Pacífico, ya que no produjeron progenie entre ellas.

Por su parte, en el presente trabajo no se encontró una variación en cuanto a la presencia del biotipo maíz. Ese mismo comportamiento de poblaciones coincide con el estudio publicado por Clark y cols. en 2007, donde mediante AFLP evaluaron la variabilidad genética de *S. frugiperda* de veinte poblaciones recolectadas a partir de maíz, una población del árbol princesa, una población del árbol de limón, y una población a partir de pasto bermuda, lo que dio un total de 23 poblaciones de diferentes áreas geográficas.

Sus resultados indican que la presencia de biotipo maíz y biotipo arroz se da por el carácter preferencial hacia la planta hospedera, ya que hay una ausencia de estructura genética asociada geográficamente; ello se debe a que la variabilidad entre las poblaciones es nula y que el aislamiento geográfico no interfiere.

Tales resultados también coinciden con el trabajo de Busato *et al.* en 2004 mediante AFLP de larvas colectadas de plantas de maíz y arroz en varias poblaciones de Brasil, donde concluyeron la existencia de dos biotipos distintos específicos para cada planta hospedera.

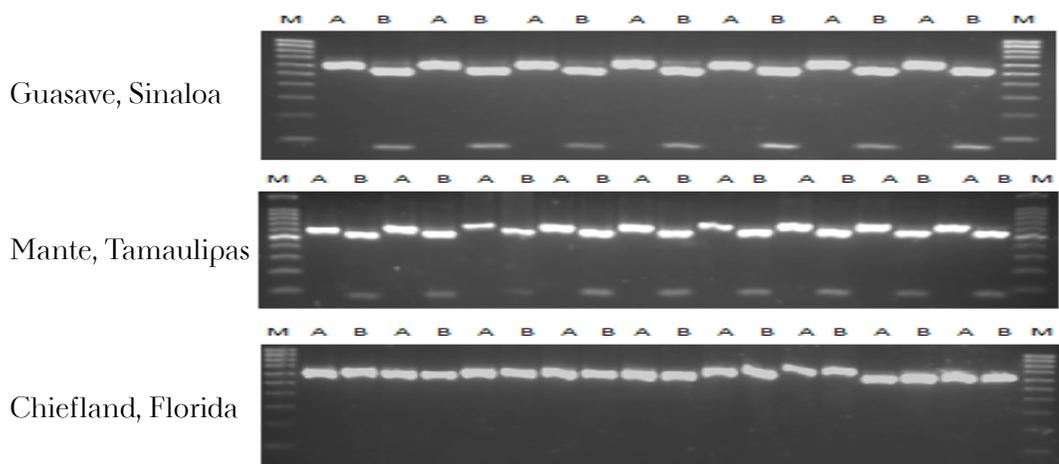


Figura 1. Amplificación y digestión del gen mitocondrial de la región COI de *S. frugiperda* Gel de agarosa al 2.5%. a) Fragmento de amplificación esperado de 569 pb. b) Productos esperados con la enzima de restricción *MspI* con tamaños aproximadamente de 497 y 72 pb característicos para el biotipo maíz en la población Reynosa y productos sin digerir característicos de biotipo arroz para las muestras control.

En nuestro trabajo no hallamos disimilitudes entre las poblaciones analizadas de México, sólo en la población control de Chiefland, que presentó el biotipo de arroz; esto se obtuvo de planta hospedera de past. Otros autores como Pashley *et al.* en 1986 analizaron cuatro poblaciones de México y una de Puerto Rico. Sólo se encontró la presencia del biotipo arroz en una población de Puerto Rico, tomada a partir de la planta hospedera de arroz.

Eso apoya que la presencia de biotipos no está dada por el aislamiento geográfico, se debe a la planta hospedera como lo había indicado Clark *et al.* y como se ha reiterado en este trabajo. No obstante, es necesario analizar individuos de otras plantas para apreciar mejor el comportamiento y distribución de ese insecto en México y descartar la presencia del biotipo arroz.

Conclusiones

En la diferenciación de biotipos de *S. frugiperda* con la técnica de PCR-RFLP, los resultados del marcador del gen COI indican que dos poblaciones mexicanas de distintas áreas costeras procedentes de la planta maíz presentaron el biotipo de maíz contrastante con una población control del biotipo arroz, obtenida a partir de planta hospedera de pasto bermuda.

Agradecimientos

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) unidad Sinaloa y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos-Servicio de Investigación Agrícola (USDA-ARS).

Referencias

- Busato, G.R., Gruztmacher, A.D., De Oliveira, A.C., Vieira, E.A., Zimmer, P.A., Kopp, M.M., De Bandeira, J., Magalães, T. (2004). Análise da estrutura e diversidade molecular de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) asociadas as culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotropical Entomology*, 33(6):709-716.
- Caballero, P., Murillo, R., Muñoz, D., Williams, T. (2009). El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2):405-445.
- Clark, L., Molina-Ochoa, P., Martinelli, J., Skoda, S., Isenhour D., S., Lee, J., Krumm, J.T. y Foster J., E. (2007). Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. *Journal of Insect Science*, 7(5):1-10
- Dres, M., Mallet, J. (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Philosophical Transactions B*, 357(1420):474-492.
- López Edwards, M., Hernández, M., Pescador, R.A., Molina, O.J., Lezama, G.R., Hamm, J.J., y Wiseman, B.R. (1999). Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Florida Entomologist*, 82(2):254-262.
- Nagoshi, R.D., Meagher, R.L. (2003). Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the world indicate limitations in interstrain mating. *Insect Molecular Biology*, 12(5): 453-456.
- Nagoshi, R., Silvie, N., Meagher Jr, R.L., Lopez, J., Machado, V. (2007). Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas and Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, 100(3):394-402.
- Pashley, D.P. (1986). Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Asibling species complex. *Annals of the Entomological Society of America*, 79(6):898-904.
- Pashley, D.P., McMichael, M., Silvain, J.F. (2004). Multi-locus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(5):1034-1044.



Arsénico y plomo en flora semiárida que crece dentro de un jale reforestado en Zacatecas

Miguel Ángel Salas-Luévano

Unidad Académica de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

María Luisa González-Rivera

Unidad Académica de Ciencias Químicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Consuelo Letechepía-de León | Víctor Martín Hernández-Dávila | Héctor René Vega-Carrillo

Unidad Académica de Estudios Nucleares | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: masalas@uaz.edu.mx

Resumen

En México los sitios de disposición de relaves son comunes en las regiones áridas y semiáridas, donde metales pesados (MPs) ocasionan problemas a la salud humana y medio ambiente. No obstante, estos sitios presentan vegetación adaptada para sobrevivir y reproducirse con potencial para fitorremediación. Una mina de Fresnillo, Zacatecas fue inspeccionada para identificar especies de plantas para fitoextracción y fitoestabilización de arsénico y plomo. El plan de muestreo se desarrolló conforme a la NMX-AA-132-SCFI-2006. Previo al análisis del contenido de As y Pb el proceso de digestión se realizó según la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, directamente de cada solución final, mediante Espectrometría de Absorción Atómica. Las familias mejor representadas son *Asteraceae*, *Poaceae*, *Cactaceae*, *Fabaceae*. Respecto a los niveles de MPs, el factor de bioconcentración, para *Plantago lanceolata* destacó para Pb (0.99). Asimismo, *Casuarina equisetifolia* después de 35 años de haber sido reforestado en el jale, presenta atributos para fitoestabilización de los metales pesados analizados.

Palabras clave: fitoestabilización, As, Pb, relaves mineros, Casuarina.

Introducción

En el ámbito mundial, los jales de minas inactivas o abandonadas son frecuentes en las regiones áridas y semiáridas el suroeste de España, el oeste de la India, Sudáfrica y Australia, del oeste de Estados Unidos, la costa pacífica de América del Sur y el norte de México (Mendez y Maier, 2008); donde los lodos residuales pueden liberar elementos tóxicos, cuyas concentraciones elevadas ocasionan problemas a la salud humana y medio ambiente (Kabata-Pendias y Pendias, 1992).

Una alternativa sustentable y ambientalmente amigable es la fitorremediación, que engloba técnicas emergentes basadas en el uso de especies vegetales y sus microorganismos asociados (Pilon-Smits, 2005). Entre éstas la fitoextracción emplea plantas capaces de absorber, extraer y acumular el contaminante en sus brotes (Salt *et al.*, 1998). Mientras que la fitoestabilización es utilizada para inmovilizar y reducir la biodisponibilidad del contaminante *«in situ»* mediante la revegetación (Vangronsveld y Cunningham, 1998).

Las antiguas áreas mineras con plantas tolerantes también pueden ser consideradas como fuente potencial para la fitorremediación (Molitor *et al.*, 2005). Por consiguiente, es importante usar plantas nativas y endémicas adaptadas al medio y que colonizan naturalmente suelos mineros, porque tienen capacidad para acumular y estabilizar metales pesados. El propósito de este estudio fue identificar las especies de plantas con potencial para fitoextracción y fitoestabilización de As y Pb dentro de un jale en Fresnillo, Zacatecas.

Metodología

El plan de muestreo y el análisis de textura, materia orgánica, pH y conductividad se determinaron de acuerdo con la norma oficial mexicana: NOM-021-SEMARNAT-2000. Mientras que la interpretación de los resultados fue conducida según el National Soil Survey Handbook del USDA (2013).

La identificación de las plantas fue realizada al nivel de Familia, género y especie mediante claves botánicas (Calderón y Rzedowski, 2004). Previo a la determinación del contenido de As y Pb el proceso de digestión se realizó por el método húmedo conforme a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, directamente sobre la solución final, a través de Espectrometría de Absorción Atómica.

Resultados y discusión

Los resultados de los análisis del jale muestran que el pH de los suelos promediaron valores de 7.7 y fueron clasificados como ligeramente alcalinos. La conductividad eléctrica promedió de 1.4 a 13 con un promedio de 2.6 dS m⁻¹. Asimismo, este jale fue el único cuyo contenido de materia orgánica mostró promedio de 1.2%. La arena fue la textura más abundante con porcentajes mayores que el 50%.

El color de los residuos varió de amarillo a rojo, lo que sugiere un proceso de oxidación de Fe-sulfuro y la posible generación de drenaje de mina ácida (Castro-Larragoitia *et al.*, 2013). En términos generales, es conocido que el pH y la CE son los factores más importantes y se relacionan porque bajo condiciones ácidas en la matriz de los relaves más sales se disuelven (Conesa *et al.*, 2007b).

Contenido de metales pesados en los suelos rizosféricos del jale

El contenido de los MPs en las muestras de suelo del jale (TBC) se presentan en el cuadro 1. El análisis de los resultados revela que son significativamente diferentes para estos elementos, probablemente debido a la naturaleza de las diferentes operaciones mineras (Barrutia *et al.*, 2011). El As mostró un nivel particularmente alto para los tres elementos analizados.

Por otro lado, los contenidos totales de los MPs en suelo variaron de 2066 a 4387 mg kg⁻¹ para As, y 418 a 830 mg kg⁻¹ de Pb (cuadro 1). Esto debe tomarse en cuenta en trabajos de revegetación porque

los parches de alta concentración de metales pueden afectar el crecimiento de las plantas, lo que resulta en áreas sin vegetación (Conesa *et al.*, 2007a).

Identificación y contenido de As y Pb en la vegetación asociada al jale

Las plantas recolectadas en el jale reforestado, se enlistan en el cuadro 1. Fueron identificadas un total de 23 especies pertenecientes a 12 diferentes familias. Entre éstas la familia *Asteraceae* fue la que registró la mayor diversidad con cinco especies, seguida por *Cactaceae* y *Fabaceae* con tres especies, respectivamente y *Poaceae* con dos. *Botriochloa barbinoides*, *Casuarina equisetifolia*, *Haplopappus venetus* fueron encontradas en suelos con pH ligeramente alcalino y moderadamente ácido. Al respecto, es conocido que la distribución de los metales en los jales no suele ser homogénea (Ernst, 2005).

Al respecto, Alloway *et al.* (1990) indican que el contenido de los metales en las plantas varía con la especie, lo que significa que están presentes en formas químicas que son lo suficientemente móviles para ser biodisponibles en la interface suelo/raíz (Uruioc *et al.*, 2011). Además, estos resultados demuestran que la vegetación endémica y nativa, así como la introducida, se adapta a la toxicidad del As y el Pb.

Por otro lado, Yoon *et al.* (2006) destacan que el factor de bioconcentración (FBC=proporción de concentración de metales de la planta con el suelo) puede ser utilizado para estimar el potencial de las especies para propósitos de fitorremediación. Con base en la expresión de este atributo *P. lanceolata* registró un valor cercano a 1.0 de Pb (FBC = 0.99) para Pb. Adicionalmente, muestras para Cu en *C. equisetifolia* registraron en planta y suelo de 3117 µg/g y 1082 µg/g, respectivamente, y con un FBC de 2.88. Quizá este hallazgo es el primero en zonas de México. También fue encontrada *Tillandsia recurvata* una epífita muy empleada para biomonitoriar fuentes potenciales de contaminación atmosférica (Zambrano *et al.*, 2009), cuyas concentraciones fueron 1245 µg/g para As.

Cuadro 1
Concentraciones de As, Pb y Cd en plantas que crecen dentro del jale 2 reforestado en una mina del municipio de Fresnillo, Zacatecas

Clave de la muestra	Forma de vida	Especies de plantas	Niveles de As (µg/g)		Niveles de Pb (µg/g)	
			B	S	B	S
TBC01	Arb	<i>Acacia schaffneri</i>	268	3838	26	534
TBC02	Her	<i>Asphodelus fistulosus</i>	921	4387	31	512
TBC03	Ár	<i>Casuarina equisetifolia</i>	2197	3982	37	652
TBC04	Arb	<i>Baccharis salicifolia</i>	788	2378	55	723
TBC05	Her	<i>Biotriochloa barbinodis</i>	818	2368	47	818
TBC06	Arb	<i>Brickellia veroncifolia</i>	956	2454	63	572
TBC07	Her	<i>Choloris virgata</i>	78	2066	24	589
TBC08	Her	<i>Croton dioicus</i>	682	2742	45	772
TBC09	Arb	<i>Dalea bicolor</i>	717	3651	55	624
TBC10	Ár	<i>Eucalyptus globulus</i>	1809	3799	10	826
TBC11	Ár	<i>Fraxinus uhdei</i>	1452	4009	22	830
TBC12	Her	<i>Haplopappus venetus</i>	617	2683	42	689
TBC13	Her	<i>Machaeranthera pinnatifida</i>	80	3805	82	418
TBC14	Arb	<i>Nicotiana glauca</i>	379	3384	36	683
TBC15	Arb	<i>Opuntia leucotricha</i>	479	3805	54	525
TBC16	Arb	<i>Opuntia robusta</i>	1941	3205	27	639
TBC17	Arb	<i>Opuntia streptacantha</i>	414	3805	21	598
TBC18	Her	<i>Plantago lanceolata</i>	1999	4150	554	556
TBC19	Ár	<i>Prosopis laevigata</i>	1332	4049	40	778
TBC20	Her	<i>Sphaeralcea angustifolia</i>	2214	3385	0	512
TBC21	Arb	<i>Typha angustifolia</i>	380	2916	16	608
TBC22	Her	<i>Thymophyllia setifolia</i>	2380	3805	40	525
TBC23	Epi	<i>Tillandsia recurvata</i>	1245		81	

Abreviaciones: Ar=Árbol; Arb=Arbusto; He=Herbácea

Referente a los propósitos de fitoestabilización, este estudio pone de relieve el papel de *C. equisetifolia* después de 30 años de haber sido reforestado presenta características excepcionales para la aplicación de dicha tecnología en los jales estudiados. Este árbol registró una altura de casi 13 m en promedio, con abundante hojarasca de hasta 40 cm en algunas áreas. El éxito de esta especie arbórea puede establecer asociación simbiótica y formar nódulos en las raíces con *Frankia*, un actinomiceto

con capacidad para realizar altas tasas de nitrógeno comparable a las leguminosas (Franché *et al.*, 2009).

Los atributos señalados en la literatura y los observados en este jale son evidencias de que dicho árbol es pionero en la ocupación de suelos contaminados, con potencial para fitoestabilización de metales pesados para su aplicación favorable en zonas áridas y semiáridas de la región.

Conclusiones

Se han identificado especies de plantas con potencial para fitoextracción y estabilización de As y Pb dentro de un jale reforestado en Fresnillo, Zacatecas. Con base en los resultados obtenidos se demuestra que el substrato del jale está contaminado principalmente con As y Pb.

El contenido de estos metales pesados en las plantas sugiere que algunas tienen buena capacidad para tolerar y acumular Pb y As. Entre la vegetación analizada *Plantago lanceolata* y *Casuarina equisetifolia* fueron las más eficientes para absorber Pb y Cu, con valores del FBC (0.99) y (2.88), respectivamente. No obstante, el potencial de estas especies de plantas para la fitoextracción tiene que ser más investigado.

Referencias

- Alloway, B.J., Jackson, A.P., Morgan, H. (1990). The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. *Science of the Total Environment*, 94:223-36.
- Baker, A., Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Bio-recovery*, 1:84-126.
- Barrutia, O., Artetxe, U., Hernández, A., Olano, J., M., García-Plazaola, J.I., Garbisu, C., Becerril, J.M. (2014). Native plant communities in an abandoned Pb-Zn mining area of Northern Spain: Implications for phytoremediation and germplasm preservation. *International Journal of Phytoremediation*, 13(3):256-270.
- Calderón, R.G., Rzedowski, J. (2004). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. México: Instituto de Ecología, A.C./CONABIO.
- Castro-Larragoitia, J., Kramar, U.M., Monroy-Fernández, M., Viera-Décida, F., García-González, E.G. (2013). Heavy metal and arsenic dispersion in a copper-skarn mining district in a Mexican semi-arid environment: sources, pathways and fate. *Environmental Earth Sciences*, 69(6):1915-1929.
- Conesa, H.M., Faz, Á., García, G., Arnaldos, R. (2007a). Heavy metal contamination in the semiarid area of Cartagena La Unión (SE Spain) and its implications for revegetation. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(9a):1076-1081.
- Conesa, H.M., García, G., Faz, A., Arnaldos, R. (2007b). Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere*, 68(6):1180-1185.
- Ernst W., H.O. (2005). Phytoextraction of mine wastes. Options and impossibilities. *Chemie der Erde-Geochemistry*, 65(S4):29-42.
- Franché, C., Lindström, K., Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321(1-2):35-59.
- Freitas, H, Prasad, M.N., Pratas, J. (2004). Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International*, 30(1):65-72.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1992). *Trace elements in soil and plants* (2nd Ed.). Boca Raton, Fla, USA: CRC Press.
- Mendez, M., Maier, R. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments. An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116(3):278-283.
- Molitor, M., Dechamps, C., Gruber, W., Meerts, P. (2005). *Thlaspi caerulescens* on nonmetalliferous soil in Luxembourg: ecological niche and genetic variation in mineral element composition. *New Phytologist*, 165(2): 503-512.

- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56:15-39.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:643-668.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, *Diario Oficial*. Recuperado de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255-pdf>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2007). Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, *Diario Oficial*. Recuperado de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/4392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf
- Tordoff, G., Baker, J., Willis, A. (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. *Chemosphere*, 41(1-2):219-228.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2014). Natural Resources Conservation Service. National soil survey handbook, title 430-VI. Recuperado de <http://soils.usda.gov/technical/handbook/>
- Uruioc, E., Măsu, S., Albulescua, M., Krstić, V., Stanković, S., Obradović, L. (2011). Bioaccumulation of heavy metals in spontaneous plants, developed on mining area from SW Romania. *Annals of West University of Timisoara. Series of Chemistry*, 20(4):81-88.
- Vangronsveld, J., Cunningham, S. (1998). *Metal-Contaminated Soils: In situ Inactivation and Phytoremediation*. Georgetown, Texas: R. G. Landes Company.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, O., Ma, Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 2-3:456-464.
- Zambrano, G.A., Medina, C.C., Rojas, A.A., López, V.D., Chang, M.L. y Sosa, I.G. (2009). Distribution and sources of bioaccumulative air pollutants at Mezquital Valley, Mexico, as reflected by the atmospheric plant *Tillandsia recurvata* L. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 9(17):6479-6494.



Participación del óxido nítrico en la regulación del desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Javier Raya-González | Amira Garnica-Vergara | León F. Ruiz-Herrera | José López-Bucio
 Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Alfonso Méndez-Bravo
 Red de Estudios Moleculares Avanzados | INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.

correo-e: jbucio@umich.mx

Resumen

El sistema radicular de las plantas es esencial para la toma de agua y nutrientes, así como para la tolerancia a estrés biótico y abiótico. En el presente trabajo, se muestra que el óxido nítrico (ON) modula la activación de diferentes programas del desarrollo bajo condiciones normales de crecimiento y en respuesta a la alcalamida *N*-isobutil decanamida y el ácido jasmónico (AJ). Se observó que la aplicación exógena de la *N*-isobutil decanamida, el SNP (un donador de ON) y del AJ inhiben el crecimiento de la raíz primaria e incrementan la formación de raíces laterales y pelos radiculares, de manera dosis dependiente. Esto se correlaciona con un aumento de los niveles endógenos de ON a nivel tejido específico. El SNP y la *N*-isobutil decanamida activan la expresión del marcador de respuesta a AJ, *pLox2:uidA* de manera dosis dependiente. Estos resultados indican que el ON actúa como molécula señal para activar respuesta de desarrollo y defensa inducidas por la *N*-isobutil decanamida y el AJ en *Arabidopsis thaliana*, sugiriendo al ON como posible mediador durante la adaptación a ambientes adversos.

Palabras clave: sistema radicular, reguladores del desarrollo vegetal, óxido nítrico, *Arabidopsis thaliana*.

Introducción

El óxido nítrico (ON) es una molécula bioactiva que regula una gran cantidad de procesos fisiológicos y moleculares en organismos diversos filogenéticamente incluyendo bacterias, animales y plantas. En plantas, el ON participa como segundo mensajero en las vías de señalización que regulan diferentes aspectos del desarrollo como la germinación, la formación de órganos y la senescencia.

También modula las respuestas a condiciones de estrés, incluyendo la deficiencia de nutrientes y el ataque por patógenos (Wendehenne *et al.*, 2004). Debido a esto, recientemente se ha considerado al ON como un regulador del desarrollo vegetal. Sin embargo, se desconoce en gran medida su participación en los procesos de división, elongación y diferenciación celular que determinan la formación *de novo* de órganos (raíces, tallos, hojas, ramas, flores y frutos), así como su interacción con los diferentes reguladores del desarrollo vegetal (Campos-Cuevas *et al.*, 2008; Méndez-Bravo *et al.*, 2010; Méndez-Bravo *et al.*, 2014).

Este trabajo se enfoca en el estudio de la participación del ON en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a SNP, *N*-isobutil decanamida y AJ, los cuales participan en la modulación de la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis*, confiéndoles así ventajas a las plantas ante ambientes de crecimiento adversos (Méndez-Bravo *et al.*, 2014; Raya-González *et al.*, 2012). Sin duda estos resultados pueden ser orientados hacia transferencias tecnológicas con posible impacto biotecnológico.

Metodología

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) fueron crecidas *in vitro* en cajas de Petri con medio de Murashige-Skoog (MS) 0.2X solidificado con agar. Este medio contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo normal de las plantas. Se le suministraron concentraciones mi-

cromolares del donador de ON nitroprusiato de sodio (SNP), del AJ y de la *N*-isobutil decanamida y se evaluó el desarrollo de la raíz considerando diferentes parámetros morfogénéticos: longitud de la raíz primaria, formación de las raíces laterales y diferenciación de las células epidérmicas. De igual modo, se utilizó una línea transgénica de *Arabidopsis* que expresa una fusión de la histona H2 con la proteína fluorescente amarilla (*ATHistH2B:YFP*) y por lo tanto emite una señal de fluorescencia en los núcleos íntegros de las células. Esta construcción representa un excelente marcador de viabilidad celular (Boisnard-Lorig *et al.*, 2004).

La detección de ON se realizó incubando plántulas de *A. thaliana* con el fluorocromo diacetato de diamino fluoresceína (DAF-2DA) en concentración de 40 μ M. La tinción se realizó durante 2 h, seguida por al menos tres lavados de 20 min con Tris 0.1 M (pH 7.4). La fluorescencia emitida se analizó mediante un escaneo por microscopia confocal láser en un microscopio modelo BX50 (Olympus, Japón).

Para el estudio de viabilidad celular se realizaron tinciones con yoduro de propidio (PI). Las plántulas se colectaron del medio dejando el sistema radicular intacto y se transfirieron a una solución 10 μ M de PI para su análisis. La detección de la fluorescencia se efectuó mediante longitudes de onda específicas, para el PI a 568-nm de excitación y 585-610 nm de emisión, mientras que para *YFP* y DAF fueron a 505-550-nm de emisión y 488-nm de excitación.

Resultados y discusión

Bajo condiciones normales de crecimiento, se observó que el ON se acumula preferencialmente en las células de la cofia y en los pelos radiculares (figuras 1 y 2). La aplicación exógena de SNP, *N*-isobutil decanamida y AJ inhiben el crecimiento de la raíz primaria e incrementan la formación de raíces laterales y pelos radiculares. Estas respuestas correlacionan con un aumento en los niveles endógenos de ON a nivel tejido específico en dichos órganos (figura 3). Se

observó un incremento en la expresión del marcador de respuesta a AJ, *pLox2::uidA* en presencia de SNP y de *N*-isobutil decanamida, sugiriendo un papel del ON en la activación de respuestas del desarrollo y de defensa dependientes de AJ.

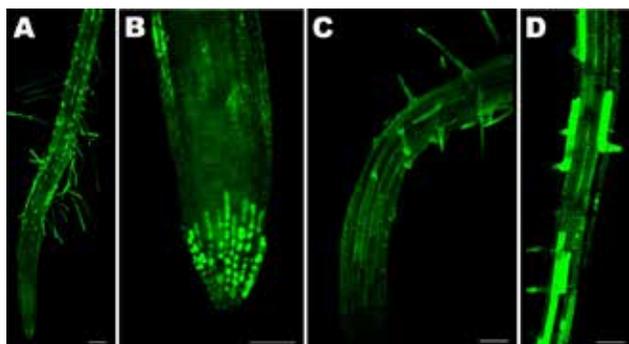


Figura 4. Niveles endógenos de ON en células diferenciadas. (A) Raíz primaria, (B) células de la cofia de la raíz primaria, (C) región de diferenciación de la raíz, (D) Tricoblastos.

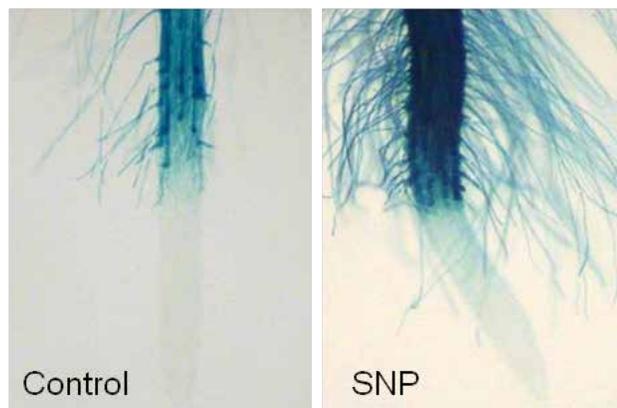


Figura 2. Efecto del donador de ON, SNP sobre la formación de pelos radiculares. Se muestran plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el marcador de expansión celular *Exp7::uidA*.

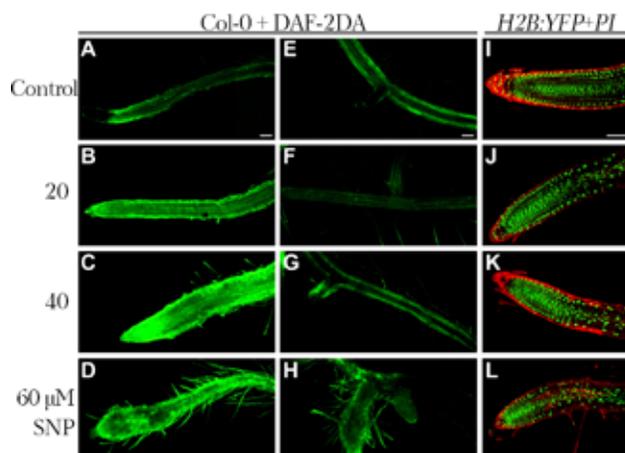


Figura 3. Efecto de la acumulación del ON sobre procesos de diferenciación y en la viabilidad celular en el meristemo de la raíz de *Arabidopsis*. (A-D) detección del ON en la zona meristemática de la raíz primaria y en las raíces laterales (E-H). (I-L) Zona meristemática de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el marcador *AtHistH2B::YFP* teñidas con yoduro de propidio.

Conclusiones

El óxido nítrico participa como una molécula señalizadora para regular procesos de división, elongación y diferenciación celular en *A. thaliana*. La alcamida *N*-isobutil decanamida y el ácido jasmónico son dos moléculas involucradas en procesos de desarrollo y defensa que requieren de la señalización del ON para la activación de dichos procesos.

Agradecimientos

Agradecemos a Alejandra Chacón López, Nydia Hernández Ríos y Juan José Valdez Alarcón por el apoyo técnico y el permiso para el uso del microscopio confocal.

Referencias

Boisnard-Lorig, C., Colon-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E., Dumas, C., Hasseloff, J., Berger, F. (2004). Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syntactic endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell*, 13(3):495-509.

- Campos-Cuevas, J.C., Pelagio-Flores, R., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Ortiz-Castro, R., López-Bucio, J. (2008). Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Science*, 174(2):165-173.
- Méndez-Bravo, A., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Raya-González, J., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Guevara-García, A., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L. (2011). Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, 6:e27251.
- Méndez-Bravo, A., Raya-González, J., Herrera-Estrella, L., López-Bucio, J. (2010). Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 51(10):1612-1626.
- Raya-González, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J. (2012) The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 169(14):1348-1358.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4):449-455.

Efecto del ensodulfán en el crecimiento vegetativo y actividad enzimática ligninolítica de hongos de la pudrición blanca

Anlui Rodríguez-Carreón | Refugio Rodríguez-Vázquez

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Wilberth Chan-Cupul

INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.

Enrique Alarcón-Gutiérrez

Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada | UNIVERSIDAD VERACRUZANA

correo-e: arodriguezcar@cinvestav.mx

Resumen

El endosulfán es un compuesto organoclorado persistente presente en una gran variedad de plaguicidas comerciales. Su uso excesivo ha provocado severos problemas ecológicos y de salud pública a escala mundial. El alto coste de los sistemas fisicoquímicos para su remediación vuelve poco factible su implementación a gran escala. Ante esto, la biorremediación se perfila como una opción prometedora para mitigar esta problemática. En el presente trabajo se evaluó la tolerancia de 10 basidiomicetos ante distintas concentraciones de endosulfán y se obtuvieron la tasa media de crecimiento, el crecimiento relativo y la concentración efectiva media (CE_{50}) para cada uno de ellos. A su vez se estudió la capacidad de producción de lacasa y manganeso peroxidasa, enzimas involucradas en la degradación de contaminantes de diversa naturaleza.

Palabras clave: plaguicidas organoclorados, lacasa, manganeso peroxidasa, dosis respuesta.

Introducción

Debido a la creciente demanda alimentaria mundial, el uso de agroquímicos que permitan obtener mayores rendimientos se ha intensificado de manera importante en el sector agrícola. El endosulfán es un insecticida del tipo ciclodieno de amplio espectro. En los últimos 30 años ha sido ampliamente utilizado en el control de plagas en una gran variedad de cultivos comerciales. Es extremadamente tóxico para peces y otros organismos acuáticos, afecta el sistema nervioso central, hígado, riñones, la composición sanguínea, así como la glándula paratiroides y puede producir efectos mutagénicos, teratogénicos y reproductivos.

Con el fin de contrarrestar los efectos nocivos causados por la presencia de endosulfán y otros compuestos organoclorados en agua y suelo, se han desarrollado técnicas de remediación físicas, químicas y biológicas. Entre las diversas técnicas, la biorremediación es considerada la alternativa menos costosa y más compatible con el ambiente para degradar este tipo de contaminantes.

En la naturaleza, existe una gran variedad de organismos que poseen la maquinaria enzimática para transformar compuestos xenobióticos. Los hongos, específicamente los de la pudrición blanca y café de la madera (basidiomicetos), pueden degradar lignina, un polímero aromático, de estructura compleja, así como un amplio espectro de contaminantes recalcitrantes que incluyen los bifenilos policlorados, dibenzo dioxinas policloradas, triazinas y dibenzofuranos policlorados.

La búsqueda de cepas de basidiomicetos con capacidad para tolerar el endosulfán es el primer paso a considerar en la selección de cepas candidatas para estudiar la micodegradación de endosulfán en suelo o agua contaminada. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar basidiomicetos tolerantes al endosulfán a través de bioensayos dosis respuesta y cuantificación de su producción enzimática (lacasa y MnP) bajo estrés por endosulfán.

Metodología

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se estudiaron diez cepas pertenecientes al cepario del laboratorio de xenobióticos del CINVESTAV-IPN (*Phanerochaete chrysosporium* H-925, *Trametes maxima*, *Pycnoporus sanguineus* SBM-3, *Pycnoporus sanguineus* ACT, *Daedalea elegans* y *Pleurotus* sp., así como las cepas no identificadas: Tloco-1, Hy-13, Tlalne-3 y TL-1). Todas las cepas se reactivaron en agar papa dextrosa (APD) y se incubaron a 30 °C por 10 días, previo a su utilización en los bioensayos.

Bioensayos dosis respuesta

Se utilizó la formulación comercial «Algodón 350» con una concentración de 38% p/v del ingrediente activo endosulfán. Como medio de cultivo se usó el medio libre de azufre reportado por Hussain *et al.* (2007), éste fue esterilizado a 121 °C por 20 min, se dejó enfriar a 50 ± 2 °C y se le añadieron individualmente diferentes concentraciones de endosulfán, posteriormente se vertió en cajas Petri (90 mm Ø). Las concentraciones finales (ppm) de endosulfán fueron 1000, 500, 250, 125 y 0 (sin endosulfán).

Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para la siembra, se tomó un disco de 6 mm de diámetro de los cultivos en APD sin endosulfán, se inoculó al centro de cada una de las cajas Petri con el plaguicida (con los 5 niveles de tratamiento) y se mantuvieron en incubación a 30 °C, bajo oscuridad. Cada 24 h se midió el crecimiento micelial desde la parte posterior de las cajas por medio de una escuadra milimétrica, cada bioensayo concluyó una vez que el tratamiento control cubrió el 100% de la caja de Petri.

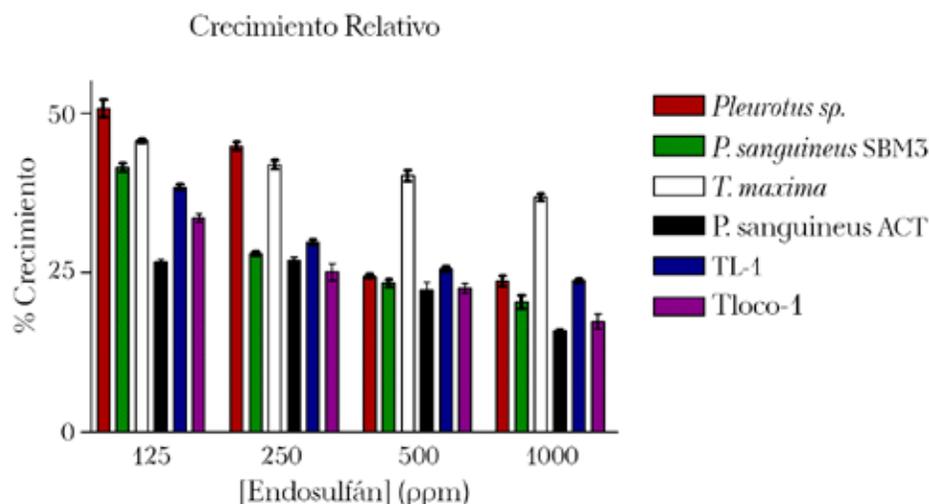


Figura 1. Crecimiento relativo. *Barras de error representan el error estándar de la media.

Variables de crecimiento

El crecimiento relativo (%) se calculó al dividir el diámetro de cada colonia entre el diámetro de la colonia control y multiplicando este valor por 100. La CE_{50} fue definida como la concentración de endosulfán necesaria para inhibir el 50% del crecimiento del hongo, se calculó a través de un análisis Probit en SAS 8.1.

Evaluación enzimática

El extracto enzimático se obtuvo según lo reportado por Mata y Savoie (1998). La actividad de lacasa se determinó mediante la cuantificación espectrofotométrica (420 nm) de la oxidación de 5 mM de ABTS (400 μ l) (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en buffer de acetato de sodio (0.1 M, 4.5 pH, 600 μ l) y extracto enzimático (300 μ l) (Ibrahim *et al.*, 2014). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de lacasa capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto y se reportó en unidades por litro (U/L).

La actividad de MnP se cuantificó a 640 nm ($\epsilon_{640} = 4460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) con la siguiente mezcla de reacción: extracto enzimático (700 μ l), rojo fenol 0.2% (50 μ l), lactato de sodio 0.5 mM (50 μ l), albúmina de hue-

vo 0.1% (50 μ l), sulfato de manganeso 2 mM (50 μ l) y peróxido de hidrógeno 2 mM (50 μ l), disueltos en buffer succinato sódico 20 mM (pH 4.5) (Kuwahara *et al.*, 1984). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de MnP capaz de oxidar 1 μ mol de rojo fenol por minuto y fue reportada en U/L.

Resultados y discusión

La figura 1 muestra el crecimiento relativo de los 6 hongos que exhibieron mayor tolerancia a endosulfán. En todos los organismos evaluados la tasa de crecimiento disminuyó conforme aumentó la concentración de endosulfán en el medio. Las cepas que no se exhiben en la gráfica presentaron un crecimiento relativo inferior al 10% y fueron descartadas para los posteriores estudios.

Para una concentración de 125 ppm de endosulfán, *Pleurotus sp.* mostró un crecimiento relativo de 50%, el cual fue significativamente mayor ($P < 0.01$) al del resto de las cepas evaluadas.

A una concentración de 1000 ppm, *T. maxima* registró un crecimiento relativo de 37%, siendo significativamente mayor ($P < 0.01$) que el de las otras cepas evaluadas. Los resultados obtenidos en los bioensayos reflejaron una alta toxicidad del endosulfán sobre las cepas estudiadas, lo que se manifestó en

crecimientos relativos menores a 50%, incluso para la concentración de trabajo más baja (125 ppm). De igual manera, se observó que el umbral de tolerancia varía en cada cepa estudiada.

En el cuadro 4 se presentan los valores obtenidos mediante el análisis Probit para las 6 cepas analizadas.

Cuadro 4
Análisis Probit

Cepa	CE ₅₀ (ppm)	IC	Pr> χ^2
<i>Pleurotus sp.</i>	193.2	147.3-236.5	<0.0004
<i>Ps SMB3</i>	59.8	21.9-99.3	<0.0004
<i>T. máxima</i>	74.8	0.05-177.0	0.0188
TL-1	37.45	1.71-90.9	0.0007
<i>Ps. ACT</i>	12.84	0.17-44.2	0.0006
Tloco-1	5.48	0.01-28.56	0.0029

IC = intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$,

CE₅₀ = concentración de endosulfán a la cual se inhibe el crecimiento al 50%. *Ps SMB3* = *P. sanguineus* SMB 3

Ps ACT = *P. sanguineus* ACT.

Los organismos que presentaron las CE₅₀ más elevadas fueron las cepas *Pleurotus sp.*, *T. máxima* y *P. sanguineus* SBM3. Sin embargo, solo *Pleurotus sp.* fue significativamente diferente al resto de las cepas evaluadas, de acuerdo al traslape de los intervalos de confianza. Los valores de probabilidad asociada al valor del estadístico χ^2 fueron inferiores a 0.05, lo que indica la validez del modelo de regresión para cada caso.

En cuanto a la actividad enzimática, el gráfico de la figura 2 ilustra los perfiles de actividad de lacasa de las distintas cepas evaluadas. En todos los hongos, con excepción de *Pleurotus sp.*, la presencia de endosulfán promovió un aumento significativo ($P < 0.04$) en la actividad de la enzima. Los incrementos en la actividad de lacasa oscilaron entre 15 hasta 67 veces más que el tratamiento control entre los distintos hongos y concentraciones de endosulfán estudiados.

El aumento en la actividad de lacasa extracelular de diversos hongos en condiciones de estrés químico o biológico ha sido reportado anteriormente por diversos autores (Vladimir *et al.*, 2010).

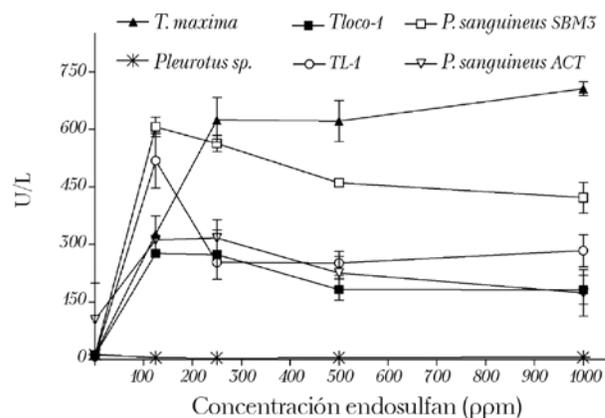


Figura 2. Perfiles de actividad de Lacasa.

Trametes maxima fue el único organismo que no presentó una diferencia significativa ($P > 0.05$) en la producción de lacasa conforme aumentó la concentración de endosulfán a partir de 125 ppm, mientras para el resto de las cepas se advierte un decremento significativo ($P < 0.05$) a partir de las 125 ppm de endosulfán. La producción de lacasa por *Pleurotus sp.* no se vio promovida por la presencia de endosulfán, según los estudios de Kullman y Matsumura (1996) la biodegradación de endosulfán puede llevarse a cabo mediante rutas hidrolíticas y oxidativas, lo cual podría indicar que *Pleurotus sp.* utiliza un mecanismo preferentemente hidrolítico para la degradación de endosulfán. Todos los hongos, a excepción de *Pleurotus sp.*, presentaron un incremento significativo ($P < 0.05$) en la producción de MnP cuando fueron cultivados en presencia de endosulfán (figura 3).

De manera similar, la actividad enzimática disminuyó notoriamente a partir de una concentración de 250 ppm. *Trametes maxima*, la cepa con mayor crecimiento a concentraciones superiores a 500 ppm es también la cepa que exhibió una producción significativamente mayor ($P < 0.04$) de MnP cuando la concentración rebasó las 250 ppm.

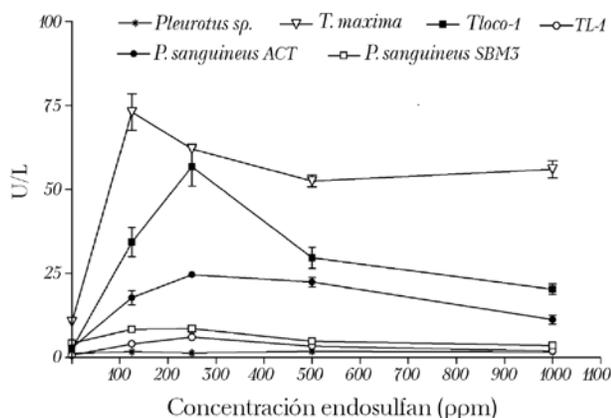


Figura 3. Perfiles de actividad de MnP.

Conclusiones

Las cepas estudiadas mostraron diferente grado de susceptibilidad al endosulfán. El hongo *Pleurotus sp.* resultó ser el más tolerante al obtenerse el valor más alto de CE_{50} (192.3 ppm). Todas las concentraciones de endosulfán incrementaron de modo considerable la actividad de lacasa de las cepas estudiadas con la única excepción de *Pleurotus sp.* Mientras que para MnP, sólo las cepas *P. sanguineus ACT*, *T. maxima* y *Tloco-1* elevaron su actividad por efecto del endosulfán. El aumento en la actividad de lacasa y MnP como una respuesta al estrés por el plaguicida, podría ser favorable para la degradación endosulfán en futuros estudios de micorremediación.

Referencias

- Hussain, S., Arshad, M., Saleem, M., Zahir, Z.A. (2007). Screening of soil fungi for *in vitro* degradation of endosulfan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(7):939-945.
- Ibrahim, V., Mendoza, L., Momo, G., Hatti, K.R. (2014). Blue laccase from *Galerina sp.*: Properties and potential for Kraft lignin demethylation. *Process Biochemistry*, 46(4): 379-384.
- Kullman S.W., Matsumura, F. (1996). Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):593-600.
- Kuwahara, K, Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169(2): 247-250.
- Mata, G., Savoie, J.M. (1998). Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(4):1-7.
- Vladimir, E., Eva, K., Tamar, K., Spiros, N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(10):1091-1096



Actividad enzimática de *Trametes maxima* en cocultivo con micromicetos de suelo en agua sintética-agar (ASA) con atrazina como fuente de «C» y «N»

María Fernanda Romo-García | Refugio Rodríguez-Vázquez | María del Carmen Montes-Horcasitas
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Wilberth Chan-Cupul
INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.

Luis G. Torres-Bustillos
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

correo-e: mromog@cinvestav.mx

Resumen

Existen antecedentes de que compuestos xenobióticos, como lo es la atrazina pueden ser mineralizados o removidos mediante métodos biológicos, por ejemplo la degradación enzimática. Sin embargo, la actividad enzimática en condiciones normales no suele ser suficiente para la degradación de estos compuestos xenobióticos, por lo que en el presente trabajo se busca aumentar la producción enzimática de hongos ligninolíticos bajo estrés biótico al confrontarlos con hongos filamentosos conformando un cocultivo, así como caracterizar la influencia que tiene esta condición sobre el crecimiento y la producción de enzimas.

Palabras clave: enzimas ligninolíticas, interacciones, micorremediación, biotecnología verde.

Introducción

En la agricultura convencional, la atrazina es el herbicida más empleado en todo el mundo y en México es el tercero (Hernández-Antonio y Hansen, 2011). Este herbicida es considerado como un disruptor endocrino, al ocasionar anormalidades en el desarrollo reproductivo e inmunosupresión en organismos no blancos (anfibios, reptiles, peces y mamíferos) (U.S. Centers for Disease Control, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003), por esta razón su uso ha sido cuestionado en la agricultura sustentable.

La remoción de atrazina en agua y suelo contaminado ha sido objeto de estudio en los últimos años, la biorremediación a través de la micorremediación, es una estrategia promisoría para la descontaminación de agua y suelo (Barr *et al.*, 1992). La micorremediación consiste en la aplicación de hongos o sus enzimas para la remoción, degradación o transformación del contaminante.

Este proceso es mediado por enzimas extracelulares como las lacasas (EC 1.10.3.2) y manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.14) (Christian *et al.*, 2005). La sobreproducción de estas enzimas a través de métodos compatibles con la biotecnología verde, evitando el uso de inductores químicos y la modificación genética de microorganismo, ha sido foco de estudio científico.

Al respecto, se ha demostrado que el cocultivo de basidiomicetos con micromicetos de suelo, es ventajoso para la producción de lacasa y MnP, comparado al simple monocultivo de basidiomicetos (Chan-Cupul *et al.*, 2014). Sin embargo, en cuanto a la remoción de atrazina en agua contaminada mediante cocultivos fúngicos, aún está en fase de investigación.

Por tanto, para conocer la habilidad de los cocultivos a fin de adaptarse a agua contaminada, la finalidad de este estudio fue: 1) evaluar la compatibilidad de *Trametes maxima* con hongos micromicetos de suelo a través de cocultivos en agua sinté-

tica-agar (ASA), 2) evaluar la actividad lacasa y MnP en los cocultivos estudiados bajo el estrés por atrazina en ASA.

Metodología

Se empleó una cepa nativa de *T. maxima* (basidiomiceto) y *Paecilomyces carneus* aislado e identificado por Chan *et al.* (2014) y Heredia y Arias (2008), respectivamente, el resto de los micromicetos de suelo fueron aislados de suelo rizosférico de *Phragmites australis* colectado en La Macha, Actopan, Veracruz. Los cocultivos se realizaron en cajas Petri con ASA (Glucosa 40 µg/l, KH₂PO₄ 28µ/L, NH₄NO₃ 30µ/l), el cual se elaboró con base en la fórmula para agua sintética de la NOM-DIN 3841M.

La atrazina se adicionó al ASA después de su esterilización cuando tenía entre 30 y 40 °C a una concentración de 30 ppm. Los cocultivos se establecieron inoculando a *T. maxima* (1 disco micelio-agar 6 mm de diámetro) en el lado izquierdo de la caja Petri e inoculando al micromiceto filamentos del lado derecho (5 µl de una solución de 1×10^7 esporas/ml). Como controles se emplearon monocultivos de cada hongo.

Se evaluó el crecimiento radial del hongo empleando una escuadra milimétrica y se evaluó el tipo de interacción de acuerdo con la escala establecida por Badalyan *et al.*, (2004), donde se describen los siguientes tipos de interacción: a) inhibición mutua al contacto, b) inhibición a distancia, c) reemplazo con crecimiento sin inhibición al contacto, C_{A1} reemplazo parcial después de la inhibición al contacto, C_{A2} reemplazo completo después de una inhibición al contacto, C_{B1} reemplazo parcial después de una inhibición a distancia y C_{B2} reemplazo completo después de una inhibición a distancia.

La actividad enzimática se evaluó al momento de la confrontación entre *T. maxima* y el micromiceto (unión de micelios). El extracto enzimático se obtuvo tomando cinco discos de micelio-agar de la zona de confrontación y depositándolo en 5 mL de agua

desionizada estéril, el agua con los discos se agitó durante 15 min y centrifugó a 7 000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se tomó para la cuantificación de lacasa y MnP (Qian y Chen, 2012)

Resultados y discusión

Los resultados indican que *T. maxima* es compatible con *Penicillium sp.* No. 2, debido a que mostraron una inhibición al contacto. La cepa de *Trichoderma sp.*, *Paecilomyces carneus* y *Penicillium sp.* No. 1 mostraron inhibición a distancia y *Aspergillus sp.* mostró un remplazo parcial sobre *T. maxima* (cuadro 1). En sí, estas cepas no son compatibles con *T. maxima* (figura 1).

Cuadro 1
Tipo de interacción entre *Trametes maxima*
y diferentes hongos de suelo

	Micromicetos de suelo				
	TRIC	PEN1	PEN2	AS	PAE
<i>T. maxima</i>	B (2)	B (2)	A (1)	C _M (3.5)	B (2)

TRIC = *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* No.1, PEN2 = *Penicillium* No. 2, PAE = *Paecilomyces carneus*.

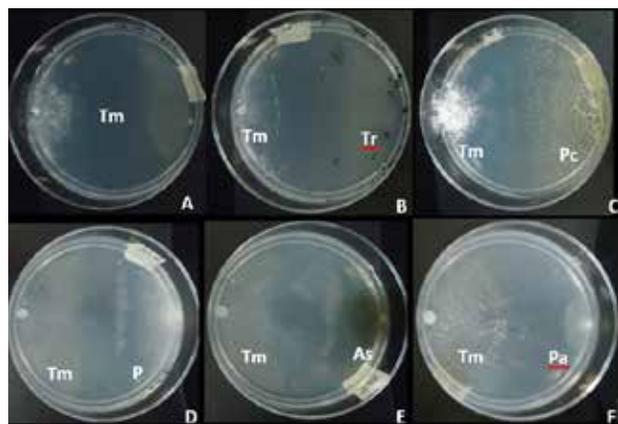


Figura 1. Tipos de interacción entre *Trametes maxima* y hongos de suelo en agua sintética agar (ASA).

En cuanto a la actividad enzimática en ASA, se encontró una mayor actividad de MnP en el cocultivo de *T. maxima-Penicillium sp.* No. 1 (8 U/L, figura 2A), comparado con el monocultivo de *T. maxima*. Sin embargo, cuando a este cocultivo se realizó en ASA suplementado atrazina (30 ppm), la actividad enzimática se inhibió significativamente ($p < 0.05$), este efecto en la actividad enzimática, representa un efecto tóxico sobre ambos hongos. Por el contrario, bajo el efecto de la atrazina, el cocultivo de *T. maxima-P. carneus* estimuló ($p < 0.05$) su actividad MnP.

Existen reportes que mencionan ambos fenómenos en organismos fúngicos, al respecto, se ha reportado un incremento en la actividad MnP de *Ganoderma lucidum* entre 2.0 y 3.3 veces más cuando se dispuso en medio de cultivo con bentazón y diuron (herbicidas) (Da Silva *et al.*, 2010). No obstante, también se ha reportado una fuerte inhibición en la producción de MnP de *C. maxima* y *C. hirsutus* al cultivarlo en un medio suplementado con 20 gm L⁻¹ de atrazina (Gorbatova *et al.*, 2006).

Respecto a la actividad lacasa, *T. maxima* no incrementó la actividad de la enzima cuando se dispuso en cocultivo en medio de ASA sin atrazina. En contraste, cuando se le adicionó atrazina al ASA y se dispuso a *T. maxima* en cocultivo con *Penicillium sp.* No. 1 y *Trichoderma sp.*, se encontró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad lacasa. Los incrementos fueron en el orden de 1.0 y 1.2 veces más con *Penicillium sp.* No. 1 y *Trichoderma sp.*, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los de Mougín *et al.* (2002), quienes encontraron un aumento en la actividad lacasa entre 3.6 y 4.0 veces al crecer a *T. versicolor* en medio de cultivo con atrazina (5 mM).

La actividad lacasa en el ASA con atrazina es mayor que cuando no se le agrega atrazina. Posiblemente este efecto sea mediado por la falta de fuentes de C y N en el ASA sin atrazina, o posiblemente el estrés por atrazina sea la razón de este incremento en la actividad enzimática, como lo reportan algunos

estudios (Gorbatova *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2005; Mougin *et al.*, 2002).

Además de la atrazina, otros herbicidas que actúan como estresores e incrementan la actividad lacasa en hongos ligninolíticos se encuentran el Bentazon, Diuron y el Imazaquín Rezende *et al.*, 2005). Los aportes de este trabajo son puntuales en cuanto a la selección de cocultivos con actividad lacasa y MnP bajo estrés por atrazina en ASA.

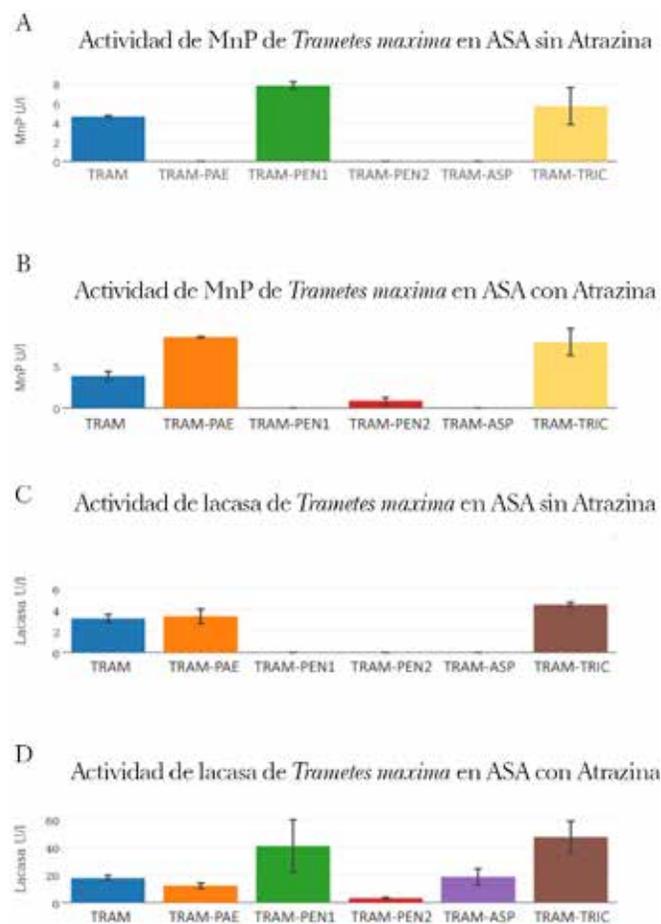


Figura 2. Actividad MnP y lacasa en el cocultivo de *T. maxima* y micromicetos de suelo en ASA con y sin atrazina.

Tomando en consideración lo mencionado, el cocultivo entre *T. maxima* y *Trichoderma sp.*, es candidata a emplear en el estudio de micorremediación de atrazina en agua contaminada, debido a su incremento en la actividad lacasa y MnP.

Conclusiones

La compatibilidad (inhibición al contacto micelial) entre *Trametes maxima* y micromicetos de suelo no se pudo relacionar con la actividad lacasa y MnP en los cocultivos. Sin embargo, ambas enzimas fueron incrementadas por la adición de atrazina en el ASA. Se propone al cocultivo *T. maxima-Trichoderma sp.* como candidato para evaluar en micorremediación de atrazina en agua contaminada.

Agradecimientos

Especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y a la doctora Refugio Rodríguez Vázquez y Wilberth Chan Cupul.

Referencias

- Badalyan, S.M., Innocenti, G., Narine, G. (2004). Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathologia Mediterranea*, 43:44-48.
- Barr, D.P., Shah, M.M., Chung, N., Aust, S.D. (1992). Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals. *Toxicology Letters*, 64-65:493-501.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H.A., Vyas, B.R. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(4): 301-312.
- Da Silva, C., Oliveira, A., Marques, S.C., Bracht, A., Peralta, R.M. (2010). Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzyme by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(2):156-161.
- Gorbatova, O.N., Koroleva, O.V., Landesman, E.O., Stepanova, E.V., Zherdev, A.V. (2006). Increase of the detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(4):468-74.

- Heredia, G., Arias, M.R. (2008). Saprobies and endomycorrhizal fungi in soils. In R.H. Manson, V.O. Hernández, S. Gallina, K. Mehlreter (Eds.), *Coffee agroecosystems of Veracruz: Biodiversity, conservation and management* (pp. 193-213). Veracruz, México: Instituto de Ecología, A.C./Instituto Nacional de Ecología.
- Hernández-Antonio, A., Hansen, A.M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(2):115-127.
- Mougin, C., Kollmann, A., Jolival, C. (2002). Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnology Letters*, 24(2):139-142.
- Qian, L., Chen B. (2012). Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*, 24(9):1639-1646.
- Rezende, M., Barbosa, A.M., Vasconcelos, F.A., Haddad, R., Dekker, R.H. (2005). Growth and production of laccase by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). *Journal of Basic Microbiology*, 45(6):460-469.
- U.S. Centers for Disease Control Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2003). *200 Toxicological Profile for Atrazine*. Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp153.html>

Curtobacterium sp. MR2 cepa que presenta dos mecanismos de resistencia al plomo y dependientes de la densidad celular

Carlos Juan Alvarado-López | Luis Gerardo Treviño-Quintanilla

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL ESTADO DE MORELOS

Laura Stephania Colín-Rosette

Junta Local de Sanidad Vegetal de Caña de Azúcar y Granos Básicos

correo-e: crlo100425@upemor.edu.mx

Resumen

Se realizaron muestreos en la Reserva de la Biósfera «Sierra de Huautla» (REBIOSH) ubicada en el municipio de Tlaquilténango, Morelos, en una zona contaminada con metales como Pb, Ag y Cd por causa de la actividad minera metalífera. Se colectaron plantas con suelo asociado a las mismas, con la finalidad de determinar si las plantas y microorganismos que se encuentran en estos jales mineros tienen el potencial para ser utilizadas en biorremediación. Se colectaron e identificaron once especies de plantas: *Dalea leporina* (Ait.) Bullock, *Gomphrena serrata* L., *Aldama dentata* Llave et Lex., *Meloquia tomentosa* L., *Dicliptera peduncularis* Nees, *Sigesbeckia jorullensis* Kunth, *Salvia riparia* Kunth, *Sanvitalia procumbens* Lam, *Senna obtusifolia* L., *Borreria suaveolens* G. Mey y Liqueen; también se identificó en el sitio la especie *Acacia farnesiana* (L) Willd (CONABIO, 2009). A partir de las muestras de suelo colectadas se cultivaron y aislaron bacterias a las que se les realizaron pruebas de resiliencia en concentraciones de 200, 400, 800 y 1200 ppm de Pb^{+2} en forma de $Pb(NO_3)_2$, y se obtuvieron siete cepas que logran crecer a 800 ppm de plomo y una cepa que logra crecer a 1200 ppm, de estas cepas aisladas, dos fueron utilizadas para identificación, mediante la secuenciación de su ADN ribosomal 16S. Las secuencias obtenidas se compararon con un alineamiento BLASTN y se tuvo como resultado que pertenecen a los géneros *Curtobacterium* sp. y *Bacillus* sp. Se encontró que la cepa de *Curtobacterium* utiliza posiblemente el mecanismo de secuestro extracelular para tolerar altas concentraciones de Pb, lo anterior debido a que se observó la producción de un hexopolisacárido cuando existe en el medio gran número de células bacterianas y acumulación y oxidación de plomo intracelularmente cuando la cepa se encuentra con un mayor grado de dilución.

Palabras clave: *Curtobacterium* sp. MR2, biorremediación, metales pesados.

Introducción

Los metales pesados se encuentran de forma natural en la corteza terrestre. Éstos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. En general, esto puede ocurrir durante la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o por su liberación al ambiente de efluentes industriales y emisiones vehiculares. Además, la inadecuada disposición de residuos metálicos también ha ocasionado la contaminación del suelo, agua superficial y subterránea, y de ambientes acuáticos (SEMARNAT, 2009).

La contaminación ha degradado el suelo ocasionando que pierda su calidad, un ejemplo de esto es la contaminación con metales pesados, que causa daños severos tanto al ambiente como a la salud humana. En México, como consecuencia del desarrollo industrial, se registra una creciente contaminación ambiental, sobre todo a causa de varios siglos de actividad minera.

La industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en el país, ésta es mayoritariamente metálica y se dedica principalmente a la producción de Cu, Zn, Ag y Pb. El plomo es un contaminante ambiental persistente que se acumula en los tejidos de los seres vivos generando la biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. Afortunadamente existen microorganismos capaces de adaptarse a condiciones extremas sin sufrir impactos significativos (Naik & Dubey, 2013).

Metodología

Procesamiento del suelo

Se realizaron dos muestreos aleatorios simples en la zona contaminada con jales mineros en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla. El muestreo, embalaje y procesamiento del suelo se basó en la norma técnica NMX-AA-132-SCFI-2006. De acuerdo con la norma, antes de llevarse a cabo el molido de

las muestras de suelo se retiraron las piedras y restos vegetales, una vez que el suelo fue disgregado, las muestras fueron cribadas en una malla de 9.51 mm y posteriormente por una de 2 mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable.

La parte de la muestra que logró pasar por ambas mallas es la que tiene el grado de fineza conveniente para cuantificar los metales pesados. Después se realizó digestión ácida, para efectuar este procedimiento se pesaron aproximadamente 2 g de suelo, las muestras fueron digeridas con la adición de 10 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3) y 3 mL peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% hasta que no hubo reacción de efervescencia, se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico a la digestión inicial para aumentar la solubilidad de los metales, y la muestra se calentó durante quince min a 95 °C cuidando que no hirviera, se dejó enfriar y se filtró con papel Whatman número 41.

El papel filtro se enjuagó con ácido clorhídrico caliente y en seguida con agua para solubilizar las partículas de suelo, la solución se llevó hasta un volumen final de 100 mL. Después de realizar la digestión ácida a todas las muestras se determinó la concentración de plomo mediante absorción atómica (EPA, 1996).

Identificación y procesamiento de especies vegetales

Se realizaron dos muestreos aleatorios simples de las plantas que crecen en el sitio contaminado, cuidando tomar desde las raíces y procurando no dañar las muestras. Luego se embalaron y etiquetaron con clave de identificación, descripción de la planta, fecha y lugar de muestreo. Se pusieron en una hielera para ser transportadas y protegidas del calor y la radiación solar.

Una vez que las plantas llegaron al laboratorio se pesaron y lavaron con agua destilada, las plantas colectadas en el primer muestreo fueron trasladadas al Jardín Etnobotánico de Morelos, donde fueron

identificadas y las que se colectaron en el segundo muestreo se usaron para análisis mediante absorción atómica. Cada muestra vegetal se secó en estufa a una temperatura de 60 °C durante 72 h, fueron molidas y tamizadas con malla número dieciséis y con malla número sesenta, después se les realizó digestión ácida y por último se les aplicó espectrofotometría de absorción atómica.

Aislamiento y cultivo de microorganismos resistentes a plomo

Se prepararon y esterilizaron soluciones de 10 g/L de nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$. Cada una de las soluciones se mezcló con el medio de cultivo a concentraciones de Pb^{2+} de 200, 400, 800 y 1200 ppm.

Se pesaron 5 g de cada muestra de suelo y se colocaron en matraces Erlenmeyer con 45 mL de agua estéril y perlas de vidrio, posteriormente se agitaron en una incubadora orbital por 30 min a 30 °C. Una concentración final de 0.1 g/mL de estas soluciones se diluyó de manera serial a 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} y 1×10^{-8} g/mL y se sembró por dispersión con perlas de vidrio alícuotas de 100 μ L de las diluciones 1×10^{-3} , 1×10^{-4} y 1×10^{-5} sobre el medio de cultivo nutritivo bajo en fósforo y nitrógeno adicionado con 200 ppm de $Pb(NO_3)_2$, se incubaron a 28.6 °C por 48 h (revisando a las 24 h de incubación).

Se identificaron morfológicamente las colonias que crecieron y después se sembró cada colonia por estriado general en cajas Petri de 35 x 10 mm que contenían medio de cultivo con 200 mg/L de $Pb(NO_3)_2$ (Jin, 2013).

De las cajas anteriores se tomó una asada y se sembró por estriado en tres campos en medio con 200 ppm de $Pb(NO_3)_2$, se incubaron por 24 h y se evaluaron cualitativamente con tres cruces las que tuvieron mayor tamaño y densidad colonial, las cepas que obtuvieron tres cruces se dejaron crecer a temperatura ambiente y tres días después se tomó de las cajas anteriores las colonias que estaban ya aisladas y se sembraron en estría general, se incubaron

por 48 h en medio con 200 ppm de $Pb(NO_3)_2$ y se hizo una dilución de cada colonia hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 600 nm de cada cepa, sólo se logró hacer dilución de siete de las ocho cepas debido a que una de ellas (MR6) no solubilizó adecuadamente en el agua.

A partir de esta concentración de células se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-8} y se procedió a practicar una prueba de resiliencia a estas siete cepas (Jin, 2013).

Resultados y discusión

En el cuadro 4 se presentan los resultados derivados del análisis de las concentraciones de plomo tanto en suelo como en tejido vegetal. Se puede ver que el sitio de estudio se encuentra contaminado con un promedio de 1 310.066 mg de Pb/kg de suelo, esta concentración supera el límite máximo permisible de plomo en suelo de uso industrial que se encuentra en 800 mg/kg según la norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

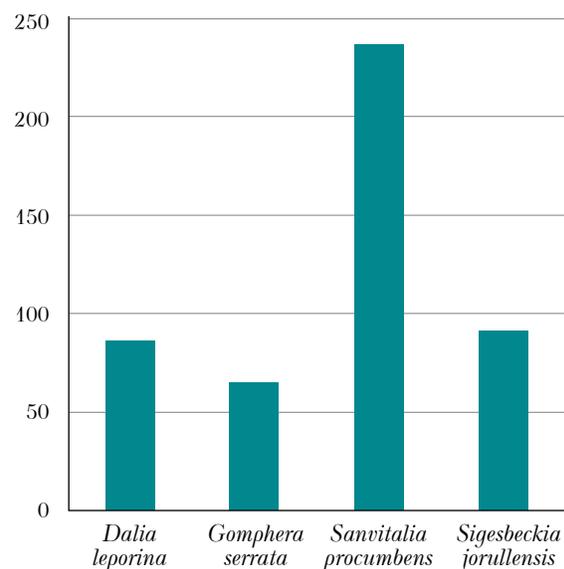


Figura 4. Concentración de plomo en tejido vegetal, medida por espectroscopia de absorción atómica.

Como se observa en la figura 4, la especie vegetal que tuvo mayor concentración de plomo acumu-

Cuadro 1
Concentraciones de Pb analizadas mediante FAAS

Nombre científico	Cs (mg/kg)	Bp (mg)	Cp (mg/kg)	Mg (mg/kg) Cp*Bp	FBC
<i>Dalea leporina</i>	1893.49	2000	87.371	174742	0.0461
<i>Gomphrena serrata</i>	415.79	2049	65.3325	133866.2	0.157
<i>Sanvitalia procumbens</i>	1609.47	1649.4	236.7963	390571.8	0.147
<i>Sigesbeckia jorullensis</i>	1309.47	2523	91.1163	229886.4	0.0696

Cs = concentración de Pb en el suelo, Bp = biomasa seca de la planta, Cp = concentración de Pb en la planta, Mg = cantidad de plomo en mg removida por la planta, FBC = Factor de Bioconcentración.

lado en sus tejidos fue la *Sanvitalia procumbens* que se encuentra abundantemente en los jales mineros. Esta especie presenta muy poca generación de biomasa debido a que su metabolismo se enfoca en la extracción y acumulación del metal pesado.

A partir de la especie vegetal *Dalea leporina* (MR), se aislaron seis morfologías bacterianas (cuadro 2) de las cuales destaca la número dos por tolerar hasta 1200 ppm de Pb en la prueba de resiliencia, además de mostrar evidencia de utilizar el mecanismo de secuestro extracelular de metales pesados por medio de la generación de hexopolisacárido.

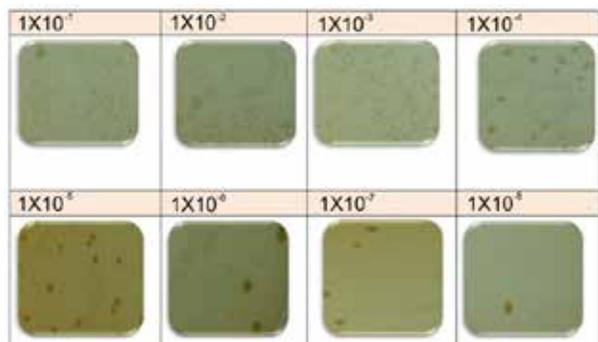
En el cuadro 3 se puede observar el cambio fenotípico que presenta la cepa de *Curtobacterium sp.* en una dilución seriada, cuando las diluciones son pequeñas, caso de las diluciones 1×10^{-1} a 1×10^{-4} , las colonias son levemente amarillentas y bastante mucosas debido a la producción de hexopolisacárido, caso contrario en las diluciones grandes de 1×10^{-5} a 1×10^{-8} donde se observa una reducción de la mucosidad y la oxidación del plomo lo cual genera el cambio de coloración.

Cuadro 2
Morfología bacteriana de las colonias que crecieron a partir del suelo asociado a la especie vegetal *Dalia leporina*

Muestra MR	
Colonia	Morfología colonial
1	Colonias pequeñas (2 mm), color amarillo con borde liso y traslúcidas.
2	Colonias medianas (5 mm), color blanco con bordes definidos, mucosa y traslucida.
3	Colonias medianas (5mm), color blanco con bordes irregulares, opacas con borde traslúcido.
4	Pequeñas (2 mm), blancas con borde liso, opacas pero dejan pasar la luz.
5	Grande (1 cm), amarilla en el centro y traslúcida en los bordes presenta iridiscencia (posible <i>Pseudomonas</i>).
6	Mediana (5 mm) y blanca con borde irregular y grisáceo.

Cuadro 3

Morfología de la cepa MR2 *Curtobacterium sp.* en medio bajo en fósforo y nitrógeno adicionado con 400 ppm de $Pb(NO_3)_2$



Las especies vegetales muestreadas que se identificaron y que destacan por haber sido reportadas previamente o debido a que a partir de su suelo asociado se aislaron los microorganismos con mayor resistencia a plomo se enuncian a continuación:

Dalea leporina. Aunque no se encontró distribuida en toda la zona de estudio, tuvo una amplia variedad de morfología bacteriana, adicionalmente, a partir de la rizósfera de esta planta se aisló la cepa *Curtobacterium sp.*, que es la cepa con mayor tolerancia al $Pb(NO_3)_2$ en las concentraciones ensayadas en la prueba de resiliencia, además de ser la especie de planta que crece en la mayor concentración de plomo registrada en los jales mineros siendo 1893.491 mg/kg.

Aldama dentata la Llave. Se encontró en el sitio, presenta alteraciones morfológicas, específicamente una disminución en el crecimiento, lo cual indica, que si bien presenta resistencia a la concentración de metales pesados, ya que se crece en la zona contaminada, los niveles elevados de metales pesados podrían estar influyendo en la disminución de la producción de biomasa.

Sanvitalia procumbens. Se encuentra en grandes cantidades sobre los jales mineros y es la especie con mayor acumulación de plomo con 1607.5 mg/kg; no obstante, ninguna morfología colonial aislada del suelo aledaño a esta especie vegetal logró ser seleccionada para la prueba de resiliencia.

Conclusiones

Se obtuvo un total de 54 bacterias aerobias aisladas de las muestras de los jales mineros que se ubican en la REBIOSH, todas crecieron en medio mineral bajo en fósforo y nitrógeno adicionado con 200 ppm de $Pb(NO_3)_2$. Ocho de estas cepas se sometieron a concentraciones de 400 a 1200 ppm de $Pb(NO_3)_2$ en una prueba de resiliencia.

Se seleccionaron tres bacterias con potencial de biorremediación de plomo, de éstas tres cepas se logró identificar dos de ellas *Curtobacterium sp.* (MR2), cepa asociada a la especie vegetal *Dalea leporina* y *Bacillus sp.* (H20 6), cepa asociada a la especie vegetal *Acacia farnesiana*, ambas cepas han sido reportadas por diversos autores para ser utilizadas en biorremediación. Aunado a esto, se comprobó que las plantas que crecen sobre los jales mineros son capaces de tolerar niveles elevados de plomo, incluso superiores a los establecidos en la norma, además de ser capaces de extraerlo y acumularlo en sus tejidos.

Referencias

- Jin, Z.M. (2013). Isolation of Burkholderia cepacia JB12 from lead and cadmium contaminated soil and its potential in promoting phytoremediation with tall fescue and red clover. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(7):449-455.
- Naik, M.M., Dubey, S.K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98:1-7.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2007). Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, *Diario Oficial*. Recuperado de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2004). *Primer informe del proyecto Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*.



Remoción de Cromo (VI) en solución por la cáscara de semilla de calabaza (*Cucurbita máxima* Duch)

Karen Ruiz-Trujillo | Juan F. Cárdenas-González
| María de Guadalupe Moctezuma-Zárate | Ismael Acosta-Rodríguez
Facultad de Ciencias Químicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUÍS POTOSÍ

Víctor M. Martínez-Juárez
Instituto de Ciencias Agropecuarias | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

correo-e: iacosta@uaslp.mx

Resumen

En este trabajo se analizó la capacidad de remoción de Cromo (VI) en solución por cáscara de semilla de Calabaza, determinando la concentración del metal por el método de la Difenilcarbazida, se descubrió que la remoción total del metal (50 mg/L) ocurre a los 150 min, a pH de 1.0 y 40 °C, con 1 g de biomasa, mientras que con 5 g la remoción total del metal ocurre a los 25 min. En las concentraciones de Cr (VI) analizadas, la cáscara de semilla mostró gran capacidad de remoción, pues a los 45 min de incubación, la biomasa estudiada remueve 1.0 g de Cr (VI) con la producción simultánea de Cr (III), y en un ensayo de biorremediación de tierra y agua contaminados con el metal, se eliminó a los 7 días de incubación, por lo que dicha biomasa puede utilizarse para eliminarlo de aguas residuales industriales.

Palabras clave: remoción, Cromo (VI), biomasa, cáscara de semilla.

Introducción

Debido a las actividades industriales, como la producción de acero, minería, cemento y curtido de pieles, ciertas zonas de la república mexicana tienen altos niveles de cromo en suelo y agua (Vitti & Pace, 2006). El uso de lodos de aguas negras o de fertilizantes con diferentes concentraciones del catión, en algunas prácticas agronómicas, son otros de los factores contribuyentes a la contaminación ambiental por el metal.

En las aguas residuales, el Cr (VI), se encuentra en solución como CrO_4^{2-} (2), puede removerse por reducción, por precipitación química, por adsorción y por intercambio iónico (Cotton & Wilkinson, 1980). Recientemente, se ha analizado el uso de metodologías alternativas, como la remoción y/o reducción de Cr (VI) a Cr (III) por bacterias, algas, levaduras y hongos (Cervantes *et al.*, 2004).

Por otro lado, también se han utilizado materiales de desecho, como residuos industriales agrícolas o urbanos para la eliminación o recuperación de metales pesados de efluentes industriales contaminados, entre los que se encuentran: residuos de manzana, corteza de árbol, cáscara de avellana, cáscara de naranja y tamarindo (Verma *et al.*, 2006), con resultados altamente satisfactorios.

Interesa analizar otros materiales de desecho y por lo tanto económicos, para tratar de eliminar este metal de aguas y suelos contaminados, así como la biorremediación de los mismos. La finalidad de este estudio fue examinar la remoción de Cromo (VI) por la cáscara semilla de Calabaza (*Cucurbita máxima* Duch).

Metodología

Se utilizó la biomasa celular de la cáscara de semilla de Calabaza, obtenida de diferentes mercados sobre ruedas de la ciudad de San Luis Potosí, México. Se trabajó con 100 mL de una solución de 50 mg/L de Cr (VI), obtenida por dilución de una solución patrón de

71.86 mg/L preparada en agua tridesionizada a partir de K_2CrO_4 . Se ajustó el pH de la dilución a analizar con H_2SO_4 1 M y NaOH 1 M, antes de adicionarla a la biomasa celular.

Para los estudios de remoción, 1g de biomasa celular se mezcló con 100 mL de una solución de 50 mg/L del metal (a diferentes pH's y 28 °C) y se incubaron con agitación constante (100 rpm), y a diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 5 mL cada una, se centrifugaron a 3000 rpm (5 min), y al sobrenadante respectivo se le determinó la concentración de Cr (VI), utilizando el método colorimétrico de la difenilcarbazida (Greenberg *et al.*, 1992). Los límites de detección se encuentran en un rango de 0.02-05 µg/L de Cr (VI).

Resultados y discusión

Se encontró que la mayor remoción se obtiene a un pH de 4.0 (100%), a las 8 h de incubación (figura 4). Cambios en la permeabilidad, de origen desconocido, podrían explicar en parte las diferencias encontradas en el tiempo de incubación, proporcionando mayor o menor exposición de los grupos funcionales de la pared celular de la biomasa (Kratochvil & Volesky, 1998).

Para las biomásas naturales, la mayoría de los autores reportan un pH óptimo de 2.0, por ejemplo semillas de tamarindo (Agarwal *et al.*, 2006), bagazo y pulpa de caña de azúcar (Sharma & Forster, 1994), y un pH de 3.0 para la cáscara de tamarindo tratada con ácido oxálico (Popuri *et al.*, 2007). El Cromo (VI) se encuentra como HCrO_4^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, CrO_4^{2-} , $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$, $\text{Cr}_5\text{O}_{10}^{2-}$ (11). Una baja en el pH causa la protonación de la superficie del adsorbente incrementando la bioadsorción en la solución. Sin embargo, cuando el pH aumenta, se incrementa la concentración de iones OH^- , lo que impide la bioadsorción de los iones Cromo (VI) cargados negativamente (12).

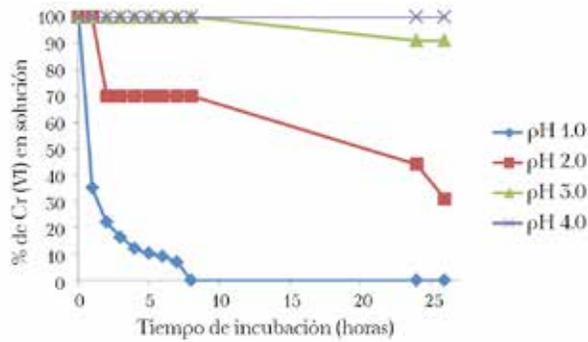


Figura 1. Efecto del pH sobre la remoción de 50 mg/L de Cromo (VI) en solución por la biomasa de la cáscara de semilla de Calabaza. 28 °C. 100 rpm. 1 g biomasa.

Referente a la temperatura de incubación, se observó que a 40, 50 y 60 °C, la remoción es total a los 150 min (figura 2), resultados que son menores a los reportados para las cáscaras de litchi y naranja con un 100% de remoción a los 6 y 10 min., (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2012a; 2012b). El incremento en la temperatura aumenta la velocidad de remoción de Cromo (VI) y disminuye el tiempo de contacto requerido para la completa remoción del metal.

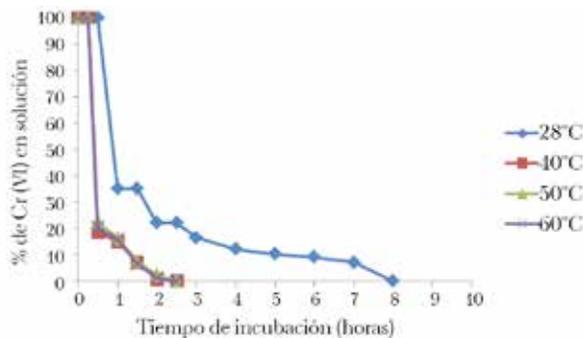


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la remoción de 50 mg/L de Cromo (VI) en solución por la biomasa de la cáscara de semilla de Calabaza. pH 1.0. 100 rpm. 1 g biomasa.

También se encontró que la concentración del metal no influye en la remoción del mismo, pues 200 y 1000 mg de Cr (VI) se eliminan a los 45 min a 40 °C como se observa en la figura 3. Con respecto a las otras biomásas utilizadas, la mayoría de los autores reportan menores eficiencias de remoción del metal, por ejemplo: 45 mg/L por la corteza de euca-

lipto (Sarin & Pant, 2006); 13.4 y 17.2 mg/L por bagazo y pulpa de caña de azúcar (Kratochvil & Volesky, 1998).

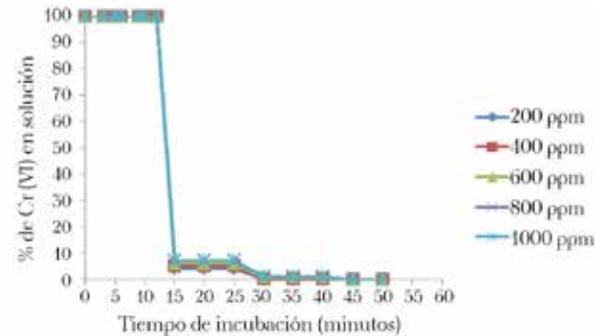


Figura 3. Efecto de la concentración de Cromo (VI) sobre la remoción del mismo, por la biomasa de la cáscara de semilla de Calabaza. pH 1.0. 100 rpm. 1 g biomasa. 40 °C.

Al aumentar la cantidad de biomasa, también se incrementa la remoción de Cromo (VI) en solución como se observa en la figura 4, pues 5 g de la cáscara remueven el 100% del metal a los 25 min, a 28 °C, debido a que hay más sitios de bioadsorción del metal. Resultados similares se han reportado para la cáscaras de litchi y naranja (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2012a; 2012b), *R. nigricans*, aunque este último con 10 g de biomasa (Bai and Abraham, 2001), pero son diferentes a lo reportado por Zubair *et al.*, (2008) para la biomasa de los desechos de la mandarina (gabazo), quienes reportan una concentración óptima de biomasa de 100 mg/L.

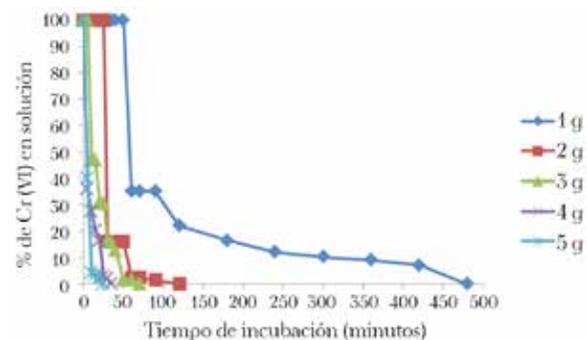


Figura 4. Efecto de la concentración de biomasa sobre la remoción de 50 mg/mL de Cromo (VI). pH 1.0. 100 rpm. 28 °C.

Conclusiones

La biomasa analizada tiene la capacidad de remover eficientemente Cr (VI) en solución y es por esta característica que puede ser usada en la descontaminación de efluentes industriales conteniendo dicho metal, por lo que la aplicación de esta tecnología presenta un gran potencial para la eliminación de éste; además de que la biomasa es natural, fácil de obtener y transportar en grandes cantidades.

Referencias

- Acosta-Rodríguez, I., Martínez-Pérez, R., Cárdenas-González, J.F., Moctezuma-Zárate, M.D., Martínez-Juárez, V.M. (2012a). Hexavalent Chromium Removal by *Litchi chinensis* Sonn Peel. *American Journal of Biochemistry & Biotechnology*, 8(1):7-13.
- Acosta-Rodríguez, I., González-Sánchez, H.M, Moctezuma-Zárate, M.G., Cárdenas-González J.F., Martínez-Juárez, V.M. (2012b). Remoción de Cromo (VI) en solución por la biomasa de la cáscara de naranja (*Citrus sinensis* Osbeck). *Tlatemoani*, (9):4-17.
- Agarwal, G., Bhuptawat, H., Chaudhari, S. (2006). Biosorption of aqueous chromium (VI) by *Tamarindus indica* seeds. *Bioresource Technology*, 97(7):949-956.
- Bai, S., Abraham, T. (2004). Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. *Bioresource Technology*, 79(1):73-81.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R. (2004). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3): 335-347.
- Cotton, F. & Wilkinson, G. (1980). *Advanced Inorganic Chemistry* (4a Ed.). Chichester, UK: John Wiley&Sons.
- Gadd, G., Griffiths, A. (1980). Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(2):387-392.
- Greenberg, A., Clesceri, L., Eaton, A. (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (18a. Ed.). Washington, D.C: American Public Health Association.
- Kratochvil, D., Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16(7):294-300.
- Rao Popuri, S., Jammala, A., Reddy, N.S., Venkata, K., Abburi, K. (2007). Biosorption of hexavalent chromium using tamarind (*Tamarindus indica*) fruit shell—a comparative study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3):358-367.
- Rollinson, C.L. (1973). Chromium, molybdenum and tungsten. In T. Dickson (ed.), *Comprehensive Organic Chemistry* (3a. ed.) (pp. 694-694). Oxford, UK: Pergamon Press.
- Sarin, V., Pant, K.K. (2006). Removal of chromium from industrial waste by using eucalyptus bark. *Bioresource Technology*, 97(1):15-20.
- Sharma, D., Forster, C. (1994). A preliminary examination into the adsorption of hexavalent chromium using low-cost adsorbents. *Bioresource Technology*, 47(3):257-264.
- Verma, A., Chakraborty, S., Basu, J. (2006). Adsorption study of hexavalent chromium using tamarind hull-based adsorbents. *Separation and Purification Technology*, 50(3):336-341.
- Viti, C., Pace, A., Giovannetti, L. (2003). Characterization of Cr (VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity. *Current Microbiology*, 46(1):0004-0005.
- Zubair, A., Bhatti, H.N., Hanif, M.A., Shafqat, F. (2008). Kinetic and equilibrium modeling for Cr (III) and Cr (VI) removal from aqueous solutions by *Citrus reticulata* waste biomass. *Water, Air and Soil Pollution*, 191(1-4):305-348.

Biorremediación por bioestimulación y bioaumentación con microorganismos nativos de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos

Alejandro Islas-García | Maribel Peralta-Rodríguez | Libia Vega-Loyo
| Ricardo López-Aguilar | Refugio Rodríguez-Vázquez

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados | INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

correo-e: rrodrig@cinvestav.mx

Resumen

La contaminación de suelos agrícolas por hidrocarburos es uno de los principales problemas derivados de fugas o derrames durante su transporte. En el presente trabajo se realizó la biorremediación mediante la bioestimulación y bioaumentación con dos microorganismos aislados del mismo suelo contaminado. Se observó una remoción de hidrocarburos rango diesel (HRD) del 3 al 31% para tratamientos bioaumentados con *Bacillus sp.*, y del 12 al 78% con *Meyerozima sp.* Asimismo del 11 al 93% con ambos microorganismos. Sin embargo, estos valores fueron similares, 31 al 81%, al tratamiento de bioestimulación. Por lo que para este suelo resultó que la bioestimulación es la alternativa más factible para la remoción de los contaminantes de este suelo agrícola, comparada con la bioaumentación.

Palabras clave: remoción, diesel, microcosmos.

Introducción

En los procesos de biorremediación existen dos opciones: la bioestimulación y la bioaumentación. La bioestimulación de un sistema contaminado es la introducción de nutrientes, en particular los fertilizantes orgánicos y inorgánicos, con el fin de promover el crecimiento y estimular a los microorganismos autóctonos con capacidad de degradar los contaminantes de interés (Juwarkar *et al.*, 2010; Pankrantz, 2004).

La bioaumentación es la adición de cepas o consorcios de microorganismos nativos y no-nativos para eliminar su contaminación (Fantroussi & Agathos, 2005). En el presente trabajo se determinó la remoción de Hidrocarburos Rango Diesel (HRD: C₁₀ a C₂₈) de un suelo agrícola, mediante bioestimulación y bioaumentación con dos cepas previamente aisladas del mismo suelo agrícola contaminado; una bacteria (*Bacillus sp.*) y una levadura (*Meyerozima sp.*) (Islas-García, 2014).

Metodología

La biorremediación del suelo se realizó a nivel microcosmos en frascos serológicos de vidrio de 125 mL, conteniendo 30 g de suelo. El diseño experimental consistió de 6 tratamientos y 2 controles, en todas las pruebas se aplicó la bioestimulación, excepto un control. La bioestimulación se efectuó a una proporción de nutrientes (C:N:P) de 100:10:1, con adición nitrógeno y fósforo ((NH₄)₂SO₄ y KH₂PO₄), micronutrientes hierro y magnesio (Fe SO₄ y MgSO₄), paja de trigo como material orgánico y con el ajuste de la humedad al 50% de la Capacidad de Campo y fueron aireados cada 2 días. La bioaumentación consistió en la inoculación de 4mL conteniendo 2.65x10⁸ UFC/ml de *Bacillus sp.* y/o 4.38 x10⁸ UFC/ml de *Meyerozima sp.* A los 20 días de tratamiento se efectuó nuevamente la bioestimulación para reacondicionar los microcosmos.

Los tratamientos T1 (no estéril) y T2 (estéril) se bioaumentaron con *Bacillus sp.*, T3 (no estéril) y T4 (estéril) se bioaumentaron con *Meyerozima sp.*; T5 (no estéril) y T6 (estéril) se bioaumentaron con ambas cepas. El control C (no estéril) no se bioestimuló ni bioaumentó, CB (no estéril) sólo se bioestimuló pero no se bioaumentó. Las variables respuesta fueron: Remoción de HRD a los 10, 20 y 30 días de tratamiento y la producción de CO₂ (cada 2 días), para determinar indirectamente la actividad microbiológica de cada microcosmos.

La determinación HRD se realizó mediante el método de extracción EPA3546 (2007) en un horno de microondas CEM MARS-Xpress y el análisis por cromatografía de gases con detector de ionización de flama con el método EPA8015C (2007). Se empleó un cromatógrafo Thermo Scientific modelo GC Focus Series, equipado con columna capilar GRACE de 30 m de longitud por 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de capa ATTM-5, como gas acarreador se utilizó nitrógeno y como gases auxiliares hidrógeno y aire. Condiciones del equipo: inyector 250 °C (split flow: 39ml/min), detector 250 °C y columna 50-270 °C (rampa en 17.67 min). Las muestras se concentraron a un volumen de reconstitución de 2 mL y se inyectó 1 µL en el cromatógrafo de gases.

La determinación de la producción de CO₂ en los microcosmos se realizó mediante un cromatógrafo de gases GOW-MAC Modelo SERIES 580, columna concéntrica empacada ALLTECH CTR 8700, el gas acarreador fue el helio. Condiciones del equipo: inyector 40 °C, detector a 100 °C, corriente 125mA, columna temperatura ambiente (25 °C) (corrida de 4.0 min). El volumen inyectado de muestra fue de 2 mL.

Resultados y discusión

La producción de CO₂ se reporta como el CO₂ total acumulado durante los 30 días (figura 1). De esta manera se observó que los tratamientos T3 y T5 presentaron la mayor cantidad de CO₂ durante el

proceso de remediación, seguidos T1 y T2. Por otro lado, los tratamientos con menor producción de CO₂ fueron los tratamientos T4 y T6. El control C no mostró producción de CO₂, mientras que el control CB sí presentó una alta producción.

La alta o baja producción de CO₂ indican la actividad metabólica en cada tratamiento, pero el CO₂ no necesariamente es proporcional con la remoción del contaminante, debido a que quizá existen otros factores abióticos (fotólisis e hidrólisis) y bióticos como descomposición de materiales orgánicos que también generan CO₂. Esto nos demuestra la complejidad de los procesos microbianos y fisicoquímicos que suceden en los sistemas de suelos.

Se observó que los tratamientos inoculados con *Bacillus sp.* presentaron valores de remoción de HRD de 3 a 18% en el tratamiento T1 (no estéril) y de 11 a 31% en el T2 (estéril), determinando que cuando sólo está presente *Bacillus sp.* en el suelo contaminado existe una mayor remoción, en comparación al suelo (no estéril) con microorganismos nativos (figura 2). De forma similar en los tratamientos con *Meyerozima sp.* se observó para T3 (no estéril) remociones del 12 al 28% y para el T4 (estéril) del 12 al 78% (figura 2).

En los tratamiento inoculados con *Bacillus sp.* y *Meyerozima sp.* se presentaron los mayores valores de remoción con el 11 al 86% en el tratamiento (T5) (no estéril) y del 14 al 93% en el (T6) (estéril), demostrando que en conjunto estos microorganismos presentan una mayor remoción del contaminante.

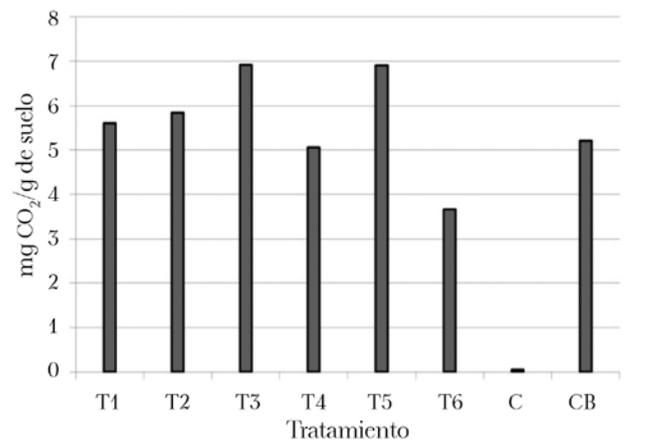


Figura 1. Producción total acumulada de CO₂ en los diferentes tratamientos.

Estos resultados nos indican que estas cepas, aisladas del mismo suelo contaminado tienen la capacidad de degradar este contaminante. Pero en presencia de los microorganismos nativos del suelo la remoción disminuye, tal vez debido a la competencia e inhibición entre las poblaciones inoculadas y las nativas. En general, se observó que remoción a los 10 y 20 días es baja en todos los microcosmos, mientras que la mayor remoción se presentó a los 30 días de tratamiento.

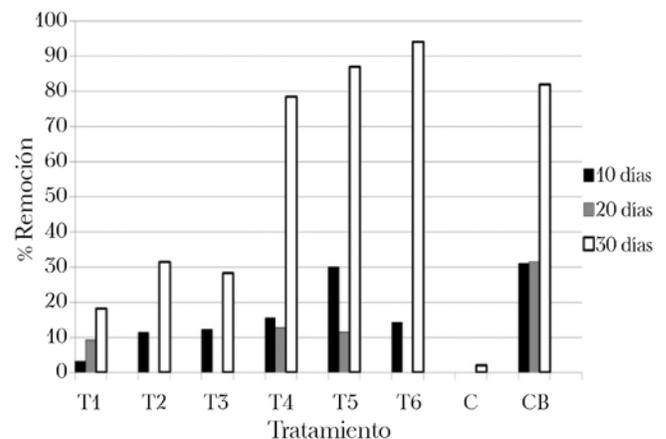


Figura 2. Remoción de HRD en diferentes tiempos y diferentes tratamientos.

El control C (no estéril) presentó una mínima remoción de 0 a 2%. Mientras que el control CB (no estéril estimulado) presentó valores de remoción de HRD del 31 al 81%, mostrando que la bioestimulación de los microorganismos nativos, sin inoculación de otros, puede degradar adecuadamente el contaminante.

Estos resultados denotan que no siempre la bioaumentación favorecerá la remoción del contaminante y que la bioestimulación puede ser suficiente para realizar la biorremediación del suelo impactado. Esto ha sido previamente reportado en otros trabajos, donde mencionan que la adición de microorganismos no aumentan las velocidades de degradación con respecto a lo que se consigue únicamente añadiendo nutrientes para estimular a la población microbiana nativa (Lee y Merlin, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003).

Conclusiones

De acuerdo con los resultados se puede concluir que *Bacillus sp.* y *Meyerozima sp.* son microorganismos capaces de degradar los HRD; sin embargo, en presencia de las especies nativas del suelo contaminado, la degradación disminuye, probablemente por efecto de competencia.

Por otra parte se observó que los valores de remoción de los contaminantes en los microcosmos bioaumentados son similares al bioestimulado. De ahí que se demuestra que la bioestimulación es una alternativa más viable que la bioaumentación para la remediación de estos suelos agrícolas impactados.

Además es importante en la evaluación de las alternativas de biorremediación (bioestimulación o bioaumentación) de sistemas contaminados; realizar pruebas exploratorias previas a su aplicación a nivel de campo.

Referencias

- Environmental Protection Agency (EPA) (2000). *Method 8015C. Nonhalogenated organics by gas chromatography (FID)*. Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-8015c.pdf>
- Environmental Protection Agency (EPA) (2007). *Method 3546. Microwave extraction*. Recuperado de <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3546-microwave-extraction>
- Fantroussi, S., E.I., Agathos, S. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3):268-275.
- Islas-García, A. (2014). *Biorremediación de suelos agrícolas contaminados con plaguicidas e hidrocarburos* (Tesis Doctoral). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, México.
- Juwarkar, A., Singh, S., Mudhoo, A. (2010). A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(3):215-288.
- Lee, K., Merlin, F. (1999). Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines. *Pure and Applied Chemistry*, 71(4):461-471.
- Pankrantz, T. (2004). *Environmental Engineering Dictionary and Directory*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Van Hamme, J., Singh, A., Ward, O. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):503-549.



Evaluación de la fidelidad genética de plantas micropropagadas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) mediante marcadores RAPD

Luis Alfonso Muñoz-Miranda | Araceli Rodríguez-Sahagún
Gustavo Javier Acevedo-Hernández | Osvaldo Adrián Castellanos-Hernández
Centro Universitario de la Ciénega | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

correo-e: ocnosc@gmail.com

Resumen

Lippia graveolens HBK es una planta aromática de importancia económica en México, ha sido principalmente colectada de poblaciones silvestres. La propagación de manera natural es por lo general con semillas, que presentan un porcentaje de germinación bajo (40%). El cultivo de tejidos vegetales con yemas axilares propone una alternativa para la propagación de plantas. En el presente trabajo se reporta la evaluación de la fidelidad genética, mediante marcadores moleculares tipo RAPD de plantas de orégano obtenidas con la técnica de propagación de yemas axilares, que se realizó en medio MS con 0.5 mg/L de BA.

Palabras clave: *Lippia graveolens*, marcadores moleculares, fidelidad genética.

Introducción

Lippia graveolens (familia *Verbenaceae*), conocida como orégano mexicano, es una especie aromática nativa del sur de Estados Unidos de Norteamérica, México y parte de América Central (Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2010).

México es uno de los países con mayor producción de orégano a nivel internacional, ya que aporta el 35 o 40% de la producción mundial. Se calcula que la producción anual en nuestro país es de 4 000 toneladas, de las cuales el 90% es exportado a los Estados Unidos (Villavicencio *et al.*, 2007).

El orégano mexicano es usado sobre todo como condimento y conservador en muchos alimentos típicos de México. El aceite esencial extraído a partir de las hojas se ha utilizado en la industria farmacéutica, licorera y cosmetológica. Además se le ha conferido varias propiedades medicinales, antimicrobianas y antioxidantes (Arcila-Lozano *et al.*, 2004; Ávila-Sosa *et al.*, 2010).

Su propagación, de forma natural, se realiza principalmente por semillas, aunque también se emplea el cultivo por estacas. El aprovechamiento se efectúa en poblaciones naturales durante el periodo de floración, alterando el desarrollo normal del fruto y de la semilla. Además de las malas prácticas de recolección, que generan una reducción del tamaño y la densidad de la población, se ha reportado que sólo el 44% de los frutos producen de una a dos semillas. Aunado a ello, la baja germinación de las semillas ha acarreado problemas para la propagación del cultivo (Ocampo-Velázquez, 2009; González-Nieves *et al.*, 2010).

Para tener una producción estable y continua de plantas de orégano que sirvan para originar plantaciones comerciales, es necesario contar con un sistema de propagación que no genere diferencias significativas en cuanto a la producción de aceite, por lo que los sistemas de propagación *in vitro* son una buena alternativa para usarse a nivel comercial.

En la búsqueda de alternativas de propagación se debe considerar la evaluación de la fidelidad gené-

tica entre las plantas madre y las propagadas, a fin de evidenciar la estabilidad genética entre ambos explantes. El empleo de marcadores moleculares es una herramienta para evidenciar la similitud o la variabilidad que produce el sistema de propagación, sin que se afecte el medio ambiente y la condición fisiológica o geográfica; asimismo, puede evaluarse en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Bece-rra y Paredes, 2000).

Las técnicas basadas en PCR, como los marcadores moleculares tipo RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) se han utilizado ampliamente por su simplicidad, bajo costo, estabilidad, sensibilidad, aunque presenta el inconveniente de baja reproducibilidad. Ese marcador ha sido aplicado con éxito en el análisis de la fidelidad genética en algunas plantas aromáticas micropropagadas: *Gloriosa superba* L. (Yadav *et al.*, 2013), *Pogostemon cablin* (Paul *et al.*, 2010), *Ocimum gratissimum* L. (Saha *et al.*, 2011), entre otras. En este estudio se evaluó la fidelidad genética mediante marcadores moleculares RAPD, de plantas obtenidas por la técnica de propagación *in vitro*.

Metodología

Material vegetal

Las semillas maduras de orégano mexicano (*L. graveolens*) fueron colectadas en el municipio de Colotlán, Jalisco, en el oeste de México, en la temporada de fructificación de marzo a mayo del 2010.

Proliferación de yemas axilares

Los segmentos nodales usados para la propagación fueron obtenidos de plantas germinadas *in vitro*, éstas fueron seleccionadas por sus características fenotípicas (mayor follaje y mayor número de segmentos nodales). Los segmentos nodales de tres plantas seleccionadas como donantes fueron establecidos en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), al cual se le adicionó Benciladenina (BA) como

regulador de crecimiento, a una concentración de 0.5 mg/L.

Condiciones RAPD

La extracción de ADN genómico de plantas adquiridas a partir del primer ciclo de propagación, se efectuó conforme al protocolo de Zhang & Hewitt (2004), con algunas modificaciones. La cuantificación del ADN se realizó mediante un NanoDrop® a una longitud de onda de 260 nm, la calidad del ADN fue verificada en geles de agarosa al 1%.

Se utilizaron iniciadores OPB 01-12 para evaluar la fidelidad genética del sistema de propagación. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 12.5 µl: 1 L de ADN (5 ng/µl), oligonucleótido 1 L (10mM), mezcla de dNTPs 1.5 L (0.4 mM), Taq polimerasa 0.15 L (5 U/ L), MgCl₂ 2 L (25 mM), buffer 10X 1.25 L y agua desionizada estéril 5.60 L.

La amplificación se hizo con el termociclador marca Techne modelo TC-412: una primera desnaturalización a 94 °C, 4 min; seguido de 45 ciclos a 94 °C, 1 min; 42 °C, 1 min; 72 °C, 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 88 V, en buffer TAE 1X. Los geles fueron teñidos en bromuro de etidio y visualizados bajo transiluminador UV.

Análisis de datos

Los polimorfismos detectados se escrutaron como presencia (1) o ausencia (0) de ADN amplificado. Con estos datos se prepararon matrices binarias que se usaron para calcular valores de similitud genética entre cada individuo con el coeficiente de Jaccard, incluido en el paquete estadístico FreeTree. Los dendrogramas fueron preparados aplicando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages) (Rohlf, 1997), con el programa TreeView versión 1.6.6.

Resultados y discusión

El patrón de bandeo de las plantas micropropagadas seleccionadas al azar fueron comparadas con la planta madre (obtenida de semilla). Los iniciadores generaron distintos perfiles de amplificación (figura 1).

El dendrograma construido a partir de las distancias genéticas (figura 2) muestra que la planta madre, así como sus hijas (obtenidas por proliferación de yemas axilares) se encuentra en un mismo grupo. Por ello es posible determinar que los cambios generados con el método de propagación son mínimos, determinados a partir del marcador RAPD. Saha *et al.* (2012) reportan fidelidad genética en la planta aromática *Ocimum gratissimum* L. mediante micropropagación por yemas axilares. Aunque se pueden observar variaciones genéticas mediante este sistema de propagación (Gupta *et al.*, 2009).

La baja variabilidad del sistema de propagación es importante en las metodologías de mejoramiento genético, ya que asegura la producción del genotipo mejorado sin cambios evidentes por efectos del sistema de propagación.

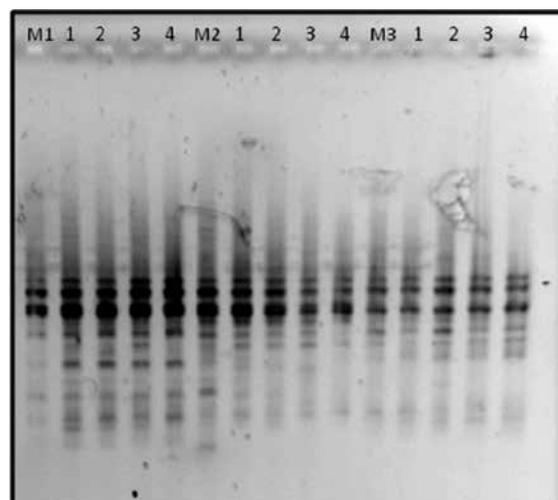


Figura 1. Patrón electroforético de los marcadores rapd (iniciador opb-08) adquiridos de las plantas madre (M1, M2 y M3) y las plantas obtenidas de los segmentos nodales (1-4).

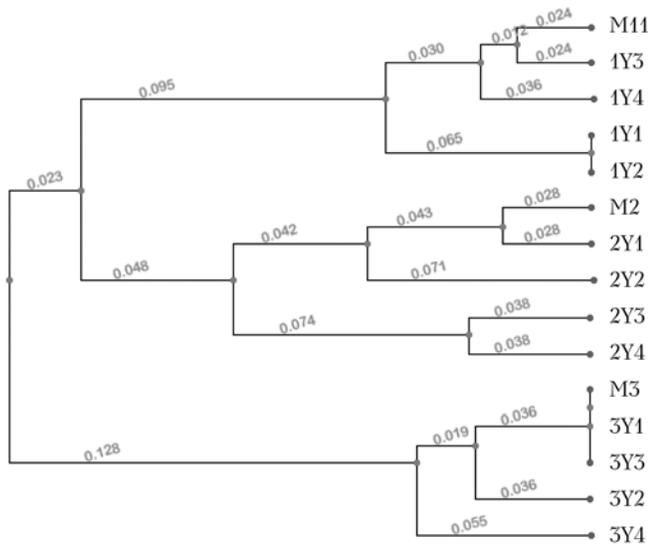


Figura 2. Dendrograma obtenido a partir de marcador RAPD de las plantas micropropagadas por yemas axilares y su respectiva planta madre.

Conclusiones

Mediante el uso de los marcadores moleculares tipo RAPD fue posible evidenciar la alta tasa de fidelidad genética que proporciona el sistema de propagación por medio de yemas axilares. Se propone esta metodología en los sistemas de producción de plantas de orégano con fines comerciales, con ello se garantizaría la homogeneidad de los cultivos para lograr mayores rendimientos y así evitar la excesiva deprecación de la especie en su hábitat natural.

Agradecimientos

Al equipo de trabajo del LBMV del Centro Universitario de la Ciénega.

Referencias

- Arcila-Lozano, C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., González-Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1):100-101.
- Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M.G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J.V., Nevárez-Moorillón, G.V. (2010). Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3):434-440.
- Becerra, V., Paredes C., M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*, 60(3):270-281.
- González-Nieves, C., Arreola-Ávila, J.G., García-Herrera, G., Rodríguez-Lopez, J.S., Carrillo-Flores, R., Esquivel Arriaga, O., Villa-Castorena, M. (2010). Efectos de tratamientos pregerminativos en la emergencia y crecimiento de plántulas de orégano (*Lippia graveolens* HBK). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 9(2):129-134.
- Gupta, R., Modgil, M., Chakrabarti, S.K. (2009). Assessment of genetic fidelity of micropropagated apple rootstock plants, EMLA 114, using RAPD markers. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(11):925-928.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Ocampo-Velázquez, R.V., Malda-Barrera, G.X., Suárez-Ramos, G. (2009). Biología reproductiva del orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) en tres condiciones de aprovechamiento. *Agrociencia*, 43(5):475-482.
- Paul, A., Thapa, G., Basu, A., Mazumdar, P., Kalita, M.C., Sahoo, L. (2010). Rapid plant regeneration analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. An industrially important aromatic plant. *Industrial Crops and Products*, 32(3):366-374.
- Rohlf, F.J. (1997). NTSYS- μ c Numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version 2.00). Setauket, New York: Exeter Software Publications.
- Saha, S., Kader, A., Segupta, C., Ghosh, P. (2012). *In vitro* propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. *American Journal of Plant Sciences*, 3(1):64-74.
- Villavicencio, G.E.E. (2007). Orégano, recurso con alto potencial. *Ciencia y Desarrollo*, 33(214):60-66.
- Villavicencio-Gutiérrez, E., Cano-Pineda A., García-Cuevas, X. (2010). *Metodología para determinar las existencias de orégano (Lippia graveolens h.b.k.) en Rodales Naturales de Parras de la Fuente Coahuila*. Saltillo:

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias.

Yadav K., Aggarwal, A., Singh, N. (2013). Evaluation of genetic fidelity among micropropagated plants of *Gloriosa superba* L. using DNA-based markers: a potential medicinal plant. *Fitoterapia*, 89:265-270.

Zhang, D.X., Hewitt, G.M. (2004). Special DNA extraction methods for some animal species (pp. 27-34). En: Karp, A., Isaac, P., Ingram, D. (Eds.), *Molecular tools for screening biodiversity*. London: Chapman & Hall.



Propagación *in vitro* de *Cuitlauzina pendula* la llave & lex. (*Orchidaceae*) como una alternativa para su conservación

Verónica Adriana Pérez-Decelis, Irene Ávila-Díaz

Facultad de Biología | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Rafael Salgado-Garciglia

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas | UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

correo-e: iaviladiazs@gmail.com

Resumen

Se determinaron los medios de cultivo más eficientes para la germinación, desarrollo de protocormos, formación de plántulas y multiplicación de PLBs en *Cuitlauzina pendula*. Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se probaron los medios: MS al 50% y 100%; MS con BA 0.05 mg/l⁻¹; Phytamax al 50% y 100% y fertilizante comercial N-P-K 17-17-17 al 50% y 100% de la concentración de sus sales basales. Los mayores valores de germinación se obtuvieron en los medios Phy 50% y Phy 100%, con un promedio de 31 y 32 protocormos fuera de la testa de doscientos observados. La transferencia se realizó en medio Phy al 50% con una combinación de ácido nftalenacético y benciladenina en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l⁻¹ para ambos reguladores de crecimiento; siendo el T₁₈ (0.1/0.5 mg/l⁻¹ de ANA/BA) con respecto a los demás tratamientos, en el que se registró mayor crecimiento, desarrollo y producción de PLBs (6.94 PLBs). Los resultados de la investigación son útiles para implementar la propagación masiva de esta especie amenazada, como una alternativa para colaborar a su manejo sustentable.

Palabras clave: *Cuitlauzina pendula*, germinación *in vitro*, conservación *Orchidaceae*.

Introducción

La propagación de las orquídeas se dificulta porque sus semillas son diminutas, carecen de endospermo y requieren de hongos en condiciones naturales para su germinación a fin de abastecer azúcares y nutrientes (Arditti, 1992). El uso de medios de cultivo en la propagación *in vitro* es de particular importancia en estas plantas, ya que éstos suministran los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (Lo *et al.*, 2004; Santos-Hernández *et al.*, 2005).

Una alternativa de propagación para especies endémicas o en alguna categoría de riesgo es la propagación *in vitro*, que contribuye indirectamente en la disminución de la presión que se ejerce sobre las poblaciones naturales (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 incluye a 181 especies de la familia *Orchidaceae* en alguna categoría de riesgo. *Cuillauzina pendula* es una de ellas y se encuentra catalogada como amenazada y endémica de México (SEMARNAT, 2010). Presenta la grave problemática de la destrucción de su hábitat y la extracción ilegal; eso ha ocasionando una severa reducción o extinción local de sus poblaciones silvestres, por lo que quedan muy pocas remanentes.

Existen pocos trabajos enfocados a la propagación y conservación de especies de orquídeas epifitas mexicanas. Los objetivos de este estudio fueron: 1. Establecer un medio de cultivo eficiente para la germinación *in vitro* de *C. pendula*. 2. Determinar los medios de cultivo óptimos para el desarrollo de plántulas y la proliferación de PLBs a fin de conseguir la propagación sexual a través de semillas; esto, con la posibilidad de mantener niveles de variación genética aceptables para un manejo *in situ* de *C. pendula* y la propagación vegetativa para coadyuvar en su preservación de manera indirecta, al abrir la posibilidad de la obtención a gran escala de plantas de calidad en invernaderos para disminuir la extracción de *C. pendula*.

Cabe mencionar que la investigación es parte de un proyecto más amplio (Pérez-Decelis *et al.*, en proceso) que incluye el estudio de algunos factores del sistema reproductivo de *C. pendula*, así como diversos aspectos de su ecología, con cuyos resultados se espera proponer alternativas de manejo integral de la especie.

Metodología

Germinación de las semillas

Dos cápsulas cerradas y maduras de *C. pendula* (desarrolladas en el Parque Nacional Barranca del Cupatitzio, Uruapan, Michoacán, México) fueron desinfectadas de acuerdo con Ávila-Díaz *et al.* (2009). Cada cápsula fue disectada en condiciones de asepsia en campana de flujo laminares. Se tomó alrededor de 5 mg de las semillas, se distribuyó uniformemente sobre la superficie de los siguientes medios de cultivo: MS1 (MS 50%), MS2 (MS 100%), MS3 (MS 50% con BA 0.05 mg l⁻¹) y MS4 (MS 100% con BA 0.05 mg l⁻¹) (MS es medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962); el medio de cultivo Phytamax (Phytamax Orchid Maintenance Medium SIGMA®): Phy1 (Phytamax 50%) y Phy2 (Phytamax 100%) y medios con fertilizante comercial triple 17: T1 (100%: 1000mg l⁻¹) y T2 (50%: 500 mg l⁻¹). Las condiciones de crecimiento *in vitro*, fueron a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz (2000 lux).

A los 60 y 90 días del cultivo se hicieron observaciones en un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo Primo Star, 10X (60d) y 4X (90d), considerando los estadios de desarrollo que a continuación se enuncian: *a*) deformes (semillas con el embrión reducido a un 50% o menos dentro de la testa); *b*) protocormo 1 (aquellas semillas que tenían el embrión en forma globular completo o más del 50% dentro de la testa); *c*) protocormo 2 (aquellas semillas que tenían más del 50% o todo el embrión, fuera de la testa); *d*) plántula 1 (plántula con una o dos hojas) y *e*) plántula 2 (plántula con más de dos hojas).

Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

Para la transferencia de protocormos en estadio 2 de *C. pendula* se utilizó el medio Phy 1 (medio Phytamax con 50% de sus sales basales), suplementado con distintas concentraciones de una combinación de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA) (0, 0.05, 0.1 y 0.5 mg l⁻¹ para ambos reguladores de crecimiento).

La evaluación del desarrollo de los protocormos transferidos se realizó a los 125 días; se determinó la longitud del vástago, el número de hojas, largo y ancho de las hojas, número y longitud de raíces y el vigor de las plántulas. Este último parámetro fue determinado en categorías (Pérez-Decelis *et al.*, en proceso). También se evaluó el número de PLBs.

Se efectuó un análisis ANOVA y una prueba de Tukey y Kramer con un 95% de confiabilidad cuando hubo diferencias significativas; para las variables categóricas cualitativas (vigor) se llevó a cabo una prueba de Chi-cuadrada con el programa JMP 8 (JMP8, 2009).

Resultados y discusión

Germinación de las semillas

A los 60 días ($F=104.78$, $gl=7$, $P<0.0004$) se obtuvo la germinación más alta con promedios de 31 y 32 «protocormos en estadio 2» en los medios Phytamax al 50% y 100% y a los 90 días ($F=3.23$, $gl=7$, $P<0.0446$); se registraron valores promedios de 48 y 20.25 de protocormos 2 para esos mismos medios. Hasta los 90 días sólo los medios Phy1 y Phy2 registraron desarrollo de plántulas de *C. pendula*. Los medios Phytamax (50% y 100%) fueron los mejores para la germinación *in vitro* de *C. pendula*, como en *Encyclia adenocaula* (Ruíz *et al.* 2008), con la que se logró el 69.46% de germinación en este medio.

Transferencia de protocormos *in vitro* con adición de reguladores de crecimiento

A los 125 días de la transferencia de protocormos en estadio 2, se registraron los valores más altos de las variables longitud de hojas, número y longitud de raíces en aquellas plántulas sometidas al tratamiento T20 (1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA); en los tratamientos T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) y T19 (0.5/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) se observaron las mayores longitudes del vástago. El valor más alto del ancho de las hojas fue mostrado por los tratamientos T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) y T20 (1/0.5 mg l⁻¹).

En cuanto al número de hojas los tratamientos T5 (1/0 mg l⁻¹ de ANA/BA), T7 (0.05/0.05 mg l⁻¹), T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA), T19 (0.5/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA) y T20 (1/0.5 mg l⁻¹) presentaron los valores mayores. Como puede observarse, para *C. pendula* se exhibe en general una respuesta favorable a moderadas y altas concentraciones de ANA.

Otro estudio hecho en *C. pendula* reportó una alta formación de plántulas en el medio MS adicionado con BA (0.5 mg l⁻¹) o sin reguladores de crecimiento (Mata-Rosas y Salazar-Rojas 2009), similar a lo que ocurre en el T18 ANA/BA (0.1 mg l⁻¹/0.5 mg l⁻¹), T19 ANA/BA (0.5 mg l⁻¹/ 0.5 mg l⁻¹) y T20 ANA/BA (1 mg l⁻¹/ 0.5 mg l⁻¹) percibido en esta investigación. Se hallaron diferencias significativas ($X^2=256.05$, $gl=144$ $P<0.000$) con respecto a las categorías de vigor de las plántulas de *C. pendula*, a los 125 días de haberse efectuado la transferencia de protocormos en los distintos tratamientos (ANA/BA).

Los valores más altos de vigor se registraron en las plántulas de los tratamientos T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹) y T24 (0/1 mg l⁻¹) (Pérez *et al.*, en proceso). Dichos tratamientos fueron los más adecuados para el desarrollo de plántulas de *C. pendula*.

Multiplicación de PLBs

Después de 125 días de efectuada la transferencia de protocormos se observaron diferencias significativas

($F=2.3377$, $gl= 24$, $P<0.0005$). El mayor número de PLBs (en promedio 6.94 PLBs) se registró en el tratamiento T18 (0.1/0.5 mg l⁻¹ de ANA/BA).

En otro estudio también se reportó la formación de PLBs en *C. pendula*, con BA a una concentración de 0.5 mg l⁻¹ y sin reguladores de crecimiento (Mata-Rosas y Salazar-Rojas, 2009); en *Cattleya aurantiaca* con 0.1 mg l⁻¹ de ANA y 10 mg l⁻¹ de BA (Mauro *et al.*, 1995), en *Laelia speciosa* con 0.5 mg l⁻¹ de ANA y 0.1 mg l⁻¹ de GA₃ (Ávila-Díaz *et al.*, 2009) y con 2.5 mg l⁻¹ de ANA y 1 mg l⁻¹ de BA (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010). La obtención de PLBs es una forma de reproducción asexual para *C. pendula*, lo cual permitiría obtener una gran cantidad de plantas idénticas a ejemplares con características deseadas.

Los resultados de la investigación abren la posibilidad para la propagación masiva y para la obtención de plantas de calidad de *C. pendula* en invernaderos, para disminuir en cierto grado la extracción de individuos de sus poblaciones y colaborar a un manejo adecuado de esa especie amenazada.

Conclusiones

C. pendula presentó la mayor geminación en los medios de Phytamax al 100% y al 50% de la concentración de sus sales basales, a los 60 y 90 días de realizada la siembra. Los medios Phy 50% adicionados con 0.1 y 0.5 mg l⁻¹ de ANA y BA (T18) y con 1 y 0.5 mg l⁻¹ de ANA y BA (T20), respectivamente, fueron los más eficientes para el crecimiento y desarrollo de plántulas de *C. pendula*; se obtuvieron plántulas sanas, con pseudobulbo y raíz desarrollada en los tratamientos T18 y T21 (0/1 mg l⁻¹). El medio T18 fue también el mejor para producir la mayor cantidad de PLBs.

Agradecimientos

Al Conacyt por la beca otorgada dentro del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

(2011-2013) para la realización de esta investigación. Asimismo, a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, a través del Proyecto Biología de la Conservación de Orquídeas Michoacanas, a cargo de Irene Ávila D.

Referencias

- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology. Department of Developmental and Cell Biology*. USA: John Wiley and Sons.
- Ávila-Díaz, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C., Salgado-Garciglia, R. (2009). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99:335-343.
- Baltazar, R. (2004). *Micropropagación de Oncidium tigrinum Llave & Lex (Orchidaceae) a partir de protocormos* (Tesis de Licenciatura). Universidad Veracruzana, Xalapa.
- Lo, S.F., Nalawade, S.M, Kuo C.L, Chen C.L., Tsay, H.S. (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino-a medicinally important orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(5):528-535.
- Mata-Rosas, M., Salazar-Rojas, V.M. (2009). Propagation and Establishment of Three Endangered Mexican Orchids from Protocorms. *Hortscience*, 44(5):1395-1399.
- Mauro, M., Sabapathi, D., Smith, R.A. (1995). Influence of benzylaminopurine and alpha naphthalenacetic acid on multiplication and biomass production of *Cattleya aurantiaca* shoot explants. *Lindleyana*, 9(3):169-173.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Ruíz, B.C., Laguna, C.A., Iglesias, A.L., Damon, A., Marín, T.N., Azpíroz, R.H., Moreno, M.J. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 77:203-215.

- Santos-Hernández, L., Martínez-García, M., Campos, J.E., Aguirre, L.E. (2005). *In vitro* propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in México. *Hortscience*, 40(2):439-442.
- Sarabia-Ochoa, M.E., Ávila-Díaz, I., Carlos-Gómez, A., Salgado-Garciglia, R. (2010). Callus growth and plant regeneration in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 10(1):13-18.
- SAS Institute Inc. (2009). JMP (version 8) *Design of Experiments Guide*. Cary NC: Autor.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2010). NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2010. Recuperado de <http://www.profepa.gob.mx/NR/rdonlyres/841412613-CF26-4223-BFE9-38BE4AEB0C96/1426/NOM-ECOL0592010.pdf>
- Soto-Arenas, M.A., Solano-Gómez, A.R. (2007). Ficha técnica de *Cuillauzina pendula*. En: Soto-Arenas, M.A. (comp.), *Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000*. México, D.F: Instituto Chinoín A.C./ Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C.



Regeneración de *Sechium edule* mediante organogénesis y uso de marcadores RAMP para evaluar la fidelidad genética

Víctor O. Cruz-Martínez | Gustavo J. Acevedo-Hernández
Osvaldo A. Castellanos-Hernández | Araceli Rodríguez-Sahagún
Centro Universitario de la Ciénega | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

correo-e: aracelicrs@gmail.com

Resumen

Se obtuvieron plantas de chayote mediante el desarrollo de un sistema eficiente de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa (MS suplementado con 0.1 mg/L de BA y 0.1 o 0.5 mg/L de GA₃). Se partió de explantes de hoja con peciolo en un tiempo aproximado de 25 días, con una eficiencia en producción promedio de 7.25 brotes por tratamiento. Para el análisis de la variabilidad genética producida por el método de regeneración de *Sechium edule* se usaron los marcadores moleculares RAMP, se evidenció la fidelidad genética que mantienen la planta donante con las regeneradas por esta vía.

Palabras clave: *Sechium edule*, regeneración, fidelidad genética.

Introducción

El chayote, *Sechium edule*, es una hortaliza popular ampliamente distribuida en regiones subtropicales con más de 2 400 mm de lluvia. Es originario del trópico americano, donde se encuentra la mayor diversidad genética, pero se cultiva de manera rústica en muchas regiones del mundo, siendo uno de los vegetales más accesibles para los grupos de bajos ingresos (Lira, 1996).

Tal especie es considerada un producto de relevancia comercial para México. Al ser éste uno de los países con mayor diversidad genética requiere estrategias para conservar sus poblaciones silvestres y asegurar la disponibilidad de material con características de importancia económica (estándares de exportación) para los agricultores, eso se lograría con la creación y mantenimiento de bancos de germoplasma. Para ello es preciso desarrollar estrategias biotecnológicas que permitan la conservación a mediano y largo plazo del material vegetal.

Los métodos de conservación deben garantizar la viabilidad y la estabilidad genética de los materiales almacenados. Lo anterior es imposible de manera convencional; se le considera una especie recalcitrante por las características de la semilla (alto contenido de agua y corto periodo de latencia), por lo que las semillas germinan aun durante la vida de anaquel.

Una alternativa viable es el establecimiento de la regeneración vía organogénesis, conocida como estrategia de propagación con bajo índice de variabilidad genética en las plantas obtenidas, lo cual puede ser evaluado mediante el uso de marcadores moleculares. Para poder implementar metodologías de conservación y mejoramiento genético es indispensable contar con un sistema de regeneración que no produzca alta variabilidad genética en las plantas obtenidas.

Establecer un protocolo eficiente de regeneración de plantas vía organogénesis es un primer paso

en el mejoramiento genético de la especie; éste podrá ser evaluado a través de marcadores moleculares empleados con éxito en la búsqueda de diferencias en los patrones genéticos entre cultivares, variedades y plantas. Los estudios de fidelidad genética constituyen una técnica válida y rápida para detectar variabilidad en las plantas regeneradas, ya que los marcadores morfológicos necesitan más tiempo y en ocasiones son menos confiables.

Metodología

Se extrajeron embriones de chayote a partir de frutos maduros, fueron desinfectados 30 segundos en una solución de alcohol al 70%, seguido de 12 min en una solución de hipoclorito de sodio al 50%, finalmente fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar; dicho establecimiento y regeneración *in vitro* de chayote es el primer paso para desarrollar el mejoramiento genético de la especie.

Los explantes fueron colocados en un medio MS en condiciones asépticas, los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un foto periodo de 16h de luz fluorescente ($25\ \mu\text{m}/\text{seg}/\text{m}^2$). Una vez que los embriones germinaron y presentaron crecimiento de plántulas en alrededor de 10 días de incubación, se eliminaron los cotiledones y se extrajeron las hojas de las plántulas, a cada hoja se le hizo pequeñas incisiones para una mejor respuesta. Se realizaron distintos tratamientos con benciladenina (BA) y ácido giberélico (GA_3) y como agente gelificante se empleó Phytigel.

Una vez que se hallaron las plantas regeneradas por organogénesis, se evaluaron por medio de marcadores moleculares RAMP, con los cuales se puede estimar la diversidad genética en plantas y animales; a la vez, permiten mostrar la base de la variación de los individuos, por mencionar algunas de sus aplicaciones. Se evaluaron 8 oligonucleótidos ISSR y 10 oligos RAPD.

RAPD		SSR	
No. Oligo	Secuencia	No. Oligo	Secuencia
1	CGTGCGGGAA	ARS 001	CACT(GA) ₆
2	GTAGACGCGT	ARS 002	AACC(GA) ₆
3	AACGCGCTAC	ARS 003	GACG(GT) ₆
4	CCCGACAGCA	ARS 004	AGTC(GT) ₆
5	AAGCGTCCTG	ARS 005	CATG(GT) ₆
6	ACCACAGCTC	ARS 006	AGAG(GA) ₆
7	GTGAGGTAGG	ARS 007	AGTT(GT) ₆
8	AGGAGACCGT	ARS 008	TCGG(GA) ₆
9	GCCGTAGGGTT		
10	CCACATGGGT		

Fuente: Chiba y cols., 2003.

Fuente: Gómez-Velez, 2011.

Resultados y discusión

Se desarrolló un sistema eficiente de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de *Sechium edule*; se partió de explantes de hoja con peciolo en un tiempo aproximado de 25 días, siendo la regeneración sólo en la base del peciolo (figura 1).

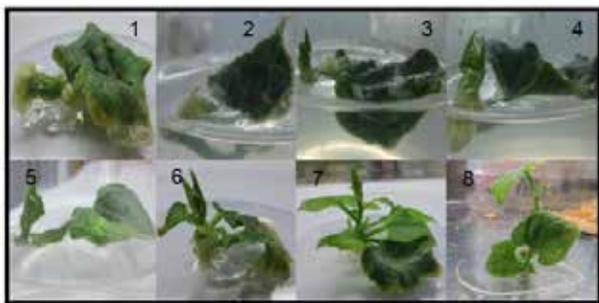


Figura 1. Regeneración de *Sechium edule*, ciclo completo. 1) Fase de inducción, explante de hoja con peciolo, 3 días de incubación. 2) Células formando órgano vegetal, 6 días de incubación. 3) Desarrollo de la plántula organogénica, 9 días de incubación. 4) Plántula, 11 días de incubación. 5) Plántula, 15 días de incubación. 6) Plántula, 18 días de incubación. 7) Plántula, 25 días de incubación. 8) Planta con desarrollo de raíz, 30 días de incubación.

Se obtuvieron plantas de chayote mediante regeneración *in vitro* vía organogénesis directa, cuando el medio MS fue suplementado con 0.1 mg/L de BA y 0.1 o 0.5 mg/L de GA₃ (figura 2).

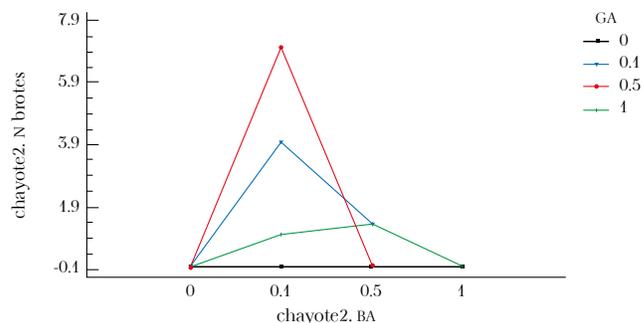


Figura 2. Interacciones de los factores concentración de (GA₃) y (BA) para la inducción de brotes en *Sechium edule*.

Una vez establecido el protocolo de regeneración de plantas de chayote vía organogénesis, se desarrolló la metodología de enraizamiento *in vitro* de los brotes; se obtuvo el 80% de enraizamiento a los 10 días de incubación en medio MS sin reguladores de crecimiento (figura 3). La técnica RAMPs permitió evaluar la fidelidad genética del método de regeneración vía organogénesis directa, además que evidenciaron ser una herramienta aplicable a estudios de variabilidad genética para *Sechium edule* (figura 4).

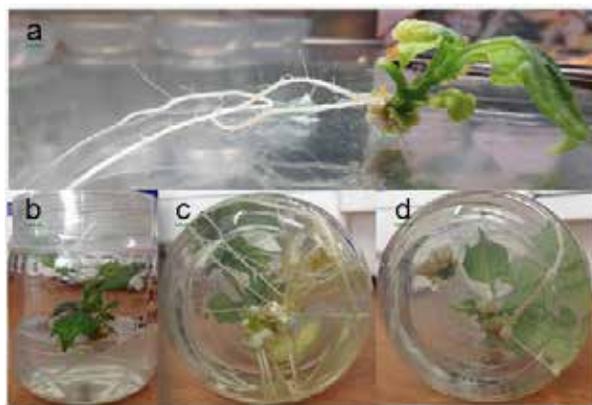


Figura 3. a) Desarrollo de raíz a los 30 días de ser individualizada la plántula. b) Plántula con raíz, 13 días de ser individualizada. c) Plántula con raíz, 16 días de ser individualizada. d) Plántula con raíz, 14 días de ser individualizada.

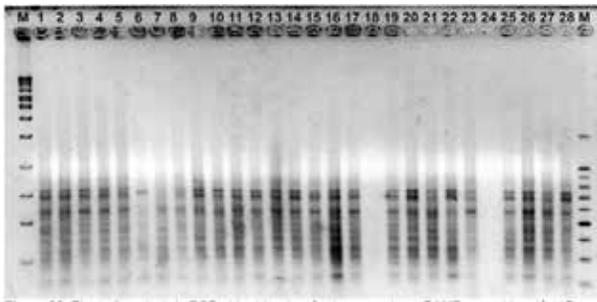


Figura 4. Patrón de bandeo. Electroforesis de la PCR obtenida a través de marcadores RAMPs, combinación 17 con los oligos (2-ISSR y 7-RAPD). 1-28 primeras plántulas regeneradas vía organogénesis directa. M izquierda: mpm 1kb. M derecha: mpm 100 pb.

El uso de marcadores RAMP ha sido utilizado con éxito para evaluar en distintas especies el grado de variabilidad existente, ya sea ocasionado por el sistema de propagación o en cultivos como lo realizado para granada (Zhao *et al.*, 2013).

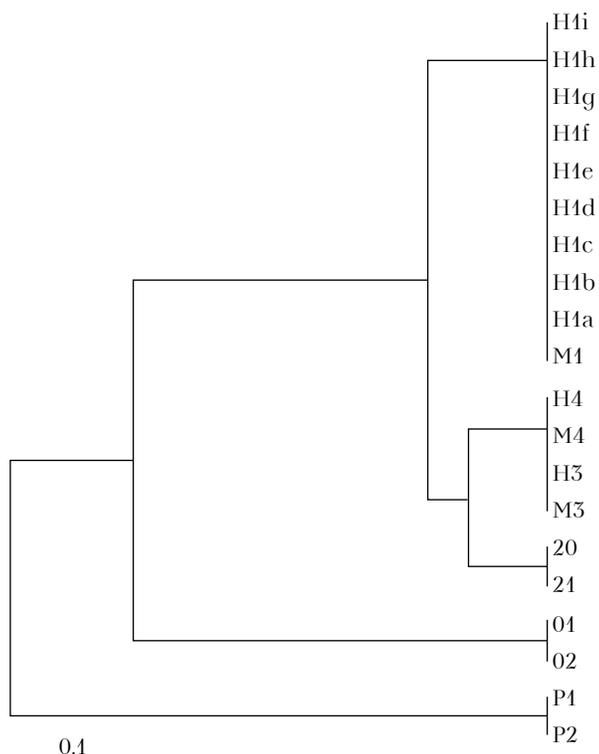


Figura 5. Dendrograma encontrado con marcadores RAMPs a partir de 16 muestras de eventos organogénicos de *Sechium edule*. H: Plantas organogénicas hijas. M: Plantas madre. 20 y 21: Plantas organogénicas. O1 y O2: Muestras de plantas de orégano como referencia. P1 y P2: Muestras de plantas de *Paulownia* como referencia.

Se demostró que mediante el sistema de regeneración *in vitro* por organogénesis directa se mantiene la estabilidad genética de las plantas, y con ello mantener las características genotípicas de las mismas. Esto fue evaluado por los marcadores moleculares tipo RAMP (figura 5).

Conclusiones

Se logró la obtención de plantas de *Sechium edule* a través de la regeneración por organogénesis. Se demostró que ese procedimiento no genera cambios genotípicos en las plantas, lo que se presume será un buen comienzo para trabajos de mejoramiento genético en la especie. Mantener la especie *in vitro* ayudaría a crear un banco de germoplasma; las características del fruto imposibilitan hacerlo de forma natural, ya que éste germina poco tiempo después de su corte y ello impide su almacenamiento. Se busca en futuros trabajos establecer protocolos de mejora genética para beneficiar al sector agrícola con la producción de plantas libres de virus, una de las problemáticas que presentan los cultivos de chayote.

Agradecimientos

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro Universitario de la Ciénega.

Referencias

- Lira-Saade, R. (1996). *Chayote Sechium edule. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 8*. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research/ International Plant Genetic Resources Institute.
- Zhao, L., Li, M., Cai, G., Pan, T., Shan, C. (2013). Assessment of the genetic diversity and genetic relationships of pomegranate (*Punica granatum* L.) in China using RAMP markers. *Scientia Horticulturae*, 151:63-67.

Inducción de poliploidía en *Cordia congestiflora* Hemsl., especie vegetal con potencial para remediar suelos contaminados con metales pesados

Yesenia López-López | Miguel Alvarado-Rodríguez

Unidad Académica de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Lenin Sánchez-Calderón | Saúl Fraire-Velázquez

Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: mialvaro2909@hotmail.com

Resumen

La fitorremediación es una tecnología innovadora que consiste en utilizar plantas vivas y los microorganismos asociados a su rizósfera para la remediación *in situ* y *ex situ* de suelos, lodos, sedimentos y aguas contaminados a través de la remoción, degradación o estabilización de los contaminantes. Esta tecnología tiene un gran potencial para la remediación de sitios contaminados por sus bajos costos y por lo amigable con el medio ambiente. Existen varias especies vegetales que es posible usar en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Se ha demostrado que *Cordia congestiflora* es capaz de tolerar y acumular plomo, ya que presenta un FBC de 1.05. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, no se puede emplear en la fitorremediación de suelos contaminados (Salas-Luevano *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue inducir poliploidía en *C. congestiflora* mediante la utilización de colchicina *in vitro*, a fin de producir plantas de mayor tamaño que pudieran ser candidatas para el saneamiento de suelos contaminados con plomo y otros metales pesados. Se obtuvieron plantas con un tamaño superior a las control, a partir de semillas que fueron embebidas 48 y 96 h en soluciones de colchicina al 0.05 y 0.1%. Los ejemplares se multiplicaron y se enraizaron *in vitro*, se usaron diversos reguladores del crecimiento vegetal y posteriormente se aclimataron. Se determinó la poliploidía considerando el fenotipo, contenido de ADN genómico y diámetro nuclear.

Palabras clave: *Cordia congestiflora*, poliploidía, fitorremediación.

Introducción

La actividad minera genera suelos contaminados con residuos sólidos y semisólidos mediante la producción de desechos comúnmente llamados «jales», que se caracterizan por sus limitaciones físicas, químicas y biológicas para el establecimiento de la cubierta vegetal, los riesgos a la salud humana y al medio ambiente (Puga *et al.*, 2006).

Zacatecas tiene más de 450 años de tradición minera con la consecuente acumulación de residuos. Contiene metales pesados como el Pb, Cd, As, elementos que no tienen funciones metabólicas conocidas y que son tóxicos a muy bajas concentraciones (Méndez-Prieto *et al.*, 2009). Zn, que es esencial para los seres vivos pero puede llegar a ser tóxico conforme aumenta su concentración. Hg, que se usó en el proceso de amalgamación para la extracción de oro y plata; fue usado desde mediados del siglo XVI hasta mediados del siglo XIX, actualmente varias microcuencas del estado están contaminadas con ese elemento (Rodríguez *et al.*, 2011).

En el municipio de Guadalupe, las comunidades de La Zacatecana y Osiris son las zonas con mayores concentraciones de metales pesados (As, Pb y Hg), hasta 8 veces más que las concentraciones recomendadas por la PROFEPA (Santos-Santos *et al.*, 2006). En Vetagrande se han detectado concentraciones de hasta 400 mg de Pb por kg de suelo residencial, que es el valor máximo permitido conforme a la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.

Una tecnología empleada para remover los metales pesados de suelos contaminados es la extracción por plantas que han desarrollado esa capacidad, esto es conocido como fitorremediación. Esas plantas absorben, concentran y precipitan metales tóxicos hallados en suelos contaminados, es la mejor forma de remediar áreas contaminadas, donde los contaminantes están presentes a relativamente bajas concentraciones y de manera superficial (Rulkens, *et al.*, 1998).

Por su parte, *Cordia congestiflora* es una planta que crece en suelos contaminados con desechos mineros, en lugares cercanos a la ciudad de Zacatecas; por ello es posible afirmar que está adaptada a tales condiciones y que es capaz de tolerar, traslocar y acumular cantidades relevantes de plomo. Sin embargo, aunque se presenta todo el año y tiene un buen factor de bioconcentración (FBC) de 4.05, no es candidata a utilizarse para fines de fitorremediación debido a su pequeña biomasa (Salas-Luévano *et al.*, 2009).

A pesar de lo anterior existen estrategias biotecnológicas para incrementar el tamaño, el vigor y la tolerancia a ambientes desfavorables a las plantas, entre ellas se encuentran la inducción de poliploidía mediante el uso de colchicina. En este trabajo se obtuvieron *in vitro* plantas poliploides, resultaron ser de mayor tamaño que las plantas obtenidas de semillas no tratadas con colchicina.

Metodología

Material biológico

Se utilizaron semillas que se colectaron de plantas silvestres maduras de *C. congestiflora*, localizadas en la zona contaminada con jales provenientes de la Mina El Bote. Ésta se ubica en Morelos, Zacatecas y se aproxima a las comunidades Francisco I. Madero y Noria de Gringos, pertenecientes a los municipios de Zacatecas y Morelos, respectivamente.

Se seleccionaron 1 200 semillas de *C. congestiflora*, se lavaron con agua y jabón, a continuación se sumergieron en alcohol etílico 70% durante un minuto; se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 10% durante 25 min; finalmente, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Para inducir poliploidía, las semillas se mantuvieron en una solución de colchicina al 0, 0.04, 0.05 y 0.1%, durante 0, 48 y 96 h, lo que hizo un total de 12 tratamientos con 100 semillas cada uno. Las semillas tratadas se sembraron en medio de cultivo semisólido MS, sin reguladores del crecimiento vegetal.

Determinación de poliploidía

Se seleccionaron los ejemplares con un fenotipo diferente a las plantas control. Plantas con mayor altura, con hojas más anchas y de un verde más oscuro. Para aumentar la cantidad de material biológico, las plantas control y las que tuvieron un fenotipo de nuestro interés, se multiplicaron suplementando el medio nutritivo con la citocinina BA a concentraciones de 0, 1.0, 2.0 mg/L y la auxina AIB a concentraciones de 0 y 0.2 mg/L (en combinación), para dar un total de seis tratamientos.

Contenido de ADN genómico

La cantidad de ADN de células poliploides es más alta si se compara con las células diploides. El contenido de ADN se incrementa proporcionalmente con el incremento del nivel de ploidía, por lo tanto la misma unidad de masa de tejido diploide y poliploide tiene diferente cantidad de ADN; el cual puede ser determinado mediante espectrofotometría al seleccionar una longitud de onda de 260 nm (Hasnain Raza *et al.*, 2003). En este estudio el ADN de las plantas regeneradas fue extraído por el método de CTAB, de 500 mg de muestra.

Diámetro nuclear

Las células con núcleo poliploide son generalmente más grandes que las células de la misma especie vegetal con núcleo diploide. Se ha reportado que existe una fuerte correlación entre el tamaño del genoma y el volumen celular. Las células de gran tamaño tienen más ADN nuclear, y en eucariontes los núcleos son más grandes. Esta correlación se da en células de plantas superiores (Goff & Coleman, 1987).

Con base en lo anterior, se tomó como muestra una hoja por cada planta, considerada poliploides y otra de las plantas control. Las hojas se «clarearon» con Metil Salicilato, a fin de eliminar al máximo

pigmentos que pudieran interferir durante la observación de los núcleos celulares.

Las hojas montadas en portaobjetos, cubiertas y selladas, se observaron en un microscopio Confocal marca Carl Zeiss, modelo LSM 6 Pascal. A partir de las fotografías tomadas, se midió el diámetro nuclear y se hicieron las comparaciones entre plantas control y poliploides.

Enraizamiento

Para inducir un sistema radical vigoroso en los dos tipos de plantas, se probaron cuatro diferentes tratamientos: 1) MS 1X sin fitohormonas, 2) MS 0.5X, 3) MS 1X con 0.5 mg/l de AIB y 4) MS 1X suplementado con 0.5 g/l de carbón activado. Una fracción de esas plantas consideradas ya clonas en esta fase fueron destinadas para mantenerlas *in vitro* y otra fracción para llevarlas a la etapa de aclimatación.

Aclimatación

Se consideraron 20 vitroplantas con un sistema radical bien desarrollado, abundante y vigoroso. Se extrajeron las plantas de los medios de cultivo, se eliminó cuidadosa y totalmente el agar de sus raíces; manera individual a macetas conteniendo una mezcla de peatmoss y tierra de cultivo en una proporción del 49.5% de cada componente, más el 4% del fertilizante de liberación lenta ozmocote triple 14. El trasplante se realizó al humedecer el sustrato. Los vasos con las plantas se cubrieron con una bolsa plástica transparente, se ligó ésta. En forma gradual se eliminó la cubierta en el lapso de dos semanas.

Resultados y discusión

Tratamientos para inducir poliploidía

La cantidad de semillas germinadas en promedio para todos los tratamientos fue de 46.66%, luego de cuatro semanas de iniciado el proceso con colchici-

na. Sin embargo, sólo en los tratamientos de 0.1% de colchicina con 48 y 96 h se produjeron plantas con una gran variación fenotípica, determinada a las 16 semanas después de iniciado el tratamiento. En la figura 1 se aprecia una planta control y una planta poliploide que presenta hojas más anchas y una altura mayor.



Figura 1. Se muestra a la derecha una planta de *C. congestiflora* poliploide con hojas anchas, y a la izquierda una planta control.

En el cuadro 1 se expone un comparativo de algunos parámetros morfológicos entre plantas control y plantas poliploides.

Cuadro 1

Valores medios de los parámetros morfológicos de plantas poliploides y de plantas control

Parámetros	Control (mm)	Poliploides mm
Distancia intermodal	3.06	9.5
Largo	5.05	6.92
Hoja Ancho	0.475	1.42
Grueso	0.156	0.4
Diámetro del tallo	0.3	0.56
Altura	97	234
Color de la hoja	 B = 180 G = 198 R = 28	 B = 93 G = 129 R = 31

Carga cromosómica

Sólo en los tratamientos 0.1% de colchicina de 48 y 92 h germinaron 21 y 18 semillas respectivamente; de las 39 semillas germinadas fue posible obtener tres plantas con el fenotipo deseable: una planta en el primer tratamiento y dos en segundo. Se extrajo ADN genómico de ambos tipos de plantas por el método de CTAB. La concentración de éste se cuantificó, por lo que la planta control tuvo 4.9 µg/ml, mientras que las plantas poliploides tuvieron una concentración de 20.3 µg/ml.

Diámetro nuclear

Las hojas clareadas y montadas en el portaobjetos se observaron al microscopio Confocal. Se registraron las características señaladas en el siguiente cuadro.

Cuadro 2

Comparación de parámetros anatómicos de hojas de plantas control y de plantas poliploides

Tipo de planta	Relación N/C	No. E/mm ²	No. T/mm ²	Longitud de E	C/T
Planta control	0.3579	46	28	50	1
Planta poliploide	0.4444	36	4	18	6

Donde: N = Núcleo; C = Célula; T = Tricoma; E = Estoma.

De acuerdo con lo registrado se comprobó que el núcleo de las células de las plantas poliploides es de mayor diámetro con respecto a las plantas control. Cada tricoma de las plantas control se compone por una sola célula, mientras que las poliploides tuvieron tricomas segmentados conformados por seis células cada uno. También se observó una escasa presencia de tricomas en las plantas poliploides, que presentaron un 225% más estomas por mm² que las plantas control, aunque de un tamaño muy reducido. En la figura 2 se indican segmentos de hoja de una planta control y de una poliploide.

Multiplicación de plántulas

La tasa más alta de multiplicación para las plantas control y poliploides se logró con el tratamiento 1 mg/L de BA con 0 mg/L de AIB, seguida de 0 mg/L de BA con 0.2 mg/L de AIB o de 1 mg/L de BA con 0.2 mg/L de AIB. Se obtuvo una tasa media de multiplicación de 5.5 para el primer tratamiento, y de 4.4 para los dos segundos tratamientos.

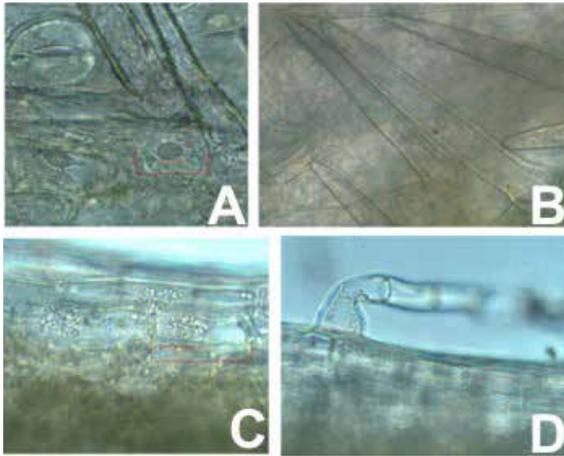


Figura 2. La imagen A corresponde a una planta control, donde se aprecian estomas de gran tamaño. En B, planta control con gran cantidad de estomas. En C, células de planta poliploide con núcleos de tamaño mayor que los de las plantas control. En D, tricoma segmentado conformado por seis células, mientras que en las plantas control son unicelulares.

Enraizamiento

Se obtuvo un sistema radicular abundante y vigoroso con el tratamiento MS suplementado con 0.5 mg/L de AIB, tanto en plantas control como en plantas poliploides. En los otros tres tratamientos probados, luego de 6 semanas de iniciado el proceso no hubo respuesta alguna.

Aclimatación

La aclimatación no pudo lograrse cuando las plantas se extrajeron del frasco y fueron trasplantadas en

el sustrato ya señalado. Sin embargo, se efectuó una aclimatación del 30% cuando las plantas libres de restos de agar se trasplantaron en condiciones de asepsia, en frascos con peatmoss estéril. Bajo esas condiciones se hizo una preaclimatación durante dos semanas; luego, durante otras dos semanas se mantuvieron en macetas con el sustrato señalado y cubiertas con una bolsa plástica, ésta se perforó gradualmente.

Conclusiones

Se generaron plantas poliploides de *C. congestiflora* mediante el uso de colchicina, a la única concentración de 0.4% a partir de semillas que estuvieron en contacto con dicho alcaloide por un periodo de 48 y 96 h. Las células poliploides presentaron núcleos de mayor tamaño y estomas más pequeños que las células de las plantas control.

Referencias

- Goff, L., Coleman, A. (1987). The Solution to the Cytological Paradox of Isomorphy. *The Journal of Cell Biology*, 40(3):739-748
- Hasnain, R., Jaskani, M.J., Khan, M.M., Malik, T.A. (2003). *In vitro* induction of polyplids in watermelon and estimation based on DNA content. *International Journal of Agriculture & Biology*, 5(3):298-302.
- Méndez-Prieto, J., Ramírez, C.A., Gutiérrez, A.D., García, F.P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 40(4):29-44. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93941243003>
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología aplicada*, 5(4-2):149-155. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-221620060004100020&script=sci_arttext
- Rodríguez, M.C. (2014). *La vida cotidiana en el territorio contaminado de la Zacatecana, en Guadalupe, Zacatecas*

- (Tesis doctoral). Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social: 216.
- Rulkens, W.H., Tichy, J.T., Grotenhuis, C. (1998). Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. *Water Science and Technology*, 37(8):27-35
- Salas-Luévano, M.A., Manzanares-Acuña E., Letechipía-De León, C., Vega-Carrillo, H.R. (2009). Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23(1):27-32
- Santos-Santos, E., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García, I., Castro-Díaz, J., Gavilán-García, A., Rosiles, R., Suárez, S., López-Villegas, T. (2006). Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, México. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50(2):57-63. Recuperado de <http://www.jmcs.org.mx/OLD/PDFS/V50/N2/02-Analysis.pdf>



Fitobactorremediación como alternativa de mejoramiento de suelos contaminados con petróleo y su posterior uso como suelos agrícolas

Viviana Matilde Mesa-Cornejo

Centro Universitario de los Lagos | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Milton Fajardo, Olga Lucía Sanmiguel

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

Graciela Chalela-Álvarez

Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA

correo-e: gchalela@unab.edu.co

Resumen

Esta investigación se basó en un proceso de innovación biotecnológica con los siguientes componentes: *a)* Aislamiento y caracterización de bacterias edáficas y rizosféricas. *b)* Bioaumentación y adaptación de microorganismos autóctonos y foráneos en medios contaminados con petróleo. *c)* Evaluación de la actividad microbiana. *d)* Selección de plantas tolerantes al hidrocarburo que presentaron un aumento en la cobertura. *e)* Evaluación del comportamiento de las plantas en suelos contaminados. *f)* Determinación de la interrelación planta-bacteria y sus efectos en la biodegradación. Se encontraron valores de bioremediación del 70.5%, para la biodegradación 42.26%, para la fitorremediación y 62% para la fitobactorremediación.

Palabras clave: fitobactorremediación, innovación tecnológica, biorremediación, suelos contaminados.

Introducción

El problema de la contaminación ambiental es una de las principales preocupaciones del hombre del siglo XXI. En particular, el petróleo constituye una de las principales fuentes de contaminación del medio ambiente, ya que la mayor parte de sus componentes son recalcitrantes a la biodegradación. La finalidad de esta investigación fue examinar cual bioproceso (biodegradación natural, fitorremediación, biorremediación y fitobactorremediación) aportó una mayor recuperación ecológica de una manera económica en sistemas terrestres afectados por derrames inducidos de crudo. Se basó en: 1) La determinación de las especies vegetales de mayor resistencia a la contaminación con hidrocarburos, decidiendo cuáles de ellas eran capaces de aportar una mayor cobertura y biomasa para poder ejercer los procesos de fitorremediación. 2) El uso de un «biorreactor» natural rizosférico para aumentar la fitobactorremediación (Arendt *et al.*, 1993; Porta *et al.*, 1994).

Metodología

1. Se indujo la contaminación con crudo pesado al 30% p/p. El suelo se analizó para evitar la fertilización química que podría tener efecto sobre el bioproceso.

2. Se aislaron bacterias nativas del suelo y se conformaron consorcios bacterianos:

Consortio 1. *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Novcardia spp.*

Consortio 2. *Edwardsiella spp.*, *Hafnia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*

Consortio 3. *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, y *Corynebacterium spp.*

Consortio 4. conformado por *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, resultantes del estudio microbiano realizado al crudo, los cuales se adaptaron al 10% de hidrocarburo para iniciar el proceso de biodegradación por bioaumentación.

3. Las plantas se escogieron teniendo en cuenta su capacidad reproductora y poder de adaptación,

plantas que no fuesen para consumo humano, de amplia distribución en el medio y pertenecientes a las gramíneas, fabáceas, rutáceas y mimosáceas y se seleccionaron de acuerdo al porcentaje de germinación en un medio hidropónico de Jensen con crudo y sin crudo. Si el porcentaje de germinación era igual o superior al 80% se consideraban viables.

4. Para el cultivo de los diferentes consorcios se utilizaron biorreactores de 40 litros con baffles deflectores y un dispersor de pastilla perforada y se alimentaron con aire comprimido. El medio de cultivo estuvo compuesto por sales de cloruro de potasio y sulfato de magnesio. El pH se mantuvo entre valores de 6.5 a 6.8 unidades.

5. Los bioprocesos descritos de fito-, bacto-, fitobactorremediación y de intemperismo (biodegradación natural), *in situ*, se realizaron por duplicado, preparándose siete semilleros en cuatro hileras para un total de 28 semilleros, utilizando un control sin crudo.

6. Se utilizaron *Swinglea glutinosa* y *Brachiaria decumbens* que fueron las sobrevivientes a las cuales se sembraron 7 días después de la contaminación del suelo con el crudo. Para determinar el efecto del hidrocarburo sobre el crecimiento se analizaron la altura (flexómetro), el diámetro del tallo (calibrador) y la cobertura de la planta (cuadrante imaginario). Se determinaron el índice de tolerancia, la biomasa de la raíz y de la planta, se hizo un análisis nutricional foliar de las especies vegetales utilizadas y se delimitó la presencia de metales pesados (Bolton & Gorby, 1995; Cornish *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1995a; Cunningham *et al.*, 1995b; Gruiz, 1995; Porta *et al.*, 1994; Cunningham & Ow, 1996).

Resultados y discusión

El recuento de microorganismos del suelo con crudo fue de 65×10^4 UFC/mL mientras que para el suelo sin crudo fue de 44×10^5 UFC/mL, lo cual demuestra una disminución en el proceso de adaptación de los

microorganismos. Se determinó igualmente la volatilidad del crudo y la penetrabilidad, determinándose que el crudo utilizado es de baja viscosidad y por consiguiente de alta penetrabilidad. En el crudo se encontraron bacterias de los géneros *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, y *Pseudomonas spp.*, que conformaron el consorcio 4.

Las plantas escogidas por su adaptabilidad a las condiciones contaminantes fueron *Swinglea glutinosa* y *Brachiaria decumbens* de entre 15 especies sembradas. Con porcentajes de mortalidad inferiores al 8% para *Brachiaria decumbens*, con 90% de cobertura y para *Swinglea glutinosa* de 10% de mortalidad y cobertura entre el 62 y el 83%. Los consorcios microbianos se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas y observación micro- y macroscópica.

Se determinaron *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Nocardia minutissima*, *Corynebacterium difficile* y *Pseudomonas putida*. Se observaron diferencias en el tipo de crecimiento con un corto periodo de adaptación, tres días, con curvas de tipo diaúxico. Las variaciones del pH fueron 7.98 hacia el día 30 del experimento comparado con el día 1 que fue de pH 7.6. El máximo crecimiento celular fue de 940×10^6 UFC/mL conseguido hacia el día 32 y un mínimo de 83×10^5 conseguido al día 17, ello demuestra la adaptación de los microorganismos.

El porcentaje de biodegradación para *Brachiaria decumbens* sin inóculo microbiano fue de 47.3%; con los consorcios 1, 2 y 3 fue de 67.57% y con el consorcio 4 fue de 64.49%. Para *Swinglea glutinosa* sin inóculo fue de 41.22%, con los consorcios 1, 2 y 3 fue de 64.49% y con el consorcio 4 fue de 59.46% de remoción.

Con respecto a la biorremediación los porcentajes más altos de remoción fueron del 78% con los consorcios 1, 2 y 3, y de 76% con el consorcio 4. Los porcentajes de remoción por fitorremoción fueron del 41.22% para *Swinglea glutinosa* y de 47.3% para *Brachiaria decumbens* frente al control de 41.45%.

En cuanto el porcentaje de fitobactorremediación con los consorcios 1, 2 y 3 fue de 65.57% de remoción para *Brachiaria decumbens* y de 59.46 % con

el consorcio 4; para *Swinglea glutinosa* de 57-77% con los consorcios 1, 2 y 3 y de 64.49% con el consorcio 4. Se pudo determinar igualmente una tendencia a desarrollar en las plantas utilizadas biomasa aérea o vicio de crecimiento.

Brachiaria decumbens inoculada con los consorcios 1, 2, 3 y 4 mostró la mayor longitud de la raíz con 36.56 cm frente al control de 34.25 cm; con una biomasa de 9.3 g frente al control de 6.24 g; la longitud del tallo 65.85 cm, frente al control 52.9 cm y la biomasa de la planta de 78.5 g y una cobertura de 70% frente al control de 81.79 g de biomasa y 60.5% de cobertura. Los niveles de Ni analizados a toda la planta fueron de 0.06 ppm.

Conclusiones

a) En medios de cultivo con sales y crudo al 10% el crecimiento bacteriano fue de 860×10^6 UFC/mL, mientras que sin crudo fue de 72×10^6 UFC/mL.

b) El valor del pH durante el proceso de biodegradación fue de 7.28 en el laboratorio, de 7.87 en los biorreactores y de 6.54 en los semilleros.

c) El crecimiento poblacional de adaptación para la fitobactorremediación fue de 294×10^5 UFC/mL en los biorreactores.

d) Para los 10 primeros días del bioproceso de degradación y con los consorcios 1, 2, 3 y 4 la remoción fue del 68%.

e) Para la biorremediación el porcentaje de biorremoción fue 78.04%, el porcentaje de eficiencia 66.5%.

f) Para la fitorremediación con *Swinglea glutinosa* fue de 41.23% de biorremoción y 30% de eficiencia. Con *Brachiaria decumbens* de 47.3% de biorremoción y 35.8% de eficiencia.

g) Para la fitobactorremediación con los consorcios 1, 2, 3 y 4 con *Swinglea glutinosa* fue de 64.49% de biorremoción y 52% de eficiencia y para *Brachiaria decumbens* 67.57% de biorremoción y 56% de eficiencia.

Referencias

- Bolton, H., Gorby, Y.A. (1995). An Overview of the Bioremediation of Inorganic Contaminants (pp. 1-15). In Hinchee, E., Means, J.L., Burris, D. (Eds.), *Bioremediation of Inorganics*. Columbus, OH: Battelle Press.
- Cornish, J.E., Goldberg, W.C., Levine, R.S., Benemann, J.R. (1995). Phytoremediation of Soils Contaminated with Toxic Elements and Radionuclides (pp. 55-64). In Hinchee, E., Means, J.L., Burris, D. (Eds.), *Bioremediation of Inorganics*. Columbus, OH: Battelle Press.
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C. (1996). Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants. *Advances in Agronomy*, 56:55-114.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. (1995a). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, 13(9):393-397.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. (1995b). Remediation of Contaminated Soils and Sludges by Green Plants (pp. 33-54). In Hinchee, E., Means, J.L., Burris, D. (Eds.), *Bioremediation of Inorganics*. Columbus: Battelle Press.
- Cunningham, S.D., Ow, D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*, 110:715-719.
- Gruiz, K., Kriston, E. (1995). *In Situ* bioremediation of Hydrocarbon in soil. *Journal of Soil Contamination*, 4(2):1-11.
- Porta, C.J., López, A.C., Roquero, C. (1994). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Rulkens, W.H., Grotenhuis, J.T, Soczó, E.R. (1993). Remediation of contaminated soil; state of the art and desirable future developments (pp. 1007-1018). In Arendt, F., Annokke, G.J., Bosman, R., Van Den Brink, W.J. (Eds.), *Contaminated Soil*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.



Bioacumulación de plomo en chile de árbol (*Capsicum frutescens* L.) cultivado en Guadalupe, Zacatecas

Consuelo Letechipía-de León, Héctor René Vega-Carrillo, Víctor Martín Hernández-Dávila
Unidad Académica de Estudios Nucleares | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Irma Cruz Gavilán-García
Facultad de Química | UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Miguel Ángel Salas-Lúevano
Unidad Académica de Agronomía | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

Resumen

El objetivo fue evaluar el contenido de Pb en suelos y en *Capsicum frutescens* L. (chile de árbol) cultivado en una zona de Guadalupe, Zacatecas. Las muestras fueron recolectadas directamente de los campos de cultivo de la zona de estudio, se pesaron 3.0 g de suelo y 5.0 g de chile triturado. Las muestras, para la determinación de Pb, fueron digeridas con la técnica ácido húmeda y la determinación de la concentración de Pb se realizó mediante Espectrometría de Absorción Atómica de Flama. Los resultados para la concentración promedio de Pb en chile de árbol fueron 8.588 ± 1.923 mg/kg y para suelo agrícola de 1194.093 ± 1628.469 mg/kg. El alto contenido de Pb en chile posiblemente tiene su origen porque hace más de 100 años existen depósitos antiguos de jales, donde han extraído una capa superficial de suelo de 1.0 m para el beneficio de metales preciosos. Por consiguiente, como el chile es uno de los productos agrícolas con alto nivel de exportación y carece de información de los sistemas de inocuidad, es importante inspeccionar el contenido de MPB en esta hortaliza, ya que niveles superiores a los permitidos por la normatividad puede ser una fuente potencial de intoxicación para los consumidores.

Introducción

El medio ambiente está formado por componentes bióticos y microorganismos, también incluye suelo con todos sus minerales, el agua y la atmósfera (Patil, 2012). Cuando se liberan sustancias químicas peligrosas, como metales pesados (MPs), en el ambiente causan una gran preocupación medioambiental (Özcan *et al.*, 2007). En el ámbito mundial, MPs como el Pb, Cd, Cu y Zn son dispersados en áreas rurales a través de la deposición atmosférica y el uso de agroquímicos y abonos. Concentraciones altas ponen en peligro la salud humana y animal, al alimentarse de cultivos contaminados (Brus y Jansen, 2004).

Sin embargo, las concentraciones irregulares de MPs como el Pb y elementos traza en los suelos, procede mayoritariamente de la minería. Los efectos adversos al medioambiente, asociados con la deposición de grandes volúmenes de residuos con pirita y otros sulfuros, cuya oxidación libera grandes cantidades de MPs (Belmonte *et al.*, 2010). El Pb es un tóxico fisiológico y neurológico que puede afectar a casi cualquier órgano en el cuerpo humano. La exposición en la dieta al Pb ha sido identificada como un riesgo a la salud a través del consumo de hortalizas. La emisión de plomo de las industrias puede ser depositada en las hortalizas durante su producción, transporte y comercialización (Banerjee *et al.*, 2010).

En consideración al enorme consumo mundial de frutas de diversas especies de *Capsicum spp.*, la utilización de la capsaicina como aditivo alimentario y su aplicación medicinal actual, la evaluación y valoración de los efectos nocivos de los frutos, se justifica en los esfuerzos para proteger la salud pública (Antonious y Kochhar, 2009). La absorción por la planta es una de las principales vías por las cuales los metales entran en la cadena alimentaria (Antonious y Kochhar, 2009).

Por otro lado, en Zacatecas los relaves producidos durante el periodo de la antigua minería, se colocaron a los lados de los sitios de extracción. Estos residuos, en su mayoría procedentes de las minas de

Vetagrande y Zacatecas, fueron arrastrados por las lluvias hacia el arroyo de La Plata; que desembocaba en el embalse de la presa El Pedernalillo en la comunidad La Zacatecana, Guadalupe, Zacatecas, donde fueron dispersándose en un área agrícola de aproximadamente 18 a 30 km x 2-3 km (Ramírez-Ortiz y Núñez, 2009; Ogura *et al.*, 2003; Santos-Santos *et al.*, 2006).

Se destaca que algunas compañías han realizado análisis cuantitativo de los suelos agrícolas procedente de la zona y han reportado que están contaminados con grandes cantidades de arsénico, plomo y mercurio (Ramírez-Ortiz y Núñez, 2009; Ogura *et al.*, 2003). El objetivo de este trabajo fue cuantificar la concentración de Pb en suelo agrícola y chile de árbol (*Capsicum frutescens L.*).

Metodología

El presente trabajo se realizó en la comunidad de Zóquite, del municipio de Guadalupe, Zacatecas México. Esta área es rica en depósitos naturales de arsénico y plomo, área involucrada en actividades agrícolas y de pastoreo de ganado, geográficamente se encuentra localizada en un valle donde el agua que se utiliza proviene de las montañas cercanas y el río La Plata, el cual desemboca en la presa de jales mineros La Zacatecana (Santos-Santos *et al.*, 2006).

Las muestras (suelo y chile) se tomaron de los predios a los cuales se obtuvo el permiso de los propietarios, y la toma de la muestra se llevó a cabo mediante la técnica de tresbolillo; se obtuvo un total de 14. Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad de 0-15 cm, la cual fue seleccionada debido a que representa las técnicas empleadas para la agricultura (Santos *et al.*, 2006). Las muestras de chile fueron secadas a temperatura ambiente y después trituradas, hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm aproximadamente y almacenadas en contenedores de plástico previamente tratados con una solución de HNO₃ al 30%, se enjuagaron con agua desionizada hasta su procesamiento analítico.

Por otra parte, las muestras de suelo agrícola fueron molidas en mortero y tamizadas en tamiz del número 40. Para el análisis de plomo en Chile se tomaron 3 g de muestra y 5 g de suelo, se les aplicó una digestión ácida empleando 5 y 3 ml de agua regia (HNO_3 y HCl 3:1). Se calentó a 85°C durante 60 min. Se enfrió, se filtró y se aforó hasta 50 ml con agua desionizada. El análisis cuantitativo del analito (Pb) se realizó por la técnica de EAA-Flama, en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer, Modelo 3410 con un límite de detección de 0.19 mg/L. Se emplearon estándares comerciales para Pb High-Purity Standar de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Resultados y discusión

En el presente estudio se cuantificó la concentración de Pb en suelo agrícola y Chile de árbol (*Capsicum frutescens* L.). Las concentraciones de Pb encontradas en el Chile de árbol van desde los: 5.537 ± 0.892 mg/kg hasta, 11.384 ± 1.800 mg/kg, con una concentración promedio de 8.588 ± 1.923 mg/kg como se muestra en la figura 1. Las concentraciones de Pb en suelo agrícola van desde los 35.033 ± 5.397 mg/kg hasta los 5423 ± 828 y un promedio de 1194.093 ± 1628.469 mg/kg.

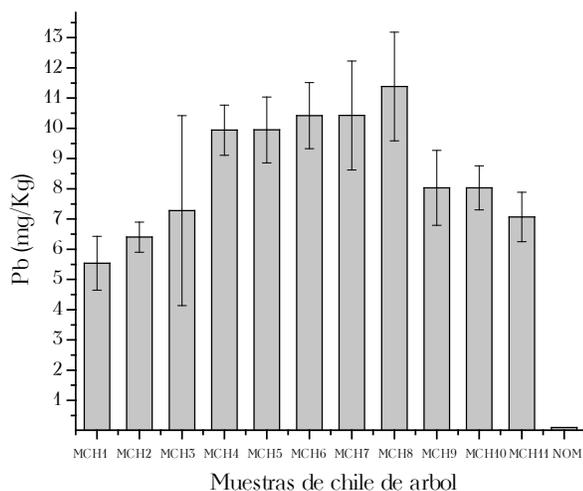


Figura 1. Gráfica de la concentración promedio de Pb en mg/kg en Chile de árbol.

Cuadro 1
Concentración en ppm de Pb
en Chile y suelo agrícola

Muestras	[Pb] en Chile	[Pb] en suelo
M1	5.537 ± 0.892	635.982 ± 25.698
M2	6.401 ± 0.500	101.353 ± 27.351
M3	7.277 ± 3.440	35.033 ± 27.351
M4	9.940 ± 0.830	89.890 ± 0.203
M5	9.947 ± 1.089	2315.616 ± 385.187
M6	10.422 ± 1.094	1952.776 ± 0.552
M7	10.426 ± 1.800	1678.161 ± 63.307
M8	11.384 ± 1.800	5423.275 ± 828.722
M9	8.032 ± 1.240	435.857 ± 27.995
M10	8.031 ± 0.725	429.666 ± 29.016
M11	7.068 ± 0.845	37.419 ± 2.322

El alto contenido de Pb en la muestra MCH8 puede ser debido a que hace algunos años se retiró una capa superficial de 1.0 metros aproximadamente para la extracción de metales preciosos, llegando a la capa donde hace más de 100 años. Según De La Vega (1994), existen depósitos antiguos de jales que fueron arrastrados hasta los suelos agrícolas de diversas comunidades del municipio de Guadalupe, Zacatecas. Además, con base en el trabajo reportado por Santos *et al.* (2006), se confirma que la principal fuente de contaminación de MPs en áreas cercanas a la zona de estudio se relacionan con las actividades mineras antiguas realizadas por la comunidad de las colonias Osiris y La Zacatecana, localizadas a una distancia aproximada de 3 km. En el cuadro 1 se muestra la concentración en mg/kg de plomo registrados en Chile y suelo agrícola.

Todas las muestras rebasan los límites máximos de Pb para hortalizas, excluidas las del género *Brassica*, las hortalizas de hoja, las hierbas frescas y las setas, que es de 0.1 mg/kg peso fresco, al igual que la Norma del Codex Alimentarius (WHO, 2004) para verduras en general. El contenido de MPs en las plantas depende de la biodisponibilidad del metal en el suelo y de la deposición atmosférica. Los Chile

picantes como el de árbol, absorben MPs de suelos contaminados, aire y agua.

Es posible que los exudados de la raíz de estos genotipos de pimiento picante contuvieran enzimas que hidrolizan algunas formas complejas de este metal para mejorar la solubilidad del Pb para llevarlo del suelo a las plantas, aumentando así su acumulación en los frutos. En la figura 4 se muestra una gráfica de las concentraciones promedio de Pb en mg/kg en chile. Las altas concentraciones de este metal en hortalizas cultivadas en la zona de estudio indican la presencia de contaminación de MPs, debido a los antiguos depósitos de jales mineros.

La concentración de este metal en suelo varía de acuerdo con la ubicación de la toma de muestra. La media general es 1194.093 ± 1628.469 . Concentraciones entre 35.033 ± 5.397 y 5423.275 ± 828.722 ppm fueron detectadas. La NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece una concentración máxima de 400 mg/kg para suelo de uso agrícola.

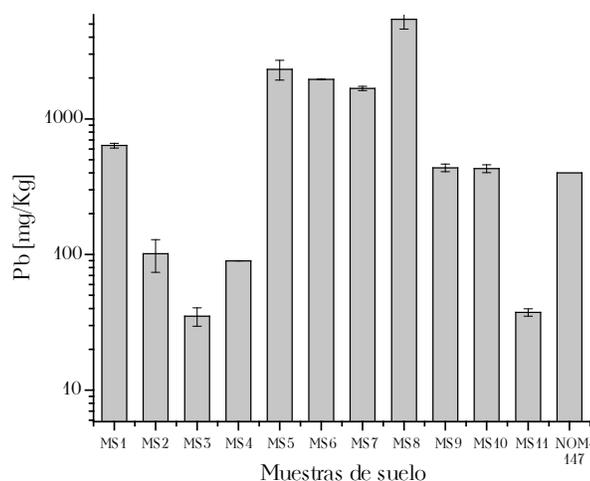


Figura 2. Gráfica de la concentración promedio de Pb en mg/kg en suelo agrícola.

Cuatro de estas muestras están por debajo del límite de 400 ppm. Sin embargo, al comparar los valores encontrados con la normatividad europea que indica una concentración máxima de 300 ppm, sólo cuatro de estas muestras están dentro del límite permisible. La prevención de la acumulación de MPs a un nivel peligroso es una de las condiciones

para la producción agrícola sostenible. Asimismo, la liberación de grandes cantidades de MPs en el medio ambiente pueden acumularse en el entorno, lo cual representan un peligro significativo para la salud y medio ambiente (Korkmaz *et al.*, 2014).

Conclusiones

Fueron cuantificadas las concentraciones de Pb en suelo agrícola y chile de árbol de la comunidad de Zóquite, Guadalupe, Zacatecas. Los resultados obtenidos demuestran que los valores encontrados para las muestras de chile de árbol superan las concentraciones establecidas en el reglamento No. 1881/2006 de la Comisión Europea. Por otra parte, los valores de Pb para suelo agrícola más de la mitad superaron los valores establecidos por la NOM-147. Además, este estudio permitirá buscar estrategias tecnológicas agropecuarias para aumentar la inocuidad del chile de árbol en la zona.

Con relación a la cuantificación de Pb en suelos agrícolas, se registró una concentración máxima de 400 mg/kg con un promedio de 1194.093 ± 1628.469 mg/kg. En las muestras de chile la concentración promedio de Pb fue 8.588 ± 1.923 mg/kg. Con fundamento en los resultados obtenidos son necesarias normas oficiales para Pb en vegetales en México. Todas las muestras de chile superan la norma oficial europea vigente.

Referencias

- Antonious, G.F., Kochhar, T.S. (2009). Mobility of heavy metals from soil into hot pepper fruits: A field study. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 82: 59-63.
- Bakkali, K., Ballesteros, E., Souhaili, B. and Ramos, N. (2009). Determinación de trazas metálicas en aceites vegetales de España y Marruecos mediante espectroscopia de absorción con cámara de grafito después de la digestión en horno de microondas. *Grasas y aceites*, 60(50):490-497.

- Banerjee, D., Kuila, P., Ganguly, A. and Ray, L. (2010). Market basket survey for chromium, copper, lead and cadmium in some vegetables from different shopping malls in Kolkata, India. *EJEAFChe*, 9(7): 4190-4195.
- Belmonte, S.F., Díaz, F.R., Sarría, J.A., Brotóns, M., Rojo, L.S. (2010). Afección de suelos agrícolas por metales pesados en áreas limítrofes a explotaciones mineras del sureste de España. *Papeles de Geografía*, 51(52):45-54.
- Brus, D.J., Jansen, M.J.W. (2004). Heavy metals in the environment. Uncertainty and sensitivity analysis of spatial predictions of heavy metals in wheat. *Journal Environmental Quality*, 33:882-890.
- Comunidad Europea (CE) (2006). Contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. En *Reglamento (CE) No 1881/2006*. La Comisión de las Comunidades Europeas.
- De la Vega, S. (1994). Crecimiento urbano en la ciudad de Zacatecas y sus asentamientos en zonas mineralizadas polimetálicas. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 11(4):406-412.
- Ogura, T., Ramírez-Ortiz, J., Arroyo-Villaseñor, Z. M., Hernández-Martínez, S., Palafox-Hernández, J.P., García de Alba, L.H. and Fernando, Q. (2003). Zacatecas (México) companies extract Hg from surface soil contaminated by ancient mining industries. *Water Air and Soil Pollution*, 148(1):167-177.
- Özcan, S., Özcan, A. (2007). Adsorption Potential of Lead (II) Ions from aqueous solutions on to *Capsicum annum* seeds. *Separation Science and Technology*, 42(4): 137-151.
- Patil, U. (2012). Environmental air pollution and its harmful effects-a study in indian context. *Indian Streams Research Journal*, 2(10).
- Ramírez-Ortiz, J., Núñez, M.J. (2009). Study of soil contaminated with arsenic, cadmium and lead in ancient tailings in Zacatecas, México. *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(3):120-124.
- Rapheal, O., Sunday, K. (2014). Assessment of trace heavy metal contaminations of some selected vegetables irrigated with water from River Benue within Makurdi Metropolis, Benue State Nigeria. *Advances in Applied Science Research*, 2(5):590-604.
- Santos-Santos, E., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-García, I., Castro-Díaz, J., Gavilán-García, A., Rosiles, R., Suarez, S. and López-Villegas, T. (2006). Analysis of arsenic, lead and mercury in farming areas with mining contaminated soils at Zacatecas, Mexico. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50(2):57-63.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2007). Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, *Diario Oficial*. Recuperado de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf
- World Health Organization (2004). *Codex Committee on food Additives and Contaminants*. Rotterdam: Autor. Recuperado de www.codexalimentarius.org/



Control de *Dendroctonus mexicanus* en zonas forestales de Durango empleando bioinsecticidas

Gabriel Nicolás Aviña-Martínez | Jesús García-Pereyra
| Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana

correo-e: avinagabriel@hotmail.com

Resumen

La zona forestal de Durango es la mayor área certificada de bosques en México, la entidad ocupa el primer lugar en producción forestal en México, con una producción de 1.5 millones de metros cúbicos de madera en rollo. La sequía prolongada, entre otros factores, ha generado las condiciones para la reproducción de poblaciones de insecto-plaga principalmente de gusano descortezador (*Dendroctonus sp.*) que actualmente ha ocasionado daños en 250 000 hectáreas de bosques de pino-encino del estado de Durango, con pérdidas de más de 100 millones de pesos. Con el objeto de encontrar una alternativa sustentable con el medio ambiente para minimizar los efectos de esta plaga, en el laboratorio de biología molecular del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana de Durango, se efectuó el aislamiento de un hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, el cual cohabita en el gusano descortezador y lo controla de manera natural. Se produjo un bioinsecticida por medio de la técnica de Fermentación en Medio Sólido (FMS), empleando un diseño experimental de bloques al azar para tres tratamientos y seis repeticiones para la obtención del medio sólido. Los tratamientos fueron las fuentes de carbono: sorgo, trigo y papel reciclado, las variables a estudiar fueron concentración de esporas/ml, peso seco gr/ml y dosis letal. Los resultados más importantes se sometieron a un análisis de varianza y los resultados indican que el rendimiento promedio de las tres fuentes de carbono fue de 1.8×10^9 esporas/g. El medio obtenido se mezcló con tierra de diatomeas hasta obtener un peso de 240 g de producto formulado por bolsa, cantidad suficiente para aplicar en una hectárea de arbolado. Adicionalmente se realizaron bioensayos en una cámara bioclimática CB-14[®] mediante la técnica de asperjado con bioinsecticida a una concentración de 1×10^8 esporas/ml, comparando dos cepas comerciales METATRON[®] y CIIDIE-IPN[®] contra la cepa nativa aislada del gusano descortezador en el laboratorio de biología molecular, para este propósito se emplearon contenedores de 10 x 20 cm de plástico, se midió el grado de mortandad para cada cepa y se encontró que la cepa nativa aislada del gusano descortezador en el laboratorio fue más efectiva que la comercial METATRON[®] y CIIDIR-IPN[®]. Presentó una mortalidad superior al 80% a las 72 h de exposición, comparada con las dos cepas comerciales que mostraron ambas una mortalidad inferior a un 50 % a las 72 h.

Palabras clave: entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae*, *Dendroctonus mexicanus*, bioinsecticidas.

Introducción

El control o manejo integrado de plagas (MIP) es un sistema que trata de mantener las plagas de un cultivo a niveles que no causen daño económico, emplea preferentemente los factores naturales adversos al desarrollo de las plagas, recurre al uso de pesticidas como medida de emergencia. Para que el MIP pueda funcionar es necesario: *a)* Establecer un sistema de evaluación periódica (monitoreo) de los niveles de las plagas y sus enemigos naturales en el campo. *b)* Tener una idea de los límites de infestación que pueden ser tolerados en el área sin que se efectúe su rendimiento.

Al MIP se le considera como el sistema más razonable desde el punto de vista ecológico para preservar la calidad del medio ambiente contra la contaminación por pesticidas, al mismo tiempo que se protege el ecosistema contra los daños de las plagas (Tamez *et al.*, 2004).

En México se tienen registradas más de 200 especies de insectos y patógenos que provocan daños en los ecosistemas forestales (Zúñiga *et al.*, 1999). Los descortezadores son un grupo de insectos de gran importancia forestal. Los daños causados a las masas forestales pueden ser desde un pequeño grupo de árboles hasta cientos o miles de hectáreas. Son organismos que se desarrollan debajo de la corteza de los árboles, debilitándolos y provocándoles la muerte (Billings *et al.*, 1990).

De acuerdo con el Consejo Mundial de Manejo Forestal, las zonas forestales de Durango son la mayor área certificada de bosques en México. La entidad ocupó el primer lugar en producción forestal en 2003, con 4.93 millones de m³ de madera en rollo, a partir de 2005 disminuyó a 4.5 millones de m³. La sequía prolongada de 2014 generó condiciones para la reproducción de poblaciones de insecto-plaga como *Dendroctonus sp.* e *Ips* en los municipios de Durango, Pueblo Nuevo, San Dimas, Canatlán, Santiago Papasquiari, Guanacevi, Súchil y El Mezquital.

Metodología

Los muestreos y colecta de insectos-plaga de pino (*Dendroctonus sp.*) se realizaron en zonas forestales infestadas en los municipios de Durango, San Dimas y Pueblo Nuevo del estado de Durango. Se realizaron 25 colectas en troncos de pinos derribados y descortezados por las cuadrillas de las unidades de administración forestal, previamente marcados.

La colecta de insectos-plaga se realizó en contenedores de plástico de 20.0 x 10.0 cm. Se les adicionó una dieta controlada (a base de miel de maguey mezclada con aserrín) y posteriormente se trasladaron al laboratorio de biología molecular del Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana (ITVG), ubicado a 50 km al este de la ciudad de Durango. Los insectos se colocaron en una cámara bioclimática CB-14; se mantuvieron dentro de envases de plástico en condiciones de temperatura 18°C y 90% HR, los que presentaron mayor similitud con los síntomas de *M. anisopliae* se apartaron del resto para su observación en el microscopio.

Aislamiento de la cepa de hongo Entomopatógeno

Para realizar el aislamiento de la cepa nativa del hongo se utilizó la técnica de macerado de insectos-plaga *Dendroctonus sp.* (Guerrero y Aguilera, 2000). En un vaso de precipitado de 10.0 ml con agua destilada estéril se agregó 5.0 g de *Dendroctonus* seco, la mezcla se homogenizó con un agitador magnético a máxima potencia durante 5 min.

A partir de la mezcla se tomó 1.0 ml de la solución y, posteriormente, se hicieron diluciones 1:200 y se vertieron en 1.0 ml en caja petri con medio de cultivo agar dextrosa papa, del cual se tomó 1.0 ml de suspensión de esporas y se realizaron tres diluciones distintas: 1:400, 1:800 y dos siembras por estría, éstos se incubaron a 28°C durante 72 h.

Posteriormente, se sembraron por estría y punto las colonias que tuvieron apariencia similar a *M.*

anisopliae sp., *Beauveria* sp., y *Paecilomyces* sp. Éstas se dejaron incubar a 28°C por 96 h. Las colonias que presentaron crecimiento se sembraron por estría para su posterior identificación. El crecimiento de *M. anisopliae* en medio de cultivo sólido PDA se presentó en forma de colonias blancas y más tarde en verde oliva.

Las conidios nacen alrededor de la colonia de 5-8 x 2.5-3.5 µm, con pared gruesa amarillenta-verdosa. La longitud de las conidios fue medida en µm con el programa Motic Plus® se utilizó el microscopio Motic® 102M que cuenta con una cámara integrada, se obtuvo la media de un total de 20 mediciones en el microscopio. Se realizó la comparación de la cepa nativa con dos cepas comerciales que se tiene en conservación en el ITVG: METATRON® y CIDIIR®, ambas con gran similitud. La cepa nativa se sembró en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA) inclinado en tubos de ensaye para su conservación a 4°C, la cual fue empleada como inóculo posteriormente (figura 1).



Figura 1. Aislamiento de la cepa nativa de *M. anisopliae* de insecto-plaga *Dendroctonus* sp.

Producción del bioinsecticida

Se utilizaron tres fuentes de carbono: granos de sorgo, trigo resquebrajado de segunda calidad con un 40% de grano quebrado sin cascarilla y papel reci-

clado, se lavaron las fuentes tres veces con agua potable, en seguida se dejó en reposo por 30 min con 130 ppm de una mezcla de antibiótico (tetraciclina y furazolidona, dos pastillas de cloranfenicol/litro) (González y García, 2006).

La producción del bioinsecticida se hizo en Fermentación en Medio Sólido (FMS), en bolsas de polipapel de 750 g de sustrato sólido previamente esterilizado, inoculadas con 10 ml/bolsa de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^6 esporas/ml, se utilizó una jeringa de repetición de uso veterinario con control automático de volumen. El orificio dejado por la aguja de inoculación se selló con cinta adherible; luego, los sustratos de las fuentes de carbono se homogenizaron con la suspensión del inóculo.

Finalmente, las bolsas se pusieron en una sala de germinación y crecimiento. En esta área, las bolsas permanecieron en estantes a temperatura constante de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo (horas-luz) 14:10 por 16 ± 2 días, hasta alcanzar la esporulación. Durante este tiempo, las bolsas se removieron cada 4 días para aumentar la superficie de contacto espора-sustrato y por lo tanto aumentar la cantidad de esporas/bolsa. (García y González, 2010). Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, con tres tratamientos y seis repeticiones. Los tratamientos fueron las fuentes de carbono sorgo, trigo y papel reciclado; las variables estudiadas fueron concentración de esporas/ml, peso seco gr/ml y dosis letal media en bioensayos con *Dendroctonus mexicanus*.

Formulación del producto

El producto a base de la cepa nativa de *M. anisopliae* fue formulado usando tierra de diatomeas, como polvo humectable, las esporas fueron separadas de las tres fuentes de carbono con ayuda de tamices de 100-400 µm, el tamaño de partícula fue de aproximadamente 100 µm, en proporción 1:10 (1g de esporas aéreas por 10 g de tierra de diatomeas). En seguida, el producto fue almacenado en bolsas cerradas

herméticamente a condiciones ambientales, a una humedad menor al 10% (García y González, 2010) (figura 2).



Figura 2. Formulación del bioinsecticida con una concentración de conidios de 1.0×10^9 .

Resultados y discusión

Los resultados más importantes se obtuvieron de un análisis de varianza. El rendimiento promedio de las tres fuentes de carbono fue de 1.8×10^9 esporas/g, a dosis de 240g de producto formulado con tierra de diatomeas. En los bioensayos con aplicación por aspersión del bioinsecticida se reporta en este trabajo una mortalidad superior al 80% a las 72 h, por la cepa nativa de *M. anisopliae*, las cepas comerciales mostraron mortalidades inferiores a un 50% a las 72 h (fig. 3).

Hajek y Lager (1994) reportan mayores grados de mortandad de insectos-plagas cuando se les aplican patógenos obtenidos de manera natural del mismo insecto. Billings *et al.* (1990) indican que el gusano descortezador presenta mortandades similares a dosis de 240 a 480 g de producto a las mismas concentraciones de 1.8×10^9 esporas/g.

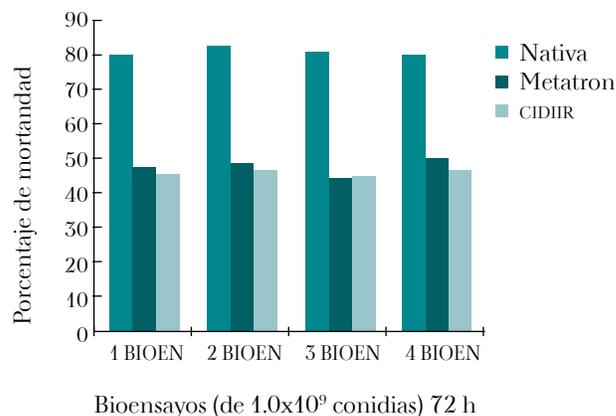


Figura 3. Porcentaje de mortandad empleando tres diferentes cepas de *M. anisopliae* en *Dendroctonus sp.*

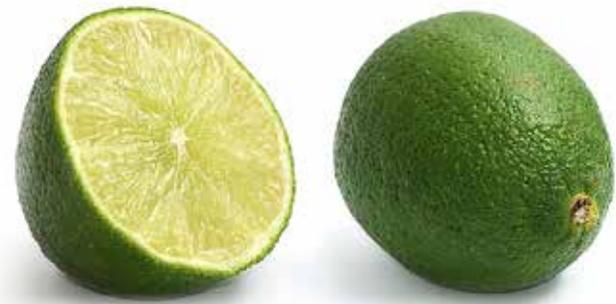
Conclusiones

El uso de cepas nativas permite contar con cepas adaptadas a las condiciones ambientales de la región de estudio y evita la introducción de cepas exóticas. La producción de bioinsecticida a base de cepas nativas de *M. anisopliae* es efectiva y de mayor virulencia que las cepas comerciales para el control de *D. mexicanus*, por lo que los productores forestales se beneficiarán al tener mejores opciones de mercado y menor costo de producción y por tanto un adecuado manejo sustentable de los recursos forestales de Durango.

Referencias

- Billings, R., Passé III, H.A., Flores, L.J. (1990). Los escarabajos descortezadores del pino, con énfasis en *Dendroctonus frontalis*: Guía de campo para la inspección terrestre. *Texas Forest Service Publication*, 146.
- Díaz, M., Flores, M., Rodríguez, S., De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12):856-860.
- García, G., González, M.B. (2010). Uso de bioinsecticida para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. *Ra Ximhai*, 6(1):17-22.
- Guerrero, J., Carrillo, R., Aguilera, A. (2000). Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo

- Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos. *Agro Sur*, 27(2):23-34.
- González-Maldonado, M.B., García-Gutiérrez, C. (2006). Control biológico de plaga de chapulín (*Orthoptera:Acrididae*) en Durango, México. *Vedalia*, 13(2):79-83.
- Hajek, A., Leger R. St. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39:293-322.
- Tamez Guerra, P., Galan Wong, L., Meldrano Roldán, H., García Gutiérrez, C., Rodríguez Padilla, C., Gómes Flores, R. (2004). Bioinsecticidas: Su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 6(2):143-152.
- Zúñiga, G., Mendoza Correa, G., Salinas-Moreno, R. (1999). Zonas de sobre posición en las áreas de distribución geográfica de las especies mexicanas de *Dendroctonus* Erichson (*Coleoptera: Scolytidae*) y sus implicaciones ecológico evolutivas. *Acta Zoológica Mexicana* 77:1-22.



Transformación genética de dos especies de cítricos asistida por *Agrobacterium tumefaciens*, usando el gen reportero *gusA* y el péptido antimicrobiano *Atta*

Marco Tulio Buenrostro-Nava | Christian Omar Gómez-Díaz | Aremi Mendoza-Espinoza
| Salvador Guzmán-González | Gilberto Manzo-Sánchez

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

correo-e: mbuenrostro@uclm.mx

Resumen

Los cítricos son de los frutales de mayor importancia a nivel mundial; sin embargo, las plagas y enfermedades ocasionan cuantiosas pérdidas económicas. El uso de ingeniería genética es uno de los métodos viables para el mejoramiento de los cítricos. El objetivo de este trabajo fue introducir el péptido antimicrobiano atacina A (*Atta*) y el gen reportero *gusA* en plántulas de cítricos usando *Agrobacterium tumefaciens* como vector. Semillas de limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle variedad «Colimex» y del portainjerto «Macrophylla» (*Citrus macrophylla*) fueron germinadas bajo condiciones *in vitro* y transformadas usando *A. tumefaciens*, conteniendo el plásmido binario con el gen antimicrobiano *Atta* y el gen reportero *gusA*. Posteriormente, se regeneraron brotes bajo condiciones selectivas y cuando tenían un tamaño de 2 a 4 mm fueron aislados y sometidos a una prueba histoquímica para detectar la expresión del gen *gusA*. Los resultados obtenidos mostraron un 100% (12 ex-plantas muestreadas) de transformación genética para la variedad «Macrophylla», mientras que «Colimex» presentó sólo un 50% (12 ex-plantas muestreadas). Se analizó y documentó la presencia del gen reportero *gusA* en los brotes, pero aún está pendiente corroborar la presencia del gen antimicrobiano *Atta* mediante PCR, lo cual producirá resultados más detallados sobre este trabajo.

Palabras clave: cítricos, Huanglongbing, *Agrobacterium tumefaciens*, gen *gusA*.

Introducción

El género *Citrus* comprende especies que se concentran en más de cien países en el mundo (Albrecht *et al.*, 2012). Al igual que en la mayoría de los cultivos, las principales pérdidas durante su producción son causadas por enfermedades, dentro de las cuales destaca el *Huanglongbing* (HLB), dragón amarillo o enverdecimiento de los cítricos, que posiblemente es la más destructiva por generar cuantiosas pérdidas económicas a la industria en las zonas afectadas (Gottwald, 2010). El HLB se detectó por primera vez en América en 2004, en el estado de São Paulo, Brasil, y después en 2005 se confirmó su presencia en Florida, EUA, donde ha tenido efectos devastadores por su vertiginosa velocidad de disseminación. La enfermedad se ha extendido a la mayoría de las zonas cítricas de todo el mundo, incluyendo Asia, Arabia Saudita y África (Albrecht *et al.*, 2012; Bové, 2006).

Se ha reportado la transformación genética en varias especies de cítricos mediante diversas metodologías. Luth y Moore (1999) fueron los primeros en reportar la transformación genética de toronja (*Citrus paradisi*) al introducir mediante *Agrobacterium tumefaciens* el gen reportero *gusA* y el marcador de selección *npIII*. Los autores detectaron la presencia del gen *gusA* en el 43.5% de los brotes regenerados después de la transformación; sin embargo, la mayoría resultaron ser quimeras y sólo un 11.9% mostró actividad en todos los tejidos.

El método de transformación genética más empleado es el de *A. tumefaciens*, ya que tiene la capacidad de transferir a las plantas un segmento específico de su genoma a los núcleos de las células de las plantas susceptibles. El ADN de transferencia (ADN-T) se delimita por 23 pares de bases que se repite en el plásmido inductor de tumores (Ti). Este plásmido sintético se añade a colonias de *A. tumefaciens* que albergan los plásmidos Ti que se encuentran normalmente en la naturaleza (Otten *et al.*, 2008).

De manera natural el ADN-T es importante para la infección, ya que contiene los genes que codifican para la producción de reguladores del crecimiento, cuando se expresa en la célula de la planta interrumpen el desarrollo y los eventos de división celular (Christie, 2009). Este sistema de transformación genética se ha usado ampliamente con propósitos biotecnológicos (Otten *et al.*, 2008).

La proteína atacina A (*Atta*) es de un tamaño de 20kD y es secretada por hemolinfas de *Tricoplusia ni* Hubner (Kang *et al.*, 1996), así como por *Drosophila melanogaster* Meigen. Su función principal es combatir las infecciones bacterianas a estos organismos. Se ha demostrado que la proteína *Atta* inhibe el crecimiento de las bacterias Gram negativas y aumenta la permeabilidad de la membrana externa (Engstrom *et al.*, 1984).

Metodología

Se usaron semillas de frutos maduros de limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle, variedad «Colimex», obtenidos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) estación experimental Tecomán y del portainjerto «Macrophylla» (*Citrus macrophylla*) del vivero comercial Edén.

Las semillas fueron extraídas de los frutos y sumergidas en 200 mL de una solución, conteniendo 0.002% de jabón líquido comercial en un vaso de precipitado de 500 mL con agitación de 15 a 20 min; al concluir el tiempo, se enjuagaron varias veces con agua desionizada hasta retirar por completo el jabón. Al término del enjuague, se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 20% (v/v) adicionado con TWEEN 20 (0.02% v/v), durante 20 minutos.

En seguida, se eliminó el exceso de cloro (dentro de la campana de flujo laminar) y se enjuagó con agua destilada estéril, repitiendo los enjuagues en 3 ocasiones. Posteriormente, fueron germinadas bajo condiciones *in vitro* en frascos con 25 mL de medio

MS (Murashig & Skoog, 1992), adicionado con vitaminas B5 (40). Los frascos se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ en la oscuridad durante 30 días, seguido de 15 días bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

A. tumefaciens que lleva el plásmido binario que contiene el gen antimicrobiano *AttA* y el gen reportero *gusA* se cultivó en medio YEP sólido (Sambrook & Russell, 2004), adicionado con rifampicina ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y kanamicina ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Posteriormente, se inoculó un frasco Erlenmeyer con 50 mL de medio YEP suplementado con los antibióticos descritos anteriormente y se cultivó a 28°C durante 48 horas con agitación constante. Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 6 000 rpm a 4°C por 10 minutos, y se re-suspendieron en medio MS líquido adicionado con el compuesto fenólico Acetosiringona (100 mM).

Posteriormente, se cortaron los explantes de epicótilo de aproximadamente 1 cm de largo y se incubaron en la solución con la bacteria por 20 min, después los explantes fueron transferidos a un medio de regeneración (MS, vitaminas B5, BA $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,4-D $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}$ y Phytigel $3 \text{ g}\cdot\text{L}$) complementado con Acetosiringona (100 mM).

Los explantes fueron cocultivados con la bacteria por 3 días bajo condiciones de oscuridad, después fueron transferidos a un medio de selección, el cual consistió del medio de regeneración más carbencilina $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, cefotaxima $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y kanamicina $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los explantes se cultivaron bajo las condiciones de luz antes descritas. Todos los antibióticos y los productos químicos aquí descritos fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, EUA), a menos que se indique lo contrario.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos a partir de brotes de 2 a 4 mm de longitud mostraron la expresión del gen *gusA* en un 100% (12 explantes muestreados) de los brotes de la especie «Macrophylla», mientras que la variedad «Colimex» presentó sólo 50% (12 explantes

muestreados). Esto denota que *Agrobacterium tumefaciens* mostró alta eficiencia de transformación para la especie *C. macrophylla*; en comparación con los resultados previamente reportados (Luth & Moore, 1999) se obtuvo solamente un 11.9% de transformación para el híbrido citrange «Carrizo». En el presente trabajo se puede observar la expresión del gen *gusA* uniformemente por toda la nervadura de la hoja en las dos especies transformadas.

Existen estudios en los que se reportan haber obtenido sólo 7.9% positivo de 168 brotes para la prueba histoquímica con *gusA* (Peña *et al.*, 1995). En el presente trabajo no sólo se observaron diferencias en los niveles de expresión entre las dos especies estudiadas, sino que también se observaron diferencias dentro de la misma especie, incluso dentro del tejido muestreado (figura 1). A pesar que estos estudios son preliminares y solamente se muestrearon un total de 24 clones, la variación en los niveles de expresión parece ser común en otras especies de cítricos según lo reportado previamente (Luth & Moore, 1999).

De acuerdo con la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la figura 2, se corroboró la presencia del péptido antimicrobiano *AttA* en los clones tres y cuatro. La falta de amplificación del gen en los clones uno y dos podría asociarse con la presencia de tejido quimérico, por lo que se estudiarán a mayor detalle. Después se comprobará la secuencia de este péptido utilizando la técnica Southern blot.

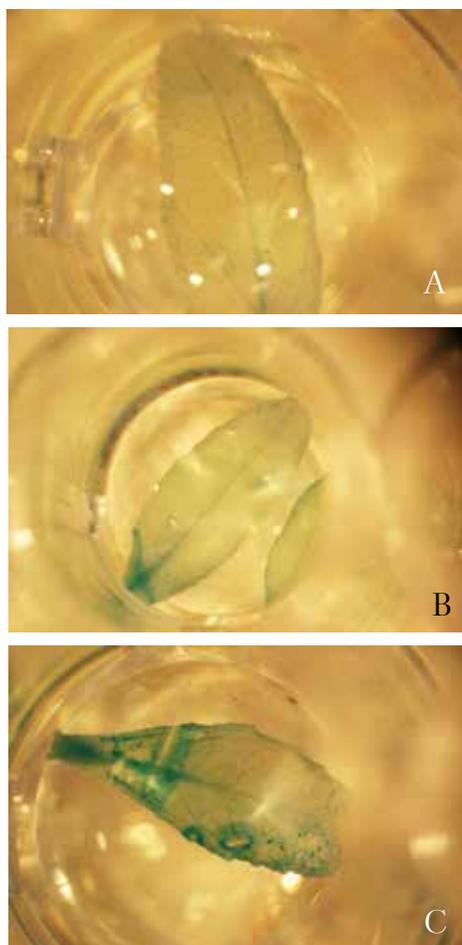


Figura 4. Comparación de especies de cítricos transgénicos de acuerdo con la expresión del gen *gusA* analizada histoquímicamente. Hojas de brotes transgénicos de *Citrus aurantifolia* con un bajo (A) e intermedios (B) niveles de expresión. Hojas de *Citrus macrophylla* con altos niveles de expresión del gen reportero (C).

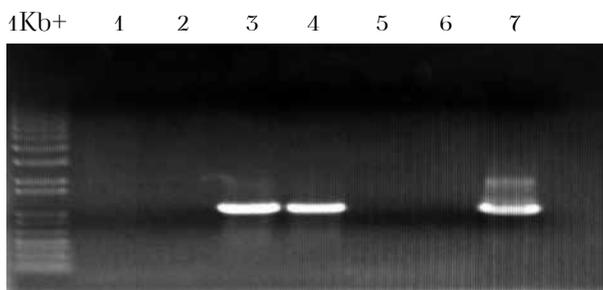


Figura 2. Amplificación del péptido antimicrobiana *AttA*. Carriles 1-4 ADN genómico de cuatro clones; 5 no ADN, 6 ADN de planta no transformada (control negativo); 7 ADN del plásmido con el gen *AttA* (control positivo).

Conclusiones

Con el presente trabajo se demuestra que *Agrobacterium tumefaciens* puede usarse para introducir de manera exitosa el gen reportero *gusA* y los péptidos antimicrobianos en explantes de dos especies de cítricos de alta importancia económica en el estado de Colima.

Aunque se analizó y demostró la presencia del gen reportero en los brotes mediante la prueba histoquímica y la técnica PCR, es necesario corroborar la presencia del gen antimicrobiano *AttA* mediante Southern blot, lo cual producirá resultados detallados sobre este trabajo.

Agradecimientos

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (Promep) por haber financiado el proyecto 103.5/12/8242.

Referencias

- Albrecht, U., McCollum, G., Bowman, K. (2012). Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck trees. *Scientia Horticulturae*, 138:2010-2020.
- Bové, J. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(4):7-37.
- Christie, P.J. (2009). *Agrobacterium and plant cell transformation* (3rd ed.). Houston: Oxford Academic Press.
- Engstrom, P., Carlsson, A., Engstrom, A., Tao, Z., Bennich, H. (1984). The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO Journal*. 3(13):3347-3351.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1):151-158.
- Gottwald, T. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48:199-139.

- Kang, D., Lundstrom, A., Steiner, H. (1996). Trichopilusa ni attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. *Gene*, 174(2):245-449.
- Luth, D., Moore G. (1999). Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 57:219-222.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Otten, L., Burr, T., Szegedi, E. (2008). *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium (pp. 4-46). In *Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. New York: Springer.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez J., Navarro, A., Pina, J., Durán-Vila, N., Navarro, L. (1995). *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14(10):646-649.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2004). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.



Calidad fisiológica en líneas endogámicas de maíz para el Bajío

María Isabel Presa-Figueroa | Enrique Andrio-Enríquez | J. Guadalupe Rivera-Reyes
| Mariano Mendoza-Elos | Francisco Cervantes-Ortiz

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ROQUE

correo-e: ipresa94@gmail.com

Resumen

La calidad fisiológica implica la integridad de las estructuras y los procesos fisiológicos que permiten a la semilla mantener altos índices de viabilidad. Los principales indicadores de la calidad fisiológica son la germinación y el vigor, que dependen del genotipo y del cuidado de su desarrollo en la producción y el manejo postcosecha. Se evaluaron 34 líneas de maíz (*Zea mays* L.) para cuantificar la calidad fisiológica de la semilla. El estudio se realizó en el Instituto Tecnológico de Roque (ITR). Se evaluaron las siguientes variables: prueba de germinación estándar, vigor a través de envejecimiento acelerado, longitud de plúmula, peso seco de plúmula y peso seco de raíz. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre los genotipos para el porcentaje de germinación estándar, el vigor a través de la prueba de envejecimiento acelerado y la longitud de la plúmula. Sin embargo, no hubo efecto significativo para el peso seco de raíz y de plúmula. Existe una fuerte variación genética entre los genotipos evaluados para la calidad de la semilla.

Palabras clave: líneas endogámicas, calidad fisiológica, vigor de semilla.

Introducción

El desarrollo de líneas y la identificación de las mejores combinaciones híbridas con base en el potencial de rendimiento determinan el éxito de un programa de mejoramiento genético. En un programa de producción de semillas, es importante determinar los componentes de la calidad fisiológica en términos de viabilidad y vigor, los cuales pueden contribuir a predecir el establecimiento y la producción de híbridos sobresalientes con altos índices de calidad, así como un manejo adecuado del cultivo. Se entiende como calidad de la semilla la sumatoria de los atributos genéticos, fisiológicos, físicos y sanitarios, responsables de la capacidad y los niveles de productividad (Popinigis, 1985).

La calidad de la semilla de maíz es vital para los agricultores y la industria semillera. Para el agricultor, porque de ello depende el número de plantas existentes en un área determinada de cultivo, es decir, se prefiere aquellas que poseen alto vigor (Delouche & Cadwell, 1962). Asimismo la selección de materiales con buena calidad, la expresión fenotípica de la semilla y su vigor, pueden estar íntimamente relacionados y ser un criterio de selección relevante dentro de un programa de mejoramiento genético (Estrada *et al.*, 1999). La presente investigación tiene el propósito de evaluar la calidad fisiológica y el vigor de la semilla de maíz.

Metodología

El estudio se desarrolló en 2014 en el Programa en Producción de Semillas del Instituto Tecnológico de Roque (ITR), en Celaya, Guanajuato. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de semillas, en el cual se efectuaron las pruebas de germinación estándar (GE), envejecimiento acelerado (EA), longitud de plúmula (LP), peso de raíz (PR) y peso de plúmula (PP).

Se utilizaron 30 líneas procedentes del Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIM-

MYT) y cuatro líneas del programa de mejoramiento del ITR. La calidad fisiológica de la semilla se evaluó mediante la prueba de GE y el EA. Se preparó una muestra de 75 semillas por genotipo para establecer tres repeticiones de 25 semillas cada una. En las pruebas de GE se utilizó el método «entre papel» siguiendo las normas establecidas por la International Seed Testing Association (2005). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con tres repeticiones. Los caracteres evaluados en las dos pruebas fueron plántulas normales (PN) y plántulas anormales (PA).

En la prueba de vigor medido a través del EA se aplicó la metodología propuesta por Delouche & Baskin (1973), con el acondicionamiento utilizado por Rincón y Molina (1990), que consiste en usar vasos de precipitados de 500 mL a los que se agregan 200 mL de agua destilada. Se colocó una malla de alambre a 1.5 cm arriba de su nivel, encima de la cual se distribuyeron 25 semillas. Los vasos se taparon con papel aluminio, se sellaron con cinta adhesiva y se introdujeron a una cámara germinadora a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa del 100% durante 120 h. Posteriormente, fue evaluado con la prueba de GE a los siete días.

La prueba de LP se realizó dibujando una línea en la parte central de la toalla; a partir de ella se dibujaron líneas paralelas a intervalos de 2 cm a la línea central, en la línea central se pegó la cinta adhesiva y se colocaron 25 semillas equidistantes adheridas a la cinta con el embrión de frente y la plúmula en un ángulo recto con las líneas paralelas. Se colocaron en la cámara germinadora a $20^\circ\text{C} + 1$ durante 96 hrs. La evaluación de las líneas se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$L = \frac{(nx1 + nx3 + \dots + nx11)}{\text{\#de plántulas normales}}$$

donde L es la longitud media de la plúmula en cm, n es el número de extremidades de la plúmula entre un par de líneas, x es la distancia del punto medio

de las líneas a la línea central. Luego de efectuar la prueba de LP se tomaron los pesos de raíz y plúmula; 10 plántulas al azar fueron colocadas en sobres de papel y se cortaron raíces y plúmulas por separado, más tarde se introdujeron a la estufa a 100 °C durante 96 hr.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para las líneas, utilizando el programa SAS ver. 9.4.

Resultados y discusión

Los resultados del análisis de varianza (cuadro 1) mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre genotipos para la GE, el vigor a través de la prueba de EA y la LP. Sin embargo, el peso seco de raíz y plúmula no se modificó estadísticamente. Estos resultados concuerdan con los de Estrada *et al.* (1999) en el sentido de que las variables más importantes para identificar los materiales por vigor inicial son las plántulas normales, peso seco de parte aérea, de raíz y germinación al primer conteo. Perry (1984) indicó que el porcentaje de germinación al primer conteo es relevante para evaluar el vigor de plántulas, lo cual representa similitud con los resultados de este estudio.

Cuadro 1

Cuadros medios para caracteres de calidad de semilla en líneas de maíz. Roque, Celaya, Guanajuato, 2014

	<i>FV</i>	<i>G.L</i>	<i>GE</i>	<i>EA</i>	<i>LP</i>	<i>PSR</i>	<i>PSP</i>
Gen	35	183.9**	4174.6**	2.27**	0.0048ns	15093.1ns	
Error	68	61.7	352.9	0.40	0.0036	45096.3	
Total	101	---	----	-----	----	-----	

GE, EA, LP, PSR y PSP, corresponden a la germinación estándar, vigor a través de la prueba de envejecimiento acelerado, longitud de plúmula, peso seco de raíz y peso seco de plúmula, respectivamente.

Por otro lado, la prueba de comparación de medias de Tukey (cuadro 2) indicó que los genotipos 9, 25 y 22 expresaron los porcentajes más altos de plántulas normales en la prueba de germinación estándar. Por otro lado, las líneas 2, 13 y 16 presentaron el peor comportamiento. En el vigor de la semilla se encontró que los genotipos 1, 22 y 30 presentaron la mayor resistencia al deterioro acelerado al ostentar valores superiores a 94% de plántulas normales; mientras que los genotipos 5, 9 y 6 presentaron un pobre comportamiento cuando se sometieron al envejecimiento acelerado.



Figura 1. Calidad fisiológica en las líneas de maíz. Roque, Celaya, Guanajuato, 2014.

Finalmente, en la prueba de longitud de plúmula, las líneas 8, 34 y 25 alcanzaron en promedio 4 cm de altura a los cuatro días de evaluación y los genotipos 23, 28 y 9 no rebasaron el 1.5 cm de altura, condición que los coloca como líneas de bajo comportamiento.

Cuadro 2

Comparación de medias para calidad de semilla en líneas de maíz. Roque, Celaya, Guanajuato, 2014

<i>genot</i>	<i>GE</i>	<i>genot</i>	<i>EA</i>	<i>genot</i>	<i>LP</i>
19	98a	1	96a	8	4.4a
25	97a	22	94a	34	4.2a
32	96a	30	94a	25	4.1a
2	74b	5	37b	23	1.5b
13	74b	9	33b	28	1.2c
16	62c	6	9c	9	1.2c

Conclusiones

Existe una fuerte variabilidad genética entre los genotipos evaluados para calidad de semilla. Las líneas 1, 22 y 30 fueron consistentes con el más alto vigor de la semilla después de ser sometido a la prueba de EA. Cabe destacar que se determinaron diferencias entre las pruebas utilizadas para la mayoría de las variables evaluadas.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por su apoyo, al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo por los materiales adquiridos (CIMMYT) y al Instituto Tecnológico de Roque (ITR) por las facilidades otorgadas.

Referencias

- Delouche, J.C., Baskin, C.C. (1973). Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, 1:427-452.
- Delouche, J.C., Cadwell, W.P. (1962). Seed vigour and vigour test. *Proc. Association of Official Seed Analysts*, 50:124-129.
- Estrada G., J.A, Hernández L., A., Hernández O., F., Carballo C., A., González C., F. (1999). Tipos de endospermo en maíz y su relación con la calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 22(1):99-109.
- Moreno, M.E., Vázquez, M.E., Rivera, A., Navarrete, R., Esquivel, F. (1988). Effect of seed shape and size on germination of corn (*Zea mays L.*) stored under adverse conditions. *Seed Science and Technology*, 26(2):439-448.
- Perry, D.A. (1972). Seed vigour and field establishment. *Horticultural Science Abstracts*, 42:334-342.
- Popinigis, F. (1985). *Fisiologia da Semente* (2nd ed.). Brasilia: Ministério da Agricultura.

Evaluación del efecto del daño mecánico sobre la eficacia de transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Salvador Guzmán-González | Aided Evelina Montes-Peniche
| Marco Tulio Buenrostro-Nava | Pedro Valadez-Ramírez

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias | UNIVERSIDAD DE COLIMA

Julio Vega-Arreguín

Escuela Nacional de Estudios Superiores | UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Unidad León, Guanajuato

correo-e: sguzman@ucol.mx

Resumen

La producción de papaya en el estado de Colima es afectada por enfermedades causadas por agentes virales, principalmente *Papaya ringspot poty virus-P*, por lo que el uso de *Agrobacterium tumefaciens* es viable para inducir resistencia a los virus. La eficiencia de transformación depende de la presencia de compuestos fenólicos provocados por daño mecánico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes métodos de inducción de daño mecánico sobre la eficacia de transformación genética de embriones de *Carica papaya* L., mediante *A. tumefaciens*. El daño mecánico en un gramo de embriones somáticos de *Carica papaya* L. fue inducido mediante el uso de carborúndum (0.5 g en 15 mL de H₂O estéril), biobalística (un disparo a 0 cm de distancia con una presión de 150 psi) o sonicación (15 s a 40 kHz) en la presencia de *A. tumefaciens*. Los resultados mostraron que el contenido total de compuestos fenólicos fue mayor al utilizar el método desonificación. De acuerdo con la presencia de focos azules en los embriones somáticos transformados, se observó que la mayor eficiencia de transformación se encontró con el método de carborundum, con una cantidad de 22.5 focos azules por gramo. Asimismo, se observó que los diversos métodos de inducción de daño mecánico afectan la eficacia de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L.

Palabras clave: compuestos fenólicos, *A. tumefaciens*, genes *vir*.

Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los cultivos más rentables para México, motivo por el cual su establecimiento va en aumento en los últimos años; sin embargo, es afectada por enfermedades provenientes de agentes virales, principalmente *Papaya ringspot poty virus*-P (PRSV-P) (Gonsalves, 1998), de tal forma que se reportan pérdidas en la producción de hasta el 85% en Colima, Veracruz y Guerrero cuando no existe un método de control. El PRSV-P causa mosaico severo y distorsión de las hojas, anillos concéntricos en los frutos y manchas aceitosas en la parte superior de los tallos y pecíolos. Además, el mismo virus impide el crecimiento de la planta y reduce drásticamente el tamaño y la calidad de las frutas (Yeh *et al.*, 2007).

En ese sentido, la mejor alternativa de control de PRSV-P en papaya es el uso de la ingeniería genética. La transformación genética de explantes de papaya mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es una herramienta eficiente (Fitch *et al.*, 2003). Sin embargo, para que este proceso de transferencia tenga lugar es necesario que la célula vegetal posea una herida que inicie así la síntesis de compuestos fenólicos (Trick y Finer, 1997), los cuales activan los genes de virulencia (*vir*).

Una de las estrategias para mejorar la eficiencia de transformación es la inducción de compuestos fenólicos en el explante, los cuales se producen al ocasionar un daño mecánico del mismo, causado comúnmente por agitación en presencia de carborúndum, por biobalística o por sonicación (Trick y Finer, 1997). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes métodos de inducción de daño mecánico sobre la eficiencia de transformación genética de embriones de *Carica papaya*.

Metodología

Se emplearon masas de embriones somáticos de papaya Maradol de tres meses de edad, inducidos a

partir del cultivo de embriones cigóticos en medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), los cuales se sometieron a daño mecánico, con un gramo de embriones para cada tratamiento. Se evaluaron métodos de agitación con carborúndum (Cheng *et al.*, 1996), bombardeo con micropartículas (Helios™ GeneGun, BioRad) y sonicación (Jiang *et al.*, 2004). Embriones somáticos intactos se emplearon como control de referencia. Se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos, tales moléculas se extrajeron y cuantificaron siguiendo el protocolo descrito por Ainsworth y Gillespie (2007).

Para la cuantificación del contenido total de fenoles se calculó una curva estándar elaborada con ácido gálico (Sigma) a concentraciones de 0, 100, 200, 400, 800 y 1600 μ M de ácido gálico preparado en metanol al 95% (v/v), donde cada punto de calibración se realizó por triplicado. El contenido se expresó como equivalente de ácido gálico medido con la ecuación de regresión entre los puntos de calibración del compuesto fenólico y su absorbancia a 765 nm.

Transformación genética con *A. tumefaciens*

Con la ayuda de un asa bacteriológica, se tomó una muestra de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 recombinante (con el vector binario pCAMBIA1301) que se inoculó en 50 mL de medio YM líquido estéril con antibióticos de selección. Los embriones somáticos se incubaron en la suspensión de *A. tumefaciens* activada durante 10 min y se colocaron en medio de cocultivo MS (Dandekar & Fisk, 2005) y se procedió a realizar el ensayo histoquímico.

Ensayo histoquímico de GUS

Cinco días después del cocultivo se llevó a cabo la detección histoquímica de la actividad transitoria de la β -glucuronidasa, para esto se empleó el estuche comercial « β -glucuronidase reporter gene staining» (Sigma), siguiendo las recomendaciones del

fabricante. Se empleó un diseño estadístico completamente al azar con cuatro tratamientos: *T1*) agitación con carborundum, *T2*) biobalística, *T3*) sonicación y *T4*) sin daño mecánico o control; con cuatro repeticiones para cada uno. Se evaluó el contenido de compuestos fenólicos producidos en cada uno de los tratamientos y la cantidad de focos azules registrada en el material vegetal. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad usando el paquete estadístico SAS, versión 9 (2002).

Resultados y discusión

Los resultados muestran que el daño mecánico por sonicación induce una mayor cantidad de compuestos fenólicos (cuadro 1), lo que podría estar relacionado al hecho que este proceso genera una considerable cantidad de fisuras y canales uniformes en el tejido expuesto a la bacteria (Trick y Finer, 1997) comparado con los otros tratamientos donde probablemente esto no se logre. No obstante, la funcionalidad de los cuatro tratamientos en la transformación de los embriones somáticos de papaya por *A. tumefaciens* ya ha sido demostrada con anterioridad (Fitch *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2004).

Cuadro 1

Efecto del método de inducción de daño mecánico en embriones somáticos de papaya en la producción de compuestos fenólicos

Tipo de daño mecánico	Contenido total de compuestos fenólicos (equivalentes de ácido gálico)*
Sonicación	659.17 a
Sin daño (testigo)	494.67 b
Carborundum	437.5 b
Biobalística	390.0 b

*Medias de Tukey con letra distinta dentro de la columna son estadísticamente diferentes ($n = 3$, $P \leq 0.05$).

Según las diversas investigaciones, los compuestos fenólicos y otros como carbohidratos son importantes para que ocurra la «activación» de los genes *vir* de *A. tumefaciens* y en consecuencia exista la movilización del T-DNA específico hacia la célula blanco (Stachel *et al.*, 1985), hecho que se corroboró en este estudio con la expresión transitoria del gen *gus* (figura 1).

El que haya existido transformación genética (evaluada por la presencia de focos azules) en los embriones somáticos de papaya que no recibieron algún daño mecánico, obedece a que los compuestos fenólicos son parte del metabolismo de este material vegetal en el proceso de la embriogénesis somática (Kouakou *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2008; Alemanno *et al.*, 2003; Hosseini *et al.*, 2011).

En este estudio no se observó una relación entre la cantidad de compuestos fenólicos y la eficiencia de transformación (cantidad de focos azules). Sin embargo, fue necesario que existiera algún daño mecánico en la célula para que la eficiencia de transformación se incrementara (cuadro 2). Resultados similares fueron reportados por de la Riva *et al.* (1998), quienes indican que la detección de compuestos fenólicos y monosacáridos por la maquinaria genética de *Agrobacterium* responde a bajos niveles de compuestos fenólicos. Esta sensibilidad denota la existencia de un límite o umbral en la cantidad de esos compuestos para evitar una toxicidad hacia la bacteria que pudiera afectar la eficiencia de transformación, tal como se ha demostrado (Plyuta *et al.*, 2013).

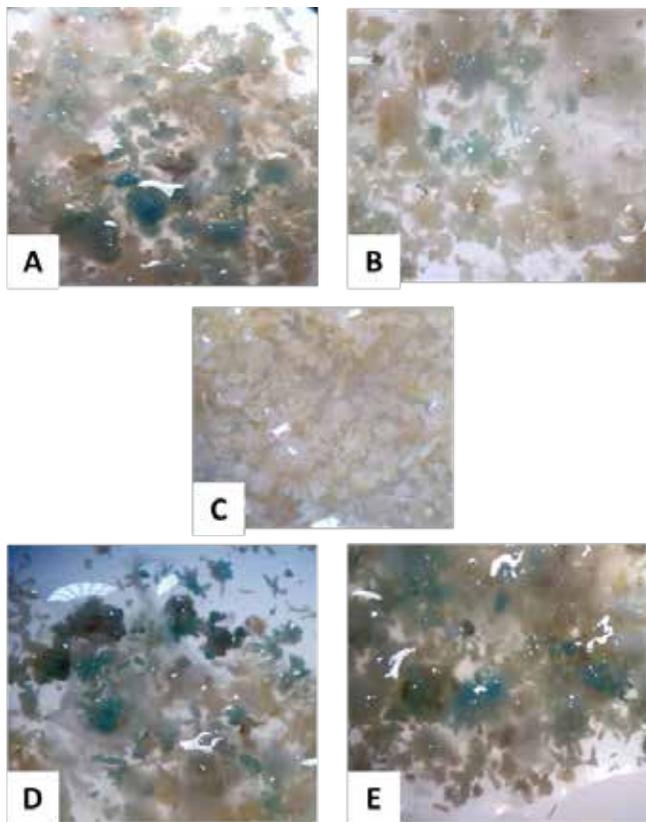


Figura 1. Expresión del gen reportero GUS en embriones somáticos de papaya sometidos a la inducción de daño mecánico usando: A) carborúndum, B) sin daño mecánico, C) sin daño y sin *A. tumefaciens* (doble control), D) biobalística, E) sonicación.

Cuadro 2

Cantidad de focos azules de acuerdo con el tipo de daño mecánico en embriones somáticos de papaya

Tratamiento	Cantidad de focos azules*
Sin tratamiento (testigo)	7.5 c
Sonicación	16.0 b
Carborúndum	22.5 a
Biobalística	17.5 ab

*Medias de Tukey con letra distinta dentro de columna son estadísticamente diferentes ($n = 3$, $Pr \leq 0.05$)

Conclusiones

Los diversos métodos de inducción de daño mecánico afectan la eficacia de transformación genética de embriones somáticos de *Carica papaya* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens*. También se observó una correlación entre la cantidad de contenidos fenólicos y la eficiencia de transformación; se observó la transformación más alta (22.5 focos azules·g⁻¹ de embriones) en el tratamiento donde se indujo una concentración intermedia de fenoles (437.5 equivalentes de ácido gálico).

Agradecimientos

Al Fondo Sectorial SAGARPA-Conacyt 2011-C04 por el financiamiento del proyecto 163213.

Referencias

- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4):875-877.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., Ferriere, N. (2003). Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 92(4):613-623.
- Cheng, Y.H., Yang, J.S., Yeh, S.D. (1996). Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. *Plant Cell Reports*, 16:127-132.
- Dandekar, A., Fisk, H.J. (2005). Plant transformation. *Agrobacterium-mediated gene transfer. Methods in Molecular Biology*, 286: 35-46.
- Fitch, M.M.M., Manshardt, R.M., Gonsalves, D., Slightom, J.L. (1993). Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 12:245-249.

- Gonsalves, D. (1998). Control of *Papaya ringspot virus* en papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology*, 36:415-437.
- Hosseini, S.S., Mashayekhi, K., Alizadeh, M., Ebrahimi, P. (2014). Effect of salicylic acid on somatic embryogenesis and chlorogenic acid levels of carrot (*Daucus carota* cv. Nantes) explants. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 1:405-413.
- Jiang, L., Maoka, T., Komori, S., Fukamachi, H., Kato, H., Ogawa, K. (2004). An efficient method for sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of coat protein (CP) coding genes into papaya (*Carica papaya* L.). *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 37(3):489-498.
- Kouakou, T.H., Waffo-Téguo, P., Kouadio, Y.T., Valls, J., Richard, T., Decendit, A., Mérillon, J.M. (2007). Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(4):25-29.
- Plyuta, V., Zaitseva, J., Lobakova, E., Zagoskina, N., Kuznetsov, A., Khenel, I. (2013). Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 121(11):1073-1084.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Reis, R., Batista, M.T., Canhoto, J.M. (2008). Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma*, 232(3):193-202.
- De la Riva, G.A., Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsonov, D.L., Selman-Housein, G.A. (1998). Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant*, 206(1):20-27.
- SAS Institute Inc. (2002). SAS/STAT Version 8. User's Guide. Cary, NC: Autor.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047):624-629.
- Trick, H.N., Finer J.J. (1997). Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6(5):329-336.
- Yeh, S.D., Bau, H.J., Kung, Y.J., Yu, T.A. (2007). Papaya (pp. 73-96). En Pua, E.C., Davey, M.R. (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Heidelberg: Springer-Verlag.

Uso de bioinsecticidas para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el cultivo de maíz

Rosa Bertha Rubio-Graciano | Jesús García-Pereyra | Gabriel Aviña-Martínez
Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana

corre-e: jpereyra5@hotmail.com

Resumen

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) es una plaga que se presenta durante los meses de abril y mayo en el cultivo del maíz en el estado de Durango, su presencia puede reducir el rendimiento de grano en un 13 hasta 60% por hectárea. Los productores emplean dosis altas de insecticidas inorgánicos formulados a base de Piretrinas en aplicaciones en campo de dos litros por hectárea, situación que genera un daño al ecosistema y una contaminación del grano por la residualidad del producto. Con el objeto de encontrar una solución sustentable para minimizar la presencia de esta plaga en el cultivo del maíz, se transfirió tecnología a productores de dos localidades en nueve comunidades del municipio de Durango, se contó con la participación de 60 productores de maíz en una superficie de aplicación de 350 hectáreas durante los ciclos de primavera-verano 2011. Se empleó en campo mediante asperjado un bioinsecticida comercial METATRON®, formulado con *Metarhizium anisopliae* en una concentración de 1×10^{12} esporas/ml a una dosis de 480 g ha^{-1} , adicionando un surfactante elaborado con extractos de *Agave lecheguilla torrey* a una dosis de un litro por hectárea. Los resultados de campo indican que *Metarhizium* cuando es aplicado en las primeras etapa del desarrollo del cultivo del maíz y el gusano cogollero se encuentra en el primer y segundo estadio de crecimiento, la mortandad es del 90%. Adicionalmente, en una cámara bioclimática CB-14® con condiciones de temperatura constante, 25 °C, humedad relativa de 80% y un fotoperiodo de 13 h, se realizaron bioensayos bajo diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones para probar tres diferentes dosis de *Metarhizium anisopliae* cepa nativa extraída de gusano cogollero del segundo instar de crecimiento en el equivalente de 480, 240 y 120 g por hectárea, los resultados de los bioensayos indican que la mortandad fue del 87% para cualquiera de las dosis aplicadas.

Palabras clave: bioinsecticida, bioensayos, transferencia de tecnología, gusano cogollero.

Introducción

Los productores de grano de maíz del estado de Durango siembran bajo sistema de riego en los meses de abril a mayo, con presencia de temperaturas altas, ambiente seco y una baja humedad relativa, situación que genera alta presencia de plagas y enfermedades. Con el objeto de eliminar los efectos dañinos de algunas plagas, principalmente de gusano cogollero y chapulín, se usan dosis altas de insecticidas inorgánicos formulados a base de Piretrinas (Lorsban 480[®], ACDPHOS[®], Proaxis[®] y BH110[®]) en dosis de dos litros por hectárea en dos aplicaciones.

Si las condiciones ambientales no son propicias para el correcto desarrollo del cultivo del maíz (ausencia de lluvias en la etapa de crecimiento vegetal, una altura menor de la planta de 50 cm en esta etapa), la plaga persistirá y será difícil eliminarla aun y cuando se consideren más aplicaciones de insecticidas. Es posible que estas plagas puedan ser minimizadas utilizando insecticidas biológicos a base de *Trichogramas*, *Crisophas*, bacterias y hongos entomopatógenos, estos últimos de los géneros *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Díaz *et al.*, 2006).

La biología del crecimiento del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) consiste en que las hembras depositan sus huevecillos en una cantidad de 300 a 600 en el follaje de la planta de maíz, el tiempo de desarrollo de huevo a larva es de 5 días. Posteriormente, las larvas pasan por seis instares en un tiempo de 14 a 21 días, después pasan de estado pupario a adulto (palomilla) en 13 días, éstos son activos sexualmente por 5 días, donde depositan sus huevecillos y el ciclo se repite (Tamez *et al.*, 2001).

Artificialmente, en una cámara climática, se pueden realizar bioensayos para determinar hábitos de crecimiento, desarrollos biológicos, formas de alimentación de cría y exterminio. En el caso del gusano cogollero, para asegurar su proliferación en los contenedores, en la cámara de crecimiento, las condiciones de temperatura se deben de mantener a 25 °C, una humedad relativa del 80%, una canti-

dad de luz de 13 h, la alimentación para las plagas consiste en follaje de maíz fresco y en su etapa adulta a base de azúcar al 10% en algodones humedecidos (Ramos, 2014).

En diversos estudios de laboratorio se ha trabajado con *Metarhizium* y *Paecilomyces*, dos tipos de insecticidas biológicos empleados para el control de gusano cogollero, plaga de interés económico para los productores de maíz en el estado de Durango y responsable de la pérdida de rendimiento de grano de un 13 a 60%.

Con el objeto de controlar esta plaga a partir del año 2007 a petición de un grupo de productores de maíz del estado de Durango, solicitó a la Fundación Produce de Durango buscar alternativas más sustentables para el combate de esta plaga. Como primer etapa del proyecto, realizamos un muestreo en campo de gusano cogollero en el año 2009; aislamos la cepa de *Metarhizium anisopliae* del primer instar del gusano cogollero; diseñamos una cámara de crecimiento y cría de insectos con control de temperatura, humedad y fotoperiodo para simular las condiciones ambientales de crecimiento de la plaga. Se trasladaron los resultados de laboratorio a campo con 60 productores cooperantes en dos localidades de nueve comunidades del estado de Durango, durante el ciclo de primavera-verano 2011.

Metodología

Se aisló la cepa de *Metarhizium anisopliae* del insecto hospedero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) mediante la técnica de batido y se sembró en un medio de cultivo de agar dextrosa papa, en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, la cepa se guardó en tubo de ensaye con agar inclinado; para su conservación se efectuaron resiembras cada tres meses. Se adquirió una cepa comercial de *Metarhizium anisopliae* denominada METATRON[®], con la finalidad de comparar la eficiencia en cuanto a mortandad de gusano cogollero en condiciones controladas.

Para los bioensayos se efectuaron bajo diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones, mediante el software de Olivares (1994), (en una cámara de insectos y crecimiento vegetal) se probaron 3 tratamientos: T1: 120 g ha⁻¹, T2: 240 g ha⁻¹, T3: 480 g ha⁻¹ y un testigo (sólo con follaje), en cada unidad experimental se colocaron 15 gusanos por contenedor (15 contenedores en total), en la cámara la temperatura fue constante de 25 °C, una humedad relativa de 80% y un fotoperiodo de 13 h de luz, la variable de respuesta fue el porcentaje de mortandad de gusanos.

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza y comparación de medias solo cuando se detectó diferencia mínima significativa a una $p \leq 0.05$. En las parcelas de los agricultores sólo se probó la cepa comercial METATRON®. Se trabajó con 60 productores de maíz cooperantes de los módulos de riego III Valle del Guadiana (Localidad 1: comunidades Benito Juárez, 5 de Febrero, El arenal, Montes de Oca y Gavilanes) y IV de la presa Peña del Águila (Localidad 2: comunidades Abraham González, Labor de Guadalupe, San José del Molino y Colonia Hidalgo) que prestaron sus parcelas para la aplicación del bioinsecticida en campo.

En las parcelas se evaluó la eficiencia en cuanto a mortandad de gusano cogollero con el uso del bioinsecticida comercial METATRON®. En otro estudio de caracterización molecular de seis diferentes cepas de *Metarhizium anisopliae*, en el cual se comparan su relación filogenética, incluyendo a la cepa aislada del gusano cogollero y la comercial METATRON®, se encontró que ambas presentan un índice de similitud y amplitud de bandas parecida, por lo que se decidió con base en economía, emplear la cepa comercial para su uso en campo (García *et al.*, 2014) y a la aplicación de insecticidas inorgánicos que el productor emplea de manera tradicional.

Resultados y discusión

Bioensayos

Los resultados del análisis de varianza del diseño experimental de bloques al azar (cuadro 1) indican que existió significancia estadística para los tratamientos, mas no así para las repeticiones a una $p \leq 0.05$, los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas, por lo que se procedió a determinar la diferencia mínima significativa (DMS).

Cuadro 1

ANAVA de los experimentos en la cámara bioclimática CB-44® con *Spodoptera frugiperda*

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	0	0	0.00	0.05
Bloques	14	1.86	0.130	2.16	
Error	42	1.86	0.060		
Total	59	5.20			

Los resultados obtenidos en cada unidad experimental se aprecian en el cuadro 2.

Cuadro 2

Mortandad de *Spodoptera frugiperda* en cámara de crecimiento controlado

R	T1: 120 g ha ⁻¹	R	T2: 240 g ha ⁻¹	R	T3: 480 g ha ⁻¹
1	M	1	M	1	M
2	M	2	M	2	M
3	M	3	M	3	M
4	M	4	M	4	M
5	M	5	M	5	M
6	M	6	M	6	V
7	V	7	V	7	M
8	M	8	M	8	M
9	M	9	M	9	M
10	M	10	M	10	M
11	M	11	M	11	M

R	T1: 120 g ha ⁻¹	R	T2: 240 g ha ⁻¹	R	T3: 480 g ha ⁻¹
12	M	12	M	12	M
13	V	13	M	13	M
14	M	14	V	14	V
15	M	15	M	15	M

M: Muerto V: Vivo

Los resultados indican que en cualquier concentración aplicada de bioinsecticida, el porcentaje de mortandad fue del 87%. En el caso de los resultados del testigo, no se obtuvo respuesta en cuanto a mortandad.

Resultados en campo

La eficiencia de eliminación del gusano fue variable en las comunidades de estudio, pero superior al 90%, principalmente cuando el gusano cogollero se encuentra en el primer y segundo estadios de crecimiento, lo cual se aprecia en las figuras 1 y 2.

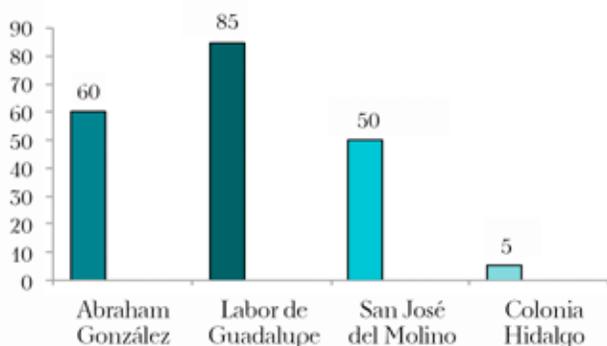


Figura 4. Porcentaje de eliminación de gusano cogollero mediante la utilización de hongos entomopatógenos con productores de maíz en el módulo de riego IV, Presa Peña del Águila.

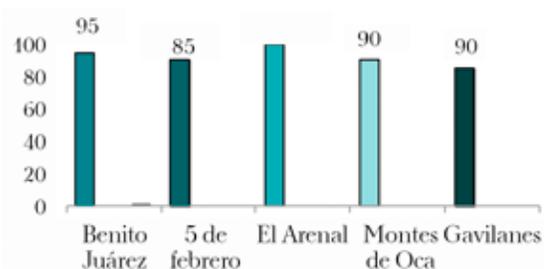


Figura 2. Porcentaje de eliminación de gusano cogollero mediante la utilización de hongos entomopatógenos con productores de maíz en el módulo de riego III, Presa Guadalupe Victoria.

El CESAVEG (2013) reporta mortandad del 80% del gusano cogollero con la aplicación de *Metarhizium anisopliae* en campo, cuando este es aplicado en los primeros 60 días después de la siembra. Negrete y Morales (2003) reportan que los métodos de control biológico presentan mayor eficacia en cuanto a mortandad en gusano cogollero, cuando se aplican en la presencia del gusano cogollero en maíz en el primer y segundo instar de desarrollo. De igual forma, reportan en campo mortandad del gusano cogollero cuando el bioinsecticida se aplica en el primer y segundo instar de desarrollo.

Conclusiones

En las parcelas de maíz, los productores aplicaron el bioinsecticida en la primera etapa de crecimiento del cultivo y cuando la presencia del gusano cogollero aún se encuentra en forma de adulto o en el primer o segundo instar, lo que permite que el insecticida biológico penetre de manera más efectiva en el macho y hembra, deteniendo su actividad reproductiva.

Agradecimientos

A la Fundación Produce Durango, a los productores de las localidades de los distritos de riego III y IV Presas Guadalupe Victoria y Peña del Águila, por los apoyos económicos prestados para la realización del presente trabajo.

Referencias

- Comité Estatal De Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG) (2013). *Manual de plagas y enfermedades en maíz*. Recuperado de <http://www.cesaveg.org.mx/2012/>
- García P., J., Aviña, G.N., Orozco F., A. A., Alvarado Gómez, O.G., García, M., Alejandre I., G., Medrano R., H. (2014). Variabilidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en base a polimorfismos de ADN amplificados al azar. *Phyton*, 83(1):37-43.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., De la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12):856-860.
- Márquez G., J. (2010). Control químico y biológico de gusano cogollero, en maíz en los municipios de Durango, Guadalupe Victoria y Poanas. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana de Durango.
- Negrete B., F., Morales A., J. (2003). El gusano cogollero del maíz. Cartilla Ilustrada No. 3. Cereté, Córdoba, Colombia: Corpoica Eco región Caribe Centro de Investigación Turipaná.
- Olivares, S., E. (1994). Paquete de diseños experimentales FAUANL (Versión 2.5). Nuevo León, México: Facultad de Agronomía, UANL.
- Ramos G., F. (2014). *Manejo agroecológico del gusano cogollero en el maíz*. Recuperado de www.hortalizas.com
- Tamez G., P., Galán W., L., Medrano R., H., García G., C., Rodríguez P., C., Gómez F., R. (2004). Bioinsecticidas: Su empleo, Producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 6(2): 143-152.



Fermentación líquida como herramienta biotecnológica para la obtención de quitinasas con *Beauveria bassiana*

Sandra E. Jiménez-Alejandro | Óscar Núñez-Gaona | Laura P. Ramírez-Coutiño

| UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN campus Tuxtepec

correo-e: sandy_edit@hotmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo fue realizar fermentaciones en medio líquido (FML), empleando un hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y sustratos quitinosos de camarón (C), chapulín (CH) y tenebrio (T) para la producción de quitinasas, se evaluaron los cambios de pH, se determinó la cantidad de proteína en el sobrenadante, actividades quitinolíticas endoquitinasas y exoquitinasas usando una curva patrón de N-acetilglucosamina (NAG) y biomasa por peso seco. Se indicó que a las 48 h presentaron la mayor actividad volumétrica de 4370.6 mu/mL a un pH óptimo de 3, para el caso de las endoquitinasas y para las exoquitinasas (nhasa) de 11.7 mu/mL utilizando chapulín como sustrato siendo el mejor productor de quitinasas en comparación con los otros sustratos, donde se observa que este hongo produce más enzimas en un medio ácido produciendo más endoquitinasas que exoquitinasas. Para fines de biocontrol, las quitinasas son un método atractivo para una agricultura sustentable.

Palabras clave: biocontrol, sustratos quitinosos, enzimas.

Introducción

Las fermentaciones líquidas han sido de gran importancia a nivel industrial pero también en el área de la agricultura para la obtención de sus productos y utilización de ellos, uno de los productos obtenidos al implementar la fermentación líquida son las quitinasas, al utilizar quitina como inductor, al ser este polímero el segundo más abundante de la naturaleza, se puede obtener de diversas fuentes ya sea de crustáceos, cutícula de insecto entre otros.

Se considera así a la quitina como la molécula blanco a ser atacada por agentes fungicidas o insecticidas que contienen o producen quitinasas. Estas quitinasas han sido de importancia en diversos campos de la investigación: biomedicina, biorremediación y biocontrol (Cruz y Rojas, 1999). Este último es de gran interés en la agricultura ya que existen reportes de las quitinasas de *Beauveria bassiana* que atacan a *Galleria mellonella* y las del hongo *Nomuraea riley* hacia larvas de *Trichoplusia ni* que ataca a la lechuga, la papa y el algodón, entre otros cultivos (Cruz y Rojas, 1999) fundamentales para la agricultura mexicana. Nuestro país no sólo produce sus alimentos básicos, sino que también los exporta (SAGARPA, 2011), donde la agricultura se ve afectada por diversos factores, ambientales, de manejo y de mayor importancia los abióticos, ya que es donde se encuentran las plagas y donde las quitinasas juegan un papel trascendental para la sustentabilidad de la agricultura en México.

Trabajos reportados por Felse (2000) señala una producción de quitinasas de 0.38 U/mL a pH 5 a las 108 h de producción utilizando el hongo *Trichoderma harzianum*. El objetivo de este trabajo fue realizar fermentaciones en medio líquido a pH variable 3, 4, 5, 6, 7 para la obtención de quitinasas utilizando *Beauveria bassiana*.

Metodología

El microorganismo empleado fue el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* 885.2, donado por Octavio Loera (UAM-Iztapalapa), que fue cultivado en medio papa dextrosa agar (PDA) durante ocho días a 25 °C, después de este tiempo los conidios se extrajeron empleando Tween 80 al 0.02% (p/v). La concentración del inóculo empleado en las fermentaciones fue de 1×10^7 conidios/mL.

Se utilizaron tres fuentes de sustratos quitinosos: exoesqueleto de camarón (*Penaeus*) provenientes de la embalsadera en la ciudad de Alvarado, Veracruz; chapulines (*Sphenarium purpurascens*) de la comunidad de Santo Tomas Jalieza, Ocotlán, Oaxaca; y escarabajo harinero (*Tenebrio molitor*) como insecto modelo perteneciente al insectario de la Universidad del Papaloapan.

Los sustratos previamente se desproteinizaron utilizando tetraborato de potasio al 4% (p/v). Al final de cada tratamiento los sustratos se neutralizaron con agua destilada se molieron y tamizaron para obtener un tamaño de partícula de 449 µm.

La fermentación en medio líquido (FML) se realizó en matraces, empleando medio Czapeck modificado, utilizando como fuente de carbono y nitrógeno los sustratos desproteinizados de chapulín, tenebrio y camarón (10g/L) incubados a 25 °C, a un pH inicial de 5, a una agitación de 180 rpm durante ocho días. Después se hicieron a 72 h tiempo máximo de producción de estas enzimas para variar el pH y encontrar el óptimo. El control de pH se realizó empleando soluciones estériles de NaOH y HCl (0.1M). El pH se ajustó al inicio de la fermentación a 3, 4, 5, 6, y 7 (Ramírez-Coutiño, 2009).

En la fracción líquida de las muestras obtenidas cada 24 h, se determinó proteína en el sobrenadante por el método de Bradford (1976), actividades quitinolíticas endoquitinasas y exoquitinasas (Tronsmo y Harman, 1993), azúcares reductores (Miller, 1959), empleando una curva patrón de N-acetilglucosamina (NAG) y biomasa por peso seco.

Resultados y discusión

Los resultados de las fermentaciones indican que utilizando sustratos quitinosos procedente de chapulín, a pH 5 que es el reportado y a una temperatura reportada de 25 °C, produjo la mayor cantidad de quitinasas de 1374.8 mU/mL a las 48 h, cabe mencionar que esta concentración volumétrica fue similar en los dos sustratos de insectos siendo 1.7 veces mayor en comparación con el sustrato de camarón donde la actividad volumétrica fue de 810.2 mU/mL. Cuando se varió el pH, las concentraciones volumétricas cambiaron dando la mayor cantidad de actividad volumétrica a un pH 3, siendo similar nuevamente en los sustratos de insectos de hasta 4 veces mayor en comparación con el sustrato de camarón y 3.2 veces mayor en comparación con el pH 5, de igual manera el pH 4 indica una alta concentración volumétrica no siendo mayor que el pH 3 mientras que para el pH 6 y 7 las concentraciones volumétricas son bajas (cuadro 1).

Cuadro 1

Evaluaciones de las fermentaciones en medio líquido (FML) empleando *Beauveria bassiana* a pH variable

pH	Endoquitinasas (mU/mL) 48h			Exoquitinasas (mU/mL) 48h		
	C	CH	T	C	CH	T
3	2150± 0.001	4370.6± 0.01	3378.7± 0.004	8.9± 0.003	11.7± 0.003	10.7± 0.004
4	647.5± 0.001	2626.8± 0.04	3166.2± 0.02	7.2± 0.003	9.7± 0.004	9.7± 0.06
5	810.2± 0.01	1374.8± 0.04	824± 0.01	6.1± 0.005	8.4± 0.006	8.8± 0.002
6	121.2± 0.002	227± 0.001	585.5± 0.01	0.3± 0.004	0.57± 0.02	0.5± 0.005
7	52.5± 0.5	81.2± 0.01	73.5± 0.04	0.1± 0.002	0.32± 0.006	0.2± 0.01

C= camarón, CH= chapulín, T= tenebrio.

El tiempo de mayor producción enzimática coincidió con la máxima producción de azúcares reductores, proteína soluble y biomasa (cuadro 2), lo que

indica que la producción mayor de estas enzimas es a las 48 h.

Al encontrar los parámetros óptimos de producción de las quitinasas con *Beauveria bassiana*, éstos pueden realizarse a escala para obtener más producto y utilizarlas para un biocontrol, con ello al implementar un nuevo método de control de plagas se contribuiría a la disminución de insecticidas que degradan los suelos y volviendo resistente a la plaga, mejorando con ello la producción de los cultivos teniendo una agricultura sustentable.

Cuadro 2

Evaluaciones de las fermentaciones en medio líquido (FML) empleando *Beauveria bassiana* a pH variable

pH	Biomasa (g/l) 48h			Proteína soluble (µg/mL) 48h			Azúcares reductores (mg NAG/mL) 48h		
	C	CH	T	C	CH	T	C	CH	T
3	0.005± 0.01	0.009± 0.001	0.008± 0.003	9.2± 0.01	13.5± 0.02	16.2± 0.09	0.85± 0.01	0.92± 0.001	0.92± 0.001
4	0.004± 0.001	0.007± 0.001	0.006± 0.009	7.1± 0.02	11.7± 0.07	15.6± 0.02	0.59± 0.02	0.73± 0.01	0.84± 0.001
5	0.005± 0.001	0.006± 0.01	0.006± 0.006	5.7± 0.02	4.8± 0.21	4.6± 0.005	0.24± 0.05	0.28± 0.01	0.24± 0.01
6	0.003± 0.001	0.005± 0.001	0.004± 0.009	2.2± 0.01	3.2± 0.06	5.2± 0.004	0.02± 0.01	0.22± 0.001	0.20± 0.001
7	0.004± 0.01	0.004± 0.001	0.004± 0.002	2.4± 0.001	5.1± 0.04	3.3± 0.01	0.008± 0.002	0.18± 0.01	0.17± 0.02

C=camarón, CH=chapulín, T= tenebrio.

Conclusiones

El empleo de la fermentación en medio líquido es de gran utilidad como herramienta biotecnológica para la evaluación de pH variable sobre la producción de enzimas quitinolíticas, lo que muestra que el mejor es el extracto derivado de chapulín a un pH de 3, al utilizar la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2, de modo que es un hongo acidófilo.

Agradecimientos

A la beca Conacyt, al departamento de posgrado de la universidad del Papaloapan, a los organizadores del simposio y en especial a mis asesores, doctores Laura y Óscar.

Referencias

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry Methods in the biological Sciences*, 72(1-2): 248-254.
- Cruz, C.R., Rojas, A.L.I. (1999). Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. En Prado B., L.A. (Ed.), *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Felse, A. (2000). Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors-the influence of agitator speed. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2):115-120.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.
- Ramírez-Coutiño, L.P. (2009). *Producción de quitinasas y proteasas de Verticillium fungicola y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin oligómeros* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) (2011). *Producción agrícola nacional (2006-2011)*. Recuperado de [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/Seminarios/entorno_agroeconomico/PRODUCTIVIDAD%20Y%20COMPETITIVIDAD%20DE%20GRANOS%20EN%20MEXICO%20\(Abr%202014\).pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/Seminarios/entorno_agroeconomico/PRODUCTIVIDAD%20Y%20COMPETITIVIDAD%20DE%20GRANOS%20EN%20MEXICO%20(Abr%202014).pdf)
- Tronsmo, A., Harman, G.E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry Methods in the biological Sciences*. 208:74-79.



Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán

Consuelo López-Vielma | Alejandro Solís-Sánchez | Evangelina Quiñones-Aguilar
| Joaquín Qui-Zapata | Gabriel Rincón-Enríquez

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

correo-e: grincon@ciatej.mx

Resumen

El cultivo de chile es importante en México desde los puntos de vista de diversidad biológica, económico, cultural, nutricional y como fuente generador de riqueza. Sin embargo, esto último se encuentra amenazado por diversos problemas entre los que destacan los fitosanitarios. En particular, la mancha bacteriana de chile es un problema que afecta diversas regiones importantes de México. Con el fin de iniciar un programa de control biológico de dicha enfermedad el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar el agente causal de la mancha bacteriana en tres regiones productoras de chile. Los aislamientos se realizaron sobre medio semi-selectivos (YCDA) y su caracterización fue realizada mediante crecimiento en medio xan-D, ITS y amplificación del gen *esta*. Se realizaron un total de 110 aislamientos bacterianos sobre medio YCDA. 22 de esos aislamientos crecieron sobre medio con Tween-80, lo cual sugirió que se trataba de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Mediante la caracterización de ITS, el gen *esta* y un análisis estadístico de conglomerados, se determinó que seis aislamientos pertenecen a Xcv, potencialmente implicados en la enfermedad mancha bacteriana del chile.

Palabras clave: mancha bacteriana, *Xanthomonas* sp, ITS, gen hidrólisis *esta*, Tween-80.

Introducción

La mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (Chew, 2008) afecta a cultivos de chile a lo largo de todas las regiones productoras de México. La enfermedad se manifiesta con manchas necróticas y halos cloróticos alrededor de la necrosis. Igualmente, la presencia de la bacteria ocasiona la defoliación de las plantas, lo cual implica que los frutos sean expuestos al sol y por tanto son quemados, lo que provoca enormes pérdidas económicas.

Jalisco, Michoacán y Zacatecas son algunos estados importantes en la producción de chile y que han presentado la enfermedad de mancha bacteriana. El aislamiento del agente causal en estas zonas donde se presenta la enfermedad ayudaría a estudiar la diversidad bacteriana de esas regiones para posteriormente implementar estrategias de control biológico mediante el empleo de virus (bacteriófagos) que ataquen a las bacterias implicadas en la enfermedad. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar el agente causal de la mancha bacteriana mediante técnicas de ITS, gen *estA* y medios selectivos para Xcv.

Metodología

Se colectaron muestras de tejido en seis sitios de la localidad de La Plata, en el municipio de Mascota, Jalisco; tres sitios de las localidades de Luis Jaramillo y El Pozo (1 y 2), del municipio de Trancoso, Zacatecas y un sitio del municipio de Yurécuaro, Michoacán. Las muestras se tomaron de plantas enfermas por mancha bacteriana, se muestrearon un total de diez sitios.

Los aislamientos se realizaron tomando partes afectadas de tejido y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril (121 °C durante 20 min). La muestra de tejido fue macerada en un mortero estéril, al cual previamente se agregaron 2 mL de agua destilada

estéril. Se recuperó 1 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo con 9 mL de agua estéril. Luego se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} , después se tomaron 100 μ L de cada dilución para sembrarse sobre medio de cultivo extracto de levadura-dextrosa (YCDA). Las cajas con las diluciones bacterianas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C. La purificación de las colonias se realizó con base a la coloración amarilla y se resembraron en YCDA por estriado.

Para la caracterización de los aislamientos se empleó medio selectivo Xan-D propuesto por Lee *et al.* (2009), el cual contiene Tween-80 y el género *Xanthomonas* que es capaz de crecer por poseer el gen *estA* que codifica por la proteína EstA, capaz de hidrolizar al Tween-80; las colonias que presentan coloración verde amarillenta y un halo de hidrólisis después de cuatro días a 28 °C fueron consideradas como cepas potencialmente relacionadas a Xcv.

Los diferentes aislamientos bacterianos positivos a Xan-D fueron inoculados en medio de cultivo NB (Nutrient Broth) y se incuban a 28 °C y 200 rpm durante 48 h. De cada aislamiento se tomaron 1.5 mL de medio de cultivo líquido y se realizó la extracción de ADN mediante la metodología descrita por Chen y Kuo (1993). La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría mediante un nanoespectro GenovaNano (JENWAY). Con el fin de analizar los ITS en el genoma de *Xanthomonas*, se realizó un análisis *in silico* para determinar el tamaño de fragmento esperado de la amplificación de la región intergénica de los genes ribosomales 16S y 23S (ITS) de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cepa 85-10.

La caracterización molecular de los aislamientos se realizó mediante PCR, amplificando la región ITS 16S y 23S (Jensen *et al.*, 1993), a través de los oligonucleótidos G1 (GAAGTCGTAACAA GG) y L1 (CAAGGCATCCACCGT); y la región del gen *estA* con el empleo de los oligonucleótidos Xc-lip-F2 (TATGTGATG GTGC-CGACCATTC) y Xc-lip-R2 (GGA CTTCGCGGTCCACGT-CGTAGC) (Lee *et al.*, 2009). Se usaron 20 ng de ADN en reacciones de 12.5 μ L. Las muestras se migraron en un gel de agarosa a 0.8% a 85 V durante 1 h y al

1% con GelRed®. Como control positivo se utilizó a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cepa BV5-4a (861) (Canteros *et al.*, 1989; 1995).

Resultados y discusión

Se realizaron un total de 110 aislamientos de las muestras de tejido colectadas en los sitios de muestreo las tres zonas productoras de Chile de Jalisco, Michoacán y Zacatecas. Mediante la prueba en medio Xan-D se determinó que sólo 22 aislamientos presentaron halo de hidrólisis y coloración verde amarillenta, típica de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (figura 1).

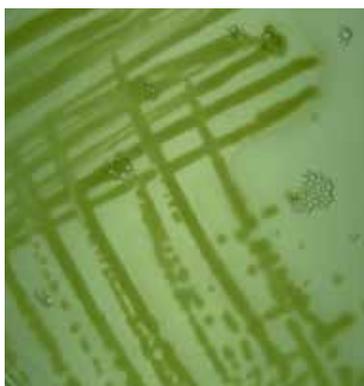


Figura 1. Crecimiento de aislamientos bacterianos creciendo sobre medio Xan-D. Nótese el color amarillo verdoso de las colonias bacterianas y sus halos de inhibición.

Mediante el análisis con ITS se determinó a diez aislamientos capaces de hidrolizar el Tween-80 como potenciales cepas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (figura 2). Mediante el análisis *in silico* del genoma de la cepa de *X. campestris* pv. *vesicatoria* cepa 85-10 se determinó que sólo tenía dos operones de genes ribosomales, los cuales poseen un espacio intergénico de 583 pb. La amplificación de los ITS en los aislamientos capaces de hidrolizar el Tween-80 mostró aislamientos con fragmentos similares en longitud a los esperados de acuerdo al análisis *in silico* y a los presentados en la cepa BV5-4a de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (figura 2).

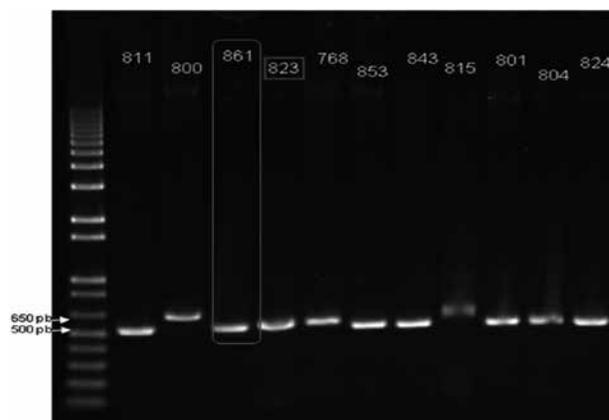


Figura 2. Amplificación del fragmento ITS (583 pb), típico de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Carril 861 corresponde a la cepa BV5-4a de Xcv. El marcador corresponde a 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Se muestran ocho aislamientos que amplificaron la región ITS, correspondiente a la región de Xcv: 801, 804, 811, 823, 824, 843, 853 y 768 (figura 2). El fragmento amplificado por Lee *et al.* (2009) para el gen *estA* fue de 777 pb, sin embargo, el tamaño del fragmento no corresponde a cepas aisladas en México, lo cual pudiera ser explicado por divergencia del gen *estA*.

Por otro lado, al comparar la longitud del fragmento amplificado Xcv cepa BV5-4a (cepa de referencia 861), mostró también divergencia respecto a lo reportado por Lee *et al.* (2009), lo cual sugiere también una posible divergencia de este gen, dado que la cepa de referencia tiene como origen Argentina, mientras las evaluadas por Lee *et al.* (2009) son originarias de Taiwán y Europa. Los aislamientos 811 y 801 corresponden al mismo sitio de muestreo, mientras que el 824 fue de un sitio distinto, sin embargo, todos los amplificados son similares a la cepa de referencia BV5-4a (figura 3).

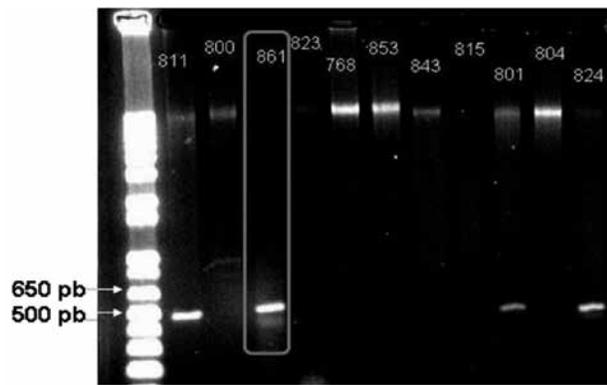


Figura 3. Amplificación del gen *estA* (777 pb) típico de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Carril 861 corresponde a la cepa BV5-4a de Xcv. El marcador de peso molecular empleado fue 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Finalmente, la figura 4 muestra un análisis de conglomerados de los ITS e indica que seis aislamientos son similares a Xcv. Las cepas identificadas como positivas serán analizadas mediante ITS-RFLP y posteriormente enviadas a secuenciar su gen 16S. Esta identificación es la primera etapa de un trabajo mayor en el que se pretende aislar bacteriófagos para ser utilizados como medida de control en cultivos de chile que presenten mancha bacteriana.

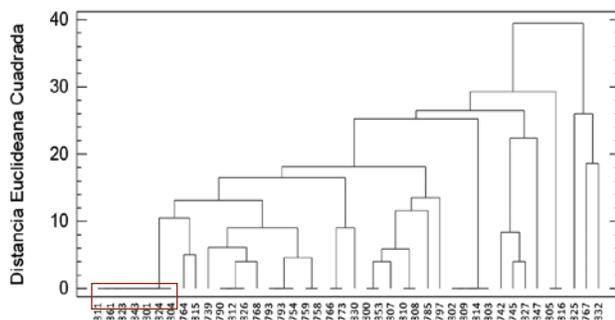


Figura 4. Relaciones de 42 aislamientos bacterianos implicados en la mancha bacteriana de Chile provenientes de tres regiones productoras de Chile de los estados de Jalisco, Zacatecas y Michoacán, a partir de datos ITS-PCR, mediante el método jerárquico aglomerativo de agrupación promedio (UPGMA). En el círculo se señalan los aislamientos similares a la cepa de referencia BV5-4a de Xcv (864).

Conclusiones

Los aislamientos 801, 804, 811, 823, 824 y 843 mostraron características similares a la cepa de referencia Xcv cepa BV5-4a (864): colonias verde amarillentas

en medio Xan-D con halos de hidrólisis, amplificaron la región de ITS aproximada de 583 pb y amplificaron el gen *estA* similar a BV5-4a, por lo cual estos aislamientos pueden ser considerados como cepas de Xcv.

Agradecimientos

A la doctora Blanca Isabel Canteros del INTA-Argentina por la donación de la cepa BV5-4a de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Igualmente al doctor Saúl Fraire Velázquez de la UAZ por el apoyo en el muestreo de Zacatecas. Consuelo López-Vielma agradece al Conacyt por la beca para cursar estudios de maestría en el PICyT del CIATEJ.

Referencias

- Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Pring, D.R., Stall, R.E. (1989). Plasmid encoded copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (pp. 351-356). In Z. Klement (Ed.), *A Report on the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (ICPPB)*, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Jones, J.B., Stall, R.E. (1995). Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 85:1482-1486.
- Chen, W., Kuo, T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Research*, 21(9):2260.
- Chew, M. (2008). *Principales enfermedades del Chile* (Capsicum annum L.). Matamoros: SAGARPA.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4): 945-952.
- Lee, Y., Sung, A., Liu, T., Lee, Y. (2009). Combination of Chromogenic Differential Medium and *estA*-Specific PCR for Isolation and Detection of Phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 6831-6838.



Validación del extracto proteico de semilla de higuerilla (*Ricinus communis* L.) sobre el frijol variedad flor de mayo

Daniela Mar-Pérez | J. Gabriel Ramírez-Pimentel | C. Leobardo Aguirre-Mancilla
Instituto Tecnológico de Roque

J. Antonio Rangel-Lucio
Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria

correo-e: damarp_16@hotmail.com

Resumen

El frijol figura entre los principales cultivos de México. Sin embargo este cultivo está sujeto a pérdidas considerables debido a diversos factores, destaca el ataque por plagas como el gorgojo pardo del frijol (*Acanthoscelides obtectus* Say), que es controlado principalmente con productos químicos que contribuyen a la contaminación ambiental y a los daños en la salud humana por su alto nivel tóxico. Por tal motivo, se extrajo una fracción proteica de semilla de higuerilla enriquecida con lectina y se probó su efecto inhibitorio en el crecimiento poblacional de Gorgojo de frijol (*Acanthoscelides obtectus* Say) y en la calidad de la semilla de frijol en almacén. La semilla de higuerilla se colectó en el Instituto Tecnológico de Roque; la lectina se extrajo mediante una técnica que combina cambios de temperatura y extracciones salinas-ácidas; obteniendo una concentración de 6.74 mg mL⁻¹ del extracto proteico desgrasado y 6.04 mg mL⁻¹ del extracto sin desgrasar. Se comprobó la presencia de lectina mediante técnicas de electroforesis en gel. Posteriormente, se realizó el bioensayo, asperjando la lectina sobre la semilla de frijol, variedad flor de mayo, infestada con gorgojos para probar su grado de letalidad. Por último, se realizó una prueba de germinación estándar para descartar daños por el uso de lectina como insecticida en semilla de frijol. Los resultados de este trabajo evidencian el efecto insecticida de la lectina extraída de *Ricinus communis* sobre el gorgojo de frijol.

Palabras clave: lectina, higuerilla, insecticida, frijol.

Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es un cultivo de gran importancia en el agro mexicano. De acuerdo con datos recientes, en 2013 México tuvo una producción de 1 294 633.90 t (SIAP, 2014). Entre los problemas que enfrenta la producción de frijol, se encuentra el ataque por plagas de insectos y enfermedades, destacándose por los daños que ocasiona, el gorgojo (*Acanthoscelides obtectus* Say). La presencia del gorgojo dentro de la semilla reduce significativamente su calidad e incrementa la posibilidad de descomposición.

Según Leonard (1981), los daños en México y América Latina por *A. obtectus* han provocado 35% de pérdidas de la producción total. La utilización de insecticidas de origen vegetal en granos y semillas almacenadas se ha tornado importante en la economía agrícola y ecológicamente en el medio por la efectividad, bajo costo, facilidad de preparación y menor grado de contaminación (Ortega, 1987).

Las lectinas son proteínas que se unen a los carbohidratos que forman parte de glicoproteínas. En las plantas, estas moléculas funcionan como protectores contra el ataque de insectos. *Ricinus communis* se caracteriza por mostrar cantidades variables de lectina. Estas cualidades se encuentran en toda la planta, sin embargo, la semilla es la que presenta la mayor concentración. Dichas propiedades han sido aprovechadas para realizar control de plagas de insectos agrícolas con resultados exitosos. Con el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de un extracto proteico obtenido de la semilla de higuierilla (*Ricinus communis*) empleado como insecticida en la germinación de semilla de frijol, variedad flor de mayo.

Metodología

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Roque, municipio de Celaya, Guanajuato. La colecta de semillas de higuierilla

(*Ricinus communis* L.) se llevó a cabo en el campo experimental del mismo instituto. Se evaluó la variedad de frijol flor de mayo.

Extracción de lectina

La lectina se obtuvo por un método que combina cambios de temperatura y sucesivas extracciones salinas y ácidas (Alvarez *et al.*, 1996). Se molieron las semillas de higuierilla y se mezclaron 10 g de la harina con 50 mL de NaCl 0.85% dejándose en agitación constante 24 h a 4 °C. La mezcla obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se incubó por 30 min a 60 °C, posteriormente se congeló a -20 °C por 48 h. Luego, se descongeló y centrifugó a 3000 rpm por 20 min y al sobrenadante se le adicionó HCl hasta una concentración de 0.1 N y se incubó a 40 °C durante 24 h, se centrifugó nuevamente durante 20 min a 3000 rpm y se desechó el precipitado, el sobrenadante se dializó con NaCl 0.85% por 24 h. La presencia del extracto proteico se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 a una densidad óptica de 280 nm. El extracto se desgrasó con una solución cloroformo-metanol 2:1 v/v (Aguirre *et al.*, 2004).

Electroforesis en gel

Se llevó a cabo una técnica de detección de glicoproteínas en gel mediante la tinción de Ácido periódico-Schiff (Nicolle H. *et al.*, 2009) para corroborar la presencia de lectinas en el extracto proteico.

Bioensayo

Se emplearon 4 concentraciones de lectina: C1= 0.674 mg mL⁻¹, C2= 0.0674 mg mL⁻¹, C3= 0.00674 mg mL⁻¹, C4= 0.000674 mg mL⁻¹. Se incluyó un control (10 mL de agua destilada), realizando tres repeticiones por concentración. Primero se desinfectó la semilla de frijol (50 g por repetición) con una solución de hipoclorito de sodio 1%, se enjuagó con agua destilada y

se dejó secar. Posteriormente se asperjó la semilla con la lectina extraída previamente (10 mL) y se introdujeron los 10 gorgojos adultos, donados por Rafael Bujanos Muñoz, Investigador de Campo Experimental Bajío (CEBAJ), los cuales se almacenaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su utilización. Se incluyó un testigo absoluto con agua destilada. Se realizaron tres conteos de gorgojos muertos a las 24, 48 y 72 h posteriores al establecimiento del bioensayo.

Prueba de germinación estándar

Se evaluó la capacidad germinativa de la semilla de frijol asperjada con lectina a fin de descartar un posible efecto en su capacidad germinativa a causa de la lectina. La prueba se realizó conforme a las normas de la ISTA (1976). Se utilizaron 50 semillas por repetición y se realizó un solo conteo de semillas normales, anormales, frescas y duras al séptimo día.

Resultados y discusión

Extracción de lectina

La concentración final que se obtuvo fue de 6.74 mg mL⁻¹ del extracto proteico desgrasado y 6.04 mg mL⁻¹ del extracto sin desgrasar.

Electroforesis en gel

De acuerdo con los resultados obtenidos, se muestra un peso molecular aproximado de 66 kDa que coincide con el peso molecular que la literatura cita para lectinas vegetales (figura 1). En el caso específico de este gel, no se utilizó un marcador de peso molecular puesto que lo único que se buscaba era afirmar la presencia de lectinas en el extracto proteico de semilla de higuera.

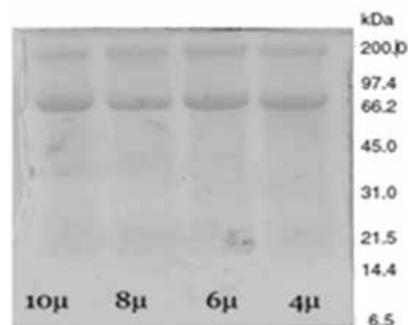


Figura 1. Detección de glicoproteínas en gel. Los números 10, 8, 6 y 4 µ corresponden a los micro litros cargados de muestra del extracto de lectina.

Bioensayo

En la concentración más alta (C1= 0.674 mg mL⁻¹ de lectina) se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 70% (cuadro 1), mostrando así la efectividad insecticida de la lectina.

En semilla de frijol, donde se han usado compuestos orgánicos, se sabe que *Hypericum perforatum* inhibió a *A. obtectus* en 80% y *Achillea millefolium* lo hizo en 96% (Ecobici *et al.*, 2004).

Cuadro 1
Porcentaje de mortalidad de los gorgojos a las 24, 48 y 72 h

Concentración	T. muestra	Gorgojos muertos			% mortalidad
		24h	48h	72h	
c1	30	14	16	21	70%
c2	30	8	10	15	50%
c3	30	2	2	5	16%
c4	30	0	1	3	10%
Control	10	0	2	2	20%

C1=0.674, C2= 0.0674, C3= 0.00674, C4= 0.000674 mg mL⁻¹

Germinación estándar

El extracto proteico no alteró la capacidad germinativa de la semilla de frijol. Como se muestra en el cuadro 2, se obtuvieron porcentajes superiores a 75% comparados con el control (80%).

Cuadro 2

Prueba de germinación estándar en semilla de frijol Flor de mayo asperjada con lectina

Semillas							% Germ.
Conc.	Rep	N	A	F	D	Total	
1	1	38	6	1	5	50	75.3
	2	35	12	4	2	50	
	3	40	7	1	2	50	
2	1	36	4	5	5	50	74.0
	2	37	8	4	1	50	
	3	38	8	3	1	50	
3	1	35	8	4	3	50	70.7
	2	29	11	6	4	50	
	3	42	7	1	0	50	
4	1	29	15	4	2	50	56.0
	2	25	17	5	3	50	
	3	30	13	7	0	50	
Control	1	40	7	2	1	50	80.7
	2	38	5	3	4	50	
	3	43	3	1	3	50	

C1=0.674, C2= 0.0674, C3= 0.00674, C4= 0.000674 mg mL⁻¹

Conclusiones

La lectina extraída de la semilla de higuierilla (*Ricinus communis* L.) redujo la resistencia de *A. obtectus* en frijol flor de mayo, mostrando un porcentaje de mortalidad del 70% en la concentración más alta. Este experimento marca la pauta para continuar en la búsqueda de nuevas alternativas eficaces y amigables con el medio ambiente para el control de insectos plaga en semillas de almacén, siendo una de ellas la utilización de extractos vegetales.

Agradecimientos

A Conacyt y a los doctores que conforman este equipo de trabajo así como al Instituto Tecnológico de Roque.

Referencias

- Álvarez, M., Fuente, J.L., Villarrubia, M., Menéndes, S., Ortiz, L. (1996). Actividad biológica de *Ricinus communis* L. sobre mosca doméstica (*Musca domestica*). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 48(3):192-194.
- Aguirre, C., Valdés, S., Mendoza, G., Rojo, A., Blanco, A. (2004). A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan sedes (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138:81-89.
- Ecobici, M.M., Ion, O., A. Popa (2004). The effect active principles from medicinal and flavor plants in non chemical control against bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say. *Journal of Central European Agriculture*, 5(3):127-136.
- Leonard, D. (1981). *Cultivos tradicionales* (Traducción al Español). Recuperado de http://www.fastonline.org/CD3WD_40/HLTHES/PC/M0035S/ES/M0035S00.HTM
- Ortega A., L.D. (1987). *Evaluación de polvos vegetales y minerales para el combate del gorgogo pardo del frijol (Acanthoscelides obtectus Say) en frijol almacenado* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Packer, N., Ball, M., Devine, P., Patton, W. (2009). Detection of Glycoproteins in Gels and Blots (pp. 555-568). In Walker, J.M. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2014). <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>



Expresión del gen *Mf-Ef1* en cepas de *Mycosphaerella fijiensis*

Yamily Y. Burgos-Canul | Roberto Vázquez-Euán | Miguel Tzec-Simá
 Cecilia M. Rodríguez-García | Leticia Peraza-Echeverría | Nuvia Kantún-Moreno
 Andrew-James | Rosa Grijalva-Arango | Blondy B. Canto-Canché

Unidad de Biotecnología | CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN

Ignacio Islas-Flores

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas | CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN

Luciano Martínez-Bolaños

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

correo-e: yamily_yaz@hotmail.com

Resumen

Los bananeros tienen pérdidas importantes en sus cultivos debido a la Sigatoka negra, por lo tanto existe la necesidad de prevenir dicha enfermedad. Una estrategia para contrarrestar al patógeno es el establecimiento del uso de fungicidas, pero esto no ha sido suficiente; por lo que es importante estudiar y analizar la expresión de genes esenciales del patógeno para su virulencia durante la interacción *M. fijiensis*-*Musa*. En este trabajo se analiza la expresión del gen *Mf-Ef1*, efector de *M. fijiensis*, en cepas que fueron aisladas de fincas con diferentes manejos de fungicidas.

Palabras clave: Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*.

Introducción

El banano ocupa el 4° lugar de cultivos más importantes del mundo, después del arroz, trigo y maíz (FAO, 2013). Este cultivo tiene un gran impacto económico y social debido a que es un producto accesible, económico y nutritivo, el cual contiene vitaminas A, C, B6 y minerales (Roux *et al.*, 2008). El nombre científico del banano es *Musa spp.* pertenecen a la familia *Musaceae*; sin embargo, este cultivo es afectado por diversas plagas (Nelson *et al.*, 2006). La Sigatoka negra (SN) representa pérdidas de hasta el 100% de banano, además *M. fijiensis* ha demostrado ser más virulento que *M. musicola*, porque causa síntomas tempranos (en 10 días), afecta a más cultivares del grupo Cavendish (genoma AAA) y a cultivares con genoma AAB, los cuales son resistentes a la Sigatoka amarilla; incluso se ha adaptado a altas altitudes (Churchill, 2010; Arzanlou *et al.*, 2007).

La Sigatoka negra es la enfermedad foliar más destructiva en todo el mundo, que genera un daño foliar y la maduración precoz de los frutos. Es causada por un hongo patógeno, hemibiotrófico, perfecto y que posee alta variabilidad genética, conocido como *Mycosphaerella fijiensis* (*Mf*) (Churchill, 2010; Robert *et al.*, 2012). Hasta el momento, el control más eficaz de dicho patógeno es el uso de fungicidas en las fincas bananeras (Pérez, 2006); dichos compuestos posiblemente estén ejerciendo alguna presión sobre las cepas de *Mf*, lo cual podría verse reflejando en su virulencia. En este trabajo se analizó por qRT-PCR la expresión del gen *Mf-Ef1* en 4 puntos de muestreo *in vitro* y usando una cepa proveniente de finca bananera sometida a fungicidas (*MF-CR*) y una cepa control (*Mf-C1*), con la finalidad de comparar la expresión de este gen en las dos cepas.

Metodología

Se partió de material fúngico fresco del hongo *Mycosphaerella fijiensis* para realizar la infección *in*

vitro de banano, como se describe en los ensayos de infección reportado por Peraza *et al.* (2008). Posteriormente, se extrajo el ARN, siguiendo lo reportado por Kantún-Moreno *et al.* (2013); luego se realizó la síntesis del cDNA y la cuantificación de expresión génica por qRT-PCR, mediante el método de cuantificación relativa con curva estándar. Las reacciones de amplificación se realizaron empleando el equipo PCR tiempo real Step One Plus, de 96 pozos y siguiendo las instrucciones del proveedor Applied Biosystems.

El análisis fue realizado empleando el paquete estadístico SAS versión 9.1 y se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

Resultados y discusión

El material vegetal inoculado (Figura 1) no presentó síntomas de SN en el primer muestro; sin embargo, en el segundo muestreo se observaron los primeros síntomas de la enfermedad, correspondientes a pizcas; en el tercero las pizcas aumentaron considerablemente, dispersándose por todo el material vegetal y adquiriendo coloración negra; las cuales se convirtieron en rayas y manchas en el cuarto. Además también se observó el desarrollo de crecimiento del micelio epifílico.

Cuadro 1

Expresión del gen *Mf-Ef1* durante la infección *in vitro* de banano con *M. fijiensis*

Muestras	1 ^{er}	2 ^{do}	3 ^{ro}	4 ^{to}
Mf-CR	1	13	6.5	6.5
Mf-C1	1	4	6.5	1.5

CR, aislada de finca con manejo de fungicidas. C1, aislada de plantaciones sin fungicidas. Se expresa como «veces de expresión» respecto al punto uno, calibrador.

En cuanto a la expresión génica del gen *Mf-Ef1* (cuadro 1), para la cepa *Mf-CR* la expresión fue 13 veces superior al calibrador en el segundo muestreo, mientras que disminuyó a la mitad de este valor en

el tercero y luego se mantuvo hasta el último día de colecta, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos últimos puntos muestreados.

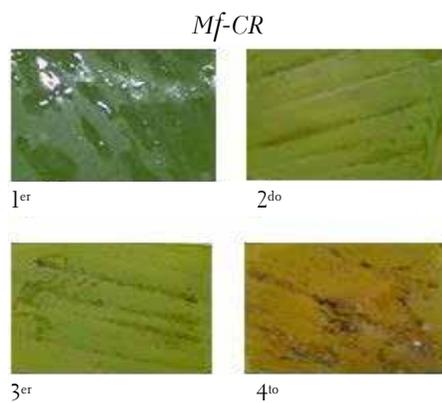


Figura 1. Infección *in vitro* de banano inoculado con la cepa *Mf-CR* *Mycosphaerella fijiensis* y el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad Sigatoka negra, ocasionada por el hongo.

Por su parte, el material vegetal inoculado con la cepa *Mf-C1* (figura 2) desarrolló pequeñas pizcas en el segundo muestreo, las cuales al tercero crecieron en tamaño y aumentaron en todo el fragmento, como si empezara a crecer micelio. Por último, en el cuarto, las lesiones cambiaron a estrías.

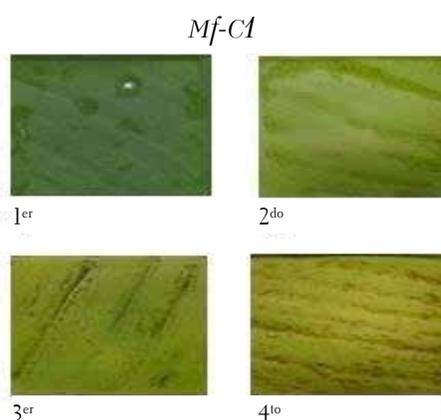


Figura 2. Infección *in vitro* de banano inoculado con la cepa *Mf-C1* *Mycosphaerella fijiensis* y el desarrollo de la sintomatología de la enfermedad Sigatoka negra, ocasionada por el hongo, en los 4 puntos de muestreo.

Con respecto al nivel de expresión del gen *Mf-ft*, el máximo se observó en el segundo muestreo,

siendo cuatro veces superior al punto uno, el cual se utilizó como calibrador. Después se observó un patrón descendente, disminuyendo a la mitad en el tercer muestreo y continuó disminuyendo un poco más para el cuarto muestreo.

Conclusiones

El objetivo principal de los productores de banano es obtener racimos con frutos de buena calidad para comercializar; para esto los agricultores necesitan que sus plantas cuenten con al menos 10 hojas sanas al momento de la etapa de floración. Las prácticas culturales ayudan en el manejo de las enfermedades agrícolas, pero deben ser complementadas con otros métodos como este trabajo que contribuye a un mejor entendimiento de esta enfermedad. El material vegetal inoculado desarrolló la formación de lesiones correspondientes a Sigatoka negra (figuras 1 y 2). Asimismo, se observaron pizcas, estrías y rayas, lesiones que fueron en aumento, lo que confirma que el patógeno pudo colonizar exitosamente *in vitro*.

La expresión del gen *Mf-Eft*, incrementó en el segundo muestreo; probablemente este gen tenga un papel importante en el avance inicial de la necrotrofia. La disminución en su expresión en el cuarto punto de muestreo coincide con el patrón reportado por Canché-Gómez (2013). Pero difieren en el tercer punto de muestreo, esta diferencia entre los días de expresión, puede estar relacionado con el estado fisiológico de las plantas de donde proviene el fragmento y la capacidad de virulencia de cada cepa de *M. fijiensis*. Todos estos resultados podrían sugerir que los fungicidas ejercen presión sobre las cepas y éstas desarrollan una mayor capacidad de expresión del *Mf-Eft*, así como una mayor velocidad de infección en comparación con la cepa control, aislada de una plantación sin fungicidas. Sin embargo, falta evaluar un mayor número de cepas y realizar otros estudios que permitan confirmar dicha aseveración.

Agradecimientos

Conacyt por la beca otorgada a Yamily Y. Burgos Canul.

FORDECYT 416886 por el financiamiento al proyecto «Programa Integral para el manejo del cultivo de plátano impulsando las buenas prácticas de campo e inocuidad, basados en la investigación y aplicación de herramientas biotecnológicas».

Dra. Rosa M. Escobedo-Gracia Medrano e IBT. Carlos Cruz Cárdenas por su apoyo en la estadística.

Referencias

- Arzanlou, M., Abeln, E.C., Kema, G.H., Waalwijk, C., Carlier, J., Vries, I., Guzmán, M., Crous, P. (2007). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 97(9):1112-1118.
- Canché Gómez, A. (2013). *Validación de técnicas in vitro (fragmentos foliares y plántulas) en la interacción Mycosphaerella fijiensis-Musa acuminata* (Tesis de maestría). Posgrado en Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Churchill, A. (2010). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4):307-328.
- Kantún-Moreno, N., Vázquez-Euán, R., Tzec-Simá, M., Peraza-Echeverría, L., Grijalva-Arango, R., Rodríguez-García, C., James, A.C., Ramírez-Prado, J. *et al.* (2013). Genome-wide *in silico* identification of GPI proteins in *Mycosphaerella fijiensis* and transcriptional analysis of two GPI-anchored β -1,3-glucanotransferases. *Mycologia*, 105(2):285-296.
- Nelson S., R. Ploetz, A. Kay-Kepler (2006). *Musa* species (banana and plantain) (pp. 1-33). In Eletvitch, C.R. (Ed.), *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. Hluailoa, Hawaii: Permanent Agriculture Resources.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (2014). Panorama general de la producción y el comercio mundial de banano. En *La economía mundial del banano 1985-2002*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5402s/y5402s04.htm>
- Peraza, L., Rodríguez, G., Zapata, S. (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australasian Plant Pathology*, 37(5):460-463.
- Pérez, L. (2006). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Fitosanidad*, 10(1):55-72.
- Robert S., Ravigne, V., Zapater, M., Abadie, C., Carlier, J. (2012). Contrasting introduction scenarios among continents in the worldwide invasion of the banana fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 21(5):1098-1114.
- Roux, N., Baurens, F., Dolezel, J., Hribová, E., Heslop-Harrison, P., Town, C., Sasaki, T., Matsumoto, T. *et al.* (2008). Genomics of Banana and Plantain (*Musa spp.*), major Staple Crops in the Tropics (pp. 1-29). In Moore, P., Ming, R., *Genomics of Tropical Crop Plants*. New York: Springer.