CIENCIAS AGRO PECUARIAS

INDUCCIÓN A LA CIENCIA, LA TECNOLOGÍA Y LA INNOVACIÓN EN LA REGIÓN CENTRO

20° VERANO DE LA CIENCIA REGIÓN CENTRO

VOL.4 NUM.2

Índice

1. ACTIVIDAD ANTI-OXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE FRUTOS DE GARAMBULLO (*Myrtillocactus geometrizans*) Y ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium spp*). Segovia García Itzel Anahí y Torres Rodríguez María Lucina.

2. AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE LA RAÍZ DE JITOMATE. Contreras López Hermenegildo y Ramírez Martínez Juan Francisco**.**

3. AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE RAÍZ DE JITOMATE SOLANUM LYCOPERSICUM. Oliva Negrete Marcela Lizbeth; Ramírez Martínez Francisco.

4. ANÁLISIS BROMATOLOGICO DE CINCO HIBRIDOS COMERCIALES DE MAIZ EN SURCOS CONVENCIONALES Y ESTRECHOS. Jesús Venancio Ojeda Serrano y Oralia Antuna Grijalva.

5. APLICACIÓN DE UN LÁTEX POLIMÉRICO COMESTIBLE COMO RECUBRIMIENTO PARA ARÁNDANOS AZULES EN POSCOSECHA. Daniela Nataly Díaz Zepeda y René Darío Peralta.

6. BIOENSAYO CON CULTVO DE FRIJOL (PHASEOLUS VULGARIS) PARA LA EVALUACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS. Nuñez Quintanilla Sandra Guadalupe y Alcalá Jáuregui Jorge Alonso.

7. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE Y QUESOS DE GANADO BOVINO Y CAPRINO, EN LA REGIÓN DEL ALTIPLANO OESTE DE SAN LUIS POTOSÍ. Rodríguez Rangel Felipe Asael y Rendón Huerta Juan Antonio.

8. CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE ENDÓFITOS EN PHASEOLUS VULGARIS. López Salazar Felipe Abraham y Mejía Teniente Laura.

9. CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS EN PHASEOLUS VULGARIS. Regalado Mora Soledad Sarahí y Mejía Teniente Laura.

10. CARACTERIZACION DE FIBRAS PROVENIENTES DE RESIDUOS AGRICOLAS. Serrato López José Juan y Herrera Méndez Carlos Hernán.

11. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES Y ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILIDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA. Vera García, Andrea y Riesgo Escovar, Juan R.

12. CARACTERIZACIÓN DE SUSTANCIAS GRASAS EN CUTÍCULAS DE VEGETALES. Diana Gabriela Montoya Anaya, Lorena Vargas Rodríguez y Gabriela Arroyo Figueroa.

13. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICORRIZAS ASOCIADAS A ESPECIES DE AGAVES DE GUANAJUATO. Jesús Alejandro Andrade Sandoval, Juan Gualberto Colli Mull.

14. CRECIMIENTO TEMPRANO DE PLANTAS DE TOMATE FERTILIZADAS CON FÓSFORO MICROENCAPSULADO Y HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES. Matehuala Velázquez Claudia Isabel y Cárdenas Flores Antonio.

15. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS DETOXIFICATIVAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA DE INSECTICIDAS EN PULGÓN AMARILLO DEL SORGO *Melanaphis sacchari* (Zehntner) EN LA ZONA SUROESTE DEL ESTADO DE GUANAJUATO. José Isaac Navarro Cuellar, Enrique Garcia Burgos, Luis Patricio Guevara Acevedo y Ernesto Cerna Chávez.

16. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS DETOXIFICATIVAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA DE INSECTICIDAS EN PULGÓN AMARILLO DEL SORGO *Melanaphis sacchari* (Zehntner) EN LA ZONA SURESTE DEL ESTADO DE GUANAJUATO.Marcelo Andrés Posada Martínez, Enrique García Burgos, Luis Patricio Guevara Acevedo y Ernesto Cerna Chávez.

17. DETECCIÓN DE *Listeria spp*. y *Salmonella enterica* EN FRESAS DE IMPORTACIÓN PROVENIENTES DE ESTADOS UNIDOS DE AMERICA EN MÉXICO. Osvaldo Castañeda Martínez y Dr. Gerardo Manuel Nava Morales.

18. DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. EN FRESAS DE IMPORTACIÓN PROVENIENTES DE ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA HACIA MÉXICO. Jorge Luis Sánchez García y Dr. Gerardo Manuel Nava Morales.

19. DETECCIÓN POR MÉTODOS MICROBIOLOGICOS DE *Salmonella spp.* EN FRESAS DE IMPORTACIÓN COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO. Anaya Ponce Carlos Alberto y Nava Morales Gerardo Manuel.

20. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES, FENOLES Y TANINOS EN HONGOS DE LA VARIEDAD PLEUROTUS OSTREATUS. José Antonio Trejo Trejo y Ana Angélica Feregrino Pérez.

21. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DURANTE LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR CEPAS FÚNGICAS. Oscar Guadalupe Castillo Martínez, Fernando Martínez Armenta y Varinia López Ramírez.

22. DETERMINACIÓN DE LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR CEPAS FÚNGICAS. Fernando Martínez Armenta, Oscar Guadalupe Castillo Martínez y Varinia López Ramírez**.**

23. DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS EN LA EPIDERMIS SE RELACIONAN CON LA INCLINACIÓN DEL TALLO DE *Echinocactus platyacanthus*. Páez Jiménez, M. G.; Escoto Rodríguez, M.

24. EFECTO PROMOTOR DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE BACTERIAS DE SUELO DEL AREA NATURAL PROTEGIDA CERRO DEL CULIACÁN. Diana Penélope Ramírez Aguirre y Blanca Estela Gómez Luna.

25. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EVALUAR LA INFECCIÓN DE MELOIDOGYNE EN RAÍCES DE TOMATE BAJO CONDICIONES IN VITRO. Karla Georgina Romero Sosa y Silvia Edith Valdés Rodríguez.

26. ESTUDIO Y ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN SUELOS Y AGUAS DE DIFERENTES SITIOS DE LA ZONA MEDIA. Felipe Alvarado Diaz y Juan Fernando Cárdenas González.

27. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE DOS EXTRACTOS VEGETALES. Juan Pablo Orozco Martínez y Rafael Alejandro Veloz García.

28. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES. Bueno González, Yuridia Sarahí y Veloz García, Rafael Alejandro.

29. EVALUACION DE LA CALIDAD DE SEMILLA DE MAIZ EN SURCOS CONVENCIONALES Y ESTRECHOS. Manuel Maclovio Rodríguez Chávez y Oralia Antuna Grijalva.

30. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN POR HONGOS ENDÓFITOS EN PLANTAS DE PHASEOLUS VULGARIS. Rafael Cano Segura y Adán Topiltzin Morales Vargas.

31. EVALUACION IN VITRO DE LA INTERACCIÓN MICOBIONTE Y FOTOBIONTE. Maricela Zumaya García, César Álvarez Mejía y Varinia López Ramírez.

32. EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MESTIZOS DE MAÍZ GENERADOS CON DOS PROBADORES CONTRASTANTES-I. Elisabeth Arellanes Jiménez y Armando Espinoza Banda.

33. EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MESTIZOS DE MAÍZ GENERADOS CON DOS PROBADORES CONTRASTANTES-III. Johanán Cortés Gómez y Armando Espinoza Banda.

34. EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MESTIZOS DE MAÍZ GENERADOS CON DOS PROBADORES CONTRASTANTES-II. Julia Salgado Patricio. Armando Espinoza Banda.

35. EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTRO DE PLAGAS EN HUERTOS URBANOS. Abraham Raúl Pérez Domínguez y Yessica Torrero Garza.

36. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS CODIFICANTES PARA BIOPÉPTIDOS DE INTERÉS HUMANO EN PLANTAS. Flores Gasca Diana y Morales Domínguez José Francisco.

37. PREFERENCIAS DE CONSUMO DE ZARZAMORA EN FRESCO EN LA ZONA METROPOLITANA DE SALTILLO. Alejandra Yesely Muñoz Díaz y Gregorio Castro Rosales.

38. PRODUCCION DE GRANO DE MAIZ EN SURCOS CONVENCIONALES Y ESTRECHOS. José Juan González Chávez y Oralia Antuna Grijalva.

39. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS PATÓGENAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS EN EL ALTIPLANO POTOSINO. Homero Camarillo Mata y María Cruz del Rocío Terrones Gurrola.

40. SUSCEPTIBILIDAD DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS A DIMETIL SULFÓXIDO. Rodríguez Castillo Nahaivi Paola; Barrón Bravo Óscar Guadalupe y Angel Sahagún César Andrés.

41. SUSCEPTIBILIDAD DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS A IVERMECTINA AL 1.2%. Aylín Elena Jaime Hernández, Oscar Guadalupe Barrón Bravo y Cesar Andrés Ángel Sahagún.

42. VISUALIZACIÓN DE MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA AGRICULTURA. Dr. Braulio Gutiérrez Medina, Alexis Vázquez Villa, Alejandra Judith Gutiérrez, Daniela Ramos Briseño.

43. VISUALIZACIÓN DIGITAL DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA AGRICULTURA. José Roberto Guerrero Ramírez y Braulio Gutiérrez Medina.

EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL DE PLAGAS EN HUERTOS URBANOS

Abraham Raúl Pérez Domínguez[1] y Yessica Torrero Garza[2]

RESUMEN

Dentro de los trabajos realizados anteriormente por otras instituciones cabe destacar que los resultados en la mayoría de los extractos vegetales probados han sido aceptables para el control de la Mosquita blanca *Bemissia tabacci* puntualizando el control a través de los extractos botánicos que han tomado gran importancia en esta década como alternativa para reducir el control químico. Por lo tanto, el campo para el control de la Mosquita blanca a través de extractos vegetales esta abierto a nuevas opciones. Respondiendo a nuestro cuestionamiento se evaluaron extractos obtenidos de Higuerilla *Ricinus communis* L., Ajo *Allium sativum* L., a diferentes concentraciones. Encontrándose que la mayoría de los extractos han mostrado una efectividad aceptable resaltándose el Higuerilla .

ABSTRACT

Among the works done previously by other institutions, it should be noted that the results in most of the tested plant extracts have been acceptable for the control of the white mosquito *Bemissia tabacci* L. punctualizing the control through the botanical extracts that have taken great importance in this decade as an alternative to reduce chemical control. Therefore, the field for the control of the white mosquito through plant extracts is open to new options. Responding to our questioning, extracts obtained from Higuerilla *Ricinus communis* L., Garlic *Allium sativu*m L. were evaluated, at different concentrations. Finding that most of the extracts have shown an acceptable effectiveness highlighting the Higuerilla.

Palabras Clave: Resultados, extractos vegetales, Mosquita Blanca, Higuerilla.

INTRODUCCIÓN

Desde el principio las plantas han sido capaces de protegerse por sí solas casi ante cualquier patógeno para lograr así la supervivencia y su desarrollo aun antes de verse involucrado el ser humano en este papel. Debido al desarrollo de metabolitos de manera eficiente han logrado defenderse ante la mayoría de las amenazas estando así en un círculo de supervivencia de especies. Para la obtención de los metabolitos de las plantas se han desarrollado mecanismos que van desde lo más practico hasta lo más laborioso; se pueden obtener extractos acuosos (Bautista *et al.,* 2000a) o polvos(Bautista et al.,2003a), o utilizar diferentes solventes para obtener diferentes compuestos , según su polaridad(Abou-Jawdah *et al*.,2002).

Resultados de diferentes investigaciones muestran el potencial antimicrobiano e insecticida del ajo y la higuerilla y de otros extractos obtenidos de plantas. Dentro de los metabolitos de interés y que han desarrollado las plantas están los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos(Cowan, 1999). Una investigación sobresaliente es la de Montes *et al* (2000) donde evaluaron 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos fitopatógenos, y se encontraron que entre 32 y 51% de las plantas evaluadas interactuaban con los hongos y causaban desde estimulación biológica hasta inhibición total.

Particularmente el Manejo de plagas ha sido basado en un control de larvas y adultos en la mayoría de las plagas insectiles ,y unas cuantas a los huevecillos , siendo de mera importancia el ultimo, ya que si se logra interrumpir su ciclo biológico desde el principio se obtendrá el menor daño posible en las plantas; Por lo tanto la investigación que se desarrolló está basada en la evaluación del efecto ovicida que puede presentar el extracto de higuerilla y de ajo que hipotéticamente debido a los antecedentes se cree tendrán resultados favorables en los huevecillos de *Bemissia tabacci*

[1] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Calle 6 #420,Colonia Australia ,C.P:25000,Saltillo, Coahuila, abrahamperez020597@gmail.com

[2] Instituto Tecnológico Superior de Abasolo ,Departamento de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Boulevard Cuitzeo de los Naranjos #401, Colonia Cuitzeo de los Naranjos ,C.P:36976,Abasolo ,Guanajuato ,Yessica.torrero@tecabasolo.edu.mx

MÉTODOS Y MATERIALES

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Química General del Instituto Tecnológico Superior de Abasolo (ITESA) en el municipio de Abasolo, Guanajuato, en condiciones de temperatura de 25 ±5 °C y a una Humedad Relativa de 60 ±10% .

Preparación de extractos vegetales

Para la elaboración del extracto vegetal de ajo se compraron los bulbos frescos y se llevaron al laboratorio donde se pesaron 150 gramos ,se limpiaron y cortaron en rodajas muy finas; se pusieron a secar en un horno solar en un tiempo aproximado de dos días a una temperatura de 30 ±10°C para después molerlas en mortero y llevar a pesar el material seco que se recuperó, dando como resultado 23.9483g, el cual se dividió en tres partes iguales para llevar a cabo la extracción mediante dos solventes para obtener un compuesto con agentes polares y otro con agentes no polares(Abou-Jawdah *et al*.,2002).

En la obtención del extracto con agentes polares se utilizó 7.9828g de ajo molido, se colocó en un papel filtro con un embudo y un matraz de base plana, se vaciaron 100 ml de Metanol (CH_3OH) como solvente para extraer los agentes polares, se dejó reposar durante 2 horas para lograr así el mayor escurrimiento posible y enseguida se llevó a un termo agitador magnético donde se vació en un matraz de bola para evaporar el solvente a la temperatura de su punto de ebullición y mantener lo que se extrajo en el matraz, se llevó al horno y se dejó secar durante 15minutos , después , se colocó en el desecador durante 15 minutos para logra el enfriado y con la ayuda de unas pinzas , para evitar el contacto directo y afectar el peso por la humedad , se pesó en una báscula digital y se obtuvo una diferencia del peso del matraz con el extracto y el peso del matraz arrojando el resultado 2.2 g de extracto de ajo con ingredientes polares y para después agregar 30 ml agua destilada al matraz de bola y sacar el extracto impregnado, se vació en un matraz de base plana, se tapó el matraz y se guardó en refrigeración a una temperatura de 4°C para su conservación ; siguiendo el mismo procedimiento pero utilizando como solvente el acetato de etilo ($CH_3COOCH_2CH_3$) se extrajo los agentes no polares de 7.9828 g de ajo , después de realizar la diferencia de pesos se obtuvo 2.2g de extracto con agentes no polares a los que posteriormente se le agregaron 10 ml de agua destilada con 40% de propilenglicol ,para lograr así la interacción del agua con los agentes no polares ya que el propilenglicol ha mostrado propiedades como emulsificador, se vació en un matraz de base plana se tapó y se llevó a refrigeración.

En el caso de la extracción de Higuerilla se recolectaron tallos y hojas de higuerilla , se secaron a temperatura del medio ambiente , se molió el material vegetal, se macero 100 g de materia seca en 200 ml de etanol al 50%, se dejó macerar durante 3 días; la mezcla fue filtrada con la ayuda de una bomba de vacío para separar el extracto ; con la ayuda de un termo agitador magnético a una temperatura de 45°C se separó el alcohol de la solución acuosa , posteriormente el extracto puro fue envasado en botellas de plástico y se colocó en refrigeración a 4°C para su conservación

Establecimiento de los tratamientos y el testigo

Iniciando con el establecimiento, se recolectaron en campo hojas de tomate con huevecillos de Mosquita blanca para el trasladado al laboratorio, donde se recortaron 9cm^2 de área foliar que incluyeran el número suficiente de huevecillos fértiles para realizar el experimento y se hizo un pre conteo de los huevecillos en cada uno, además, se desinfectaron con alcohol 15 frascos de 500 ml de capacidad y se les etiqueto según el tratamiento y el testigo .

Para cada tratamiento y el testigo se prepararon 10 ml de solución en 5 aspersores manuales; en el primer aspersor(T1) se colocó 10 ml del extracto de ajo no polar, al segundo aspersor (T2)10 ml del extracto de ajo polar, al tercer aspersor (T3) 5 ml de agua destilada y 5ml de extracto de higuerilla, al cuarto aspersor(T4) 10 ml de agua destilada con 1.5 g de ajo seco molido ,al quinto aspersor(T) se le añadió 10ml de agua con 0.1ml de Oberon^R como testigo comercial con efectos ovicidas; enseguida se tomaron las muestras de área foliar y se asperjo totalmente de manera que los huevecillos quedaron completamente cubiertos ,para cada tratamiento se establecieron tres repeticiones cuya distribución se muestra en la Tabla. 1. con el pre conteo de los huevecillos los cuales se colocaron en cada uno de los frascos, se taparon con malla tul y se ajustó con la ayuda de una liga, para posteriormente estar monitoreando cada 24 horas el número de adultos.

Tabla. 1. Distribución de Tratamientos, Testigo y datos del pre conteo de huevecillos

Tratamiento			Huevecillos
Tratamiento 1		R1	10
		R2	24
		R3	13
Tratamiento 2		R1	14
		R2	14
		R3	36
Tratamiento 3		R1	36
		R2	35
		R3	27
Tratamiento 4		R1	18
		R2	16
		R3	16
Testigo		R1	14
		R2	25
		R3	22

Se monitoreo el número de adultos en todos los frascos cada 24 horas durante 7 días y los datos obtenidos se procesaron en un Diseño Completamente al Azar.

RESULTADOS

Después de monitorear la eclosión de los huevecillos, cuyos datos se muestran en la Figura 1, se obtuvieron resultados muy favorables en los cuales la efectividad de los Tratamientos y el Testigo es mayor al 50% (Figura 2), sin embargo, el Tratamiento que mostro mayor efectividad es el de Higuerilla con un 99% .

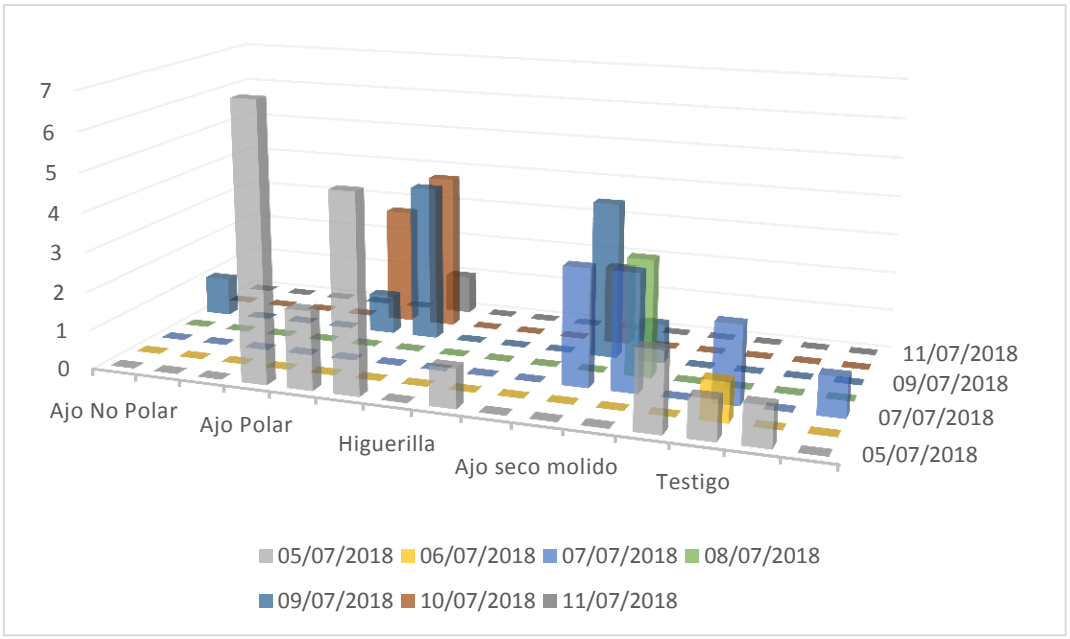


Figura 1. Conteo de adultos de cada Tratamiento y sus tres repeticiones durante siete días

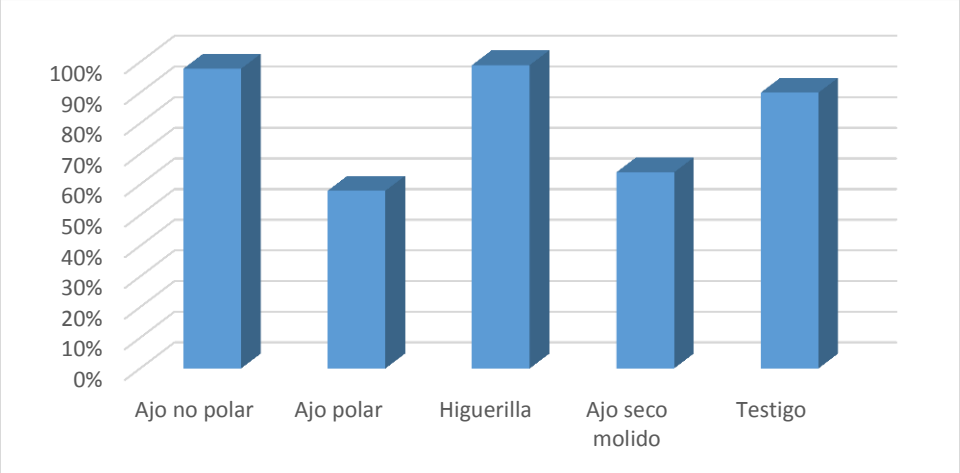


Figura 2. Comparación de la efectividad de los Tratamientos y el Testigo dada porcentaje

DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos se ha manifestado que el extracto con mayor efecto ovicida ha sido el de Higuerilla con % y en segundo lugar ha sido el extracto no polar de ajo con %; por lo tanto el resultado del experimento se ha contrastado con la investigación de Cuevas *et al* (2015) quien menciona a la higuerilla con un potencial bajo para el control de larvas de *Leptophobia aripa elodia* y no hace mención del potencial ovicida que ahora ha manifestado en los huevecillos de Mosquita blanca .

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se ha manifestado que el extracto con mayor efecto ovicida ha sido el de Higuerilla, aún se desconoce cuál es la razón, pero se deduce por la consistencia del extracto el cual actúa como un tipo de pegamento evitando la eclosión del insecto, por lo tanto, al interrumpir el ciclo biológico de la Mosquita blanca se da un gran paso para reducir los costos de inversión para controlar al adulto ; de manera que el extracto de higuerilla resulta una buena alternativa para el control de este insecto.

BIBLIOGRAFÍA

Bautista S, L Barrera N, L Bravo L,K Bermúdez T (2002a) Antifugal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidente of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage .Rev.Mex Fitopatol. 20:8-12.

Bautista S, E García D, L Barrera N, R Reyes C, C L Wilson (2003a) Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of poder and extracts of huamúchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinérea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Postharv. Biol.Technol. 29:81-92.

Abou-Jawdah Y, H Sobh, A Salameh (2002) Antymicotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon against phytopathogenic fungi. J. Agric. Food Chem 50:3208-3213.

Cowan M M (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 10:564-582.

Montes R, V Cruz C, G Martinez M, G Sandoval G, R García L, S Zilch D, L Bravo L, K Bermúdez T, H E Flores M, M Carvajal M (2000) Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Rev. Mex. Fitopatol. 18:125-131.

PREFERENCIAS DE CONSUMO DE ZARZAMORA EN FRESCO EN LA ZONA METROPOLITANA DE SALTILLO

Alejandra Yesely Muñoz Díaz y Gregorio Castro Rosales.

RESUMEN

En el presente documento se indican las preferencias de consumo de zarzamora en fresco en la zona metropolitana de Saltillo. Es importante conocer el favoritismo de los ciudadanos hacia la zarzamora, debido a que los desperdicios que tiene por falta de consumo. Esta investigación se realizó en base de encuestas a los habitantes de Saltillo ubicados en distintos cuadrantes de la ciudad con el fin de conocer la preferencia de toda la ciudad. El propósito es conocer su inclinación hacia el producto mencionado, asi como lo dispuesto a pagar. Los resultados se plantearon mediante el método de la demanda. Se tuvo el alcance de 138 personas encuestadas. Los resultados logrados fueron los esperados, pues aunque fueron pocos los encuestados se logró obtener las conclusiones deseadas.

ABSTRACT

In this document the consumption preferences of fresh blackberry in the Saltillo metropolitan area are indicated. It is important to know the favoritism of citizens towards the blackberry, due to the waste it has for lack of consumption. This investigation was carried out based on surveys of the inhabitants of Saltillo located in different quadrants of the city in order to know the preference of the entire city. The purpose is to know your inclination towards the mentioned product, as well as the willingness to pay. The results were raised by the demand method. The reach of 138 people was surveyed. The results achieved were as expected, because although few respondents were able to obtain the desired conclusions.

INTRODUCCIÓN

La investigación del mercado ha tenido un gran impacto en el consumo humano. La zarzamora contiene propiedades fundamentales para el ser humano. Además de que contienen fibra y pocas calorías. Por sus grandes beneficios tiene un impacto significativo en el mercado. El objetivo de la investigación es conocer su inclinación hacia el producto mencionado, así como lo dispuesto a pagar. Conociendo la preferencia del ciudadano sobre su favoritismo hacia la presentación de la zarzamora.

MARCO TEORICO

Escala Likert.
Es una escala de clasificación de uso muy difundido que requiere que los encuestados indiquen el grado de acuerdo o desacuerdo con cada una de las afirmaciones de una serie acerca del objeto de estímulo. Por lo general cada reactivo tiene cinco categorías de respuestas, que van de “totalmente en desacuerdo” a “totalmente de acuerdo”.
1= Totalmente en desacuerdo.
2= en desacuerdo.
3= indiferente.
4= de acuerdo.
5= Totalmente de acuerdo.

Escala Semántico.
Es una escala de clasificación de 7 puntos cuyos extremos están asociados con etiquetas bipolares que tienen carácter semántico. En una aplicación típica, los encuestados evalúan objetos sobre una serie de escalas de clasificación por ítem de 7 puntos vinculados en cada extremo a uno de dos adjetivos bipolares, como “frío” y “caliente”.

Escala de Stapel.
Es una escala de clasificación unipolar con 10 categorías numeradas del -5 a +5, sin un punto neutral (cero). Esta escala por lo general se presenta de manera vertical. Se pide a los encuestados que indiquen que tan precisa o imprecisa es la descripción que hace cada término del objeto, seleccionando una respuesta numérica apropiada para la categoría. Cuanto mayor sea el número, más precisa es la descripción que hace el término del objeto.

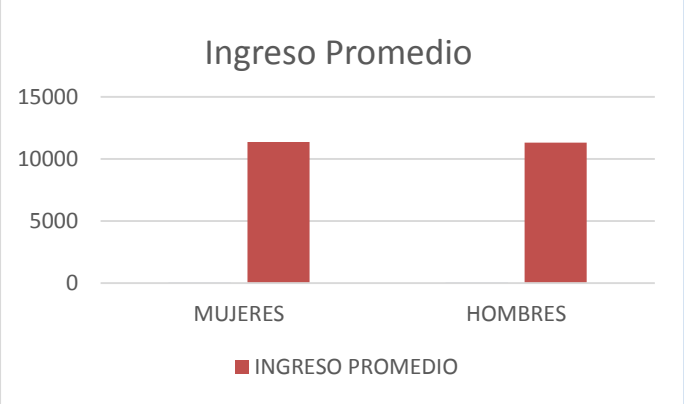
MÉTODOS Y MATERIALES

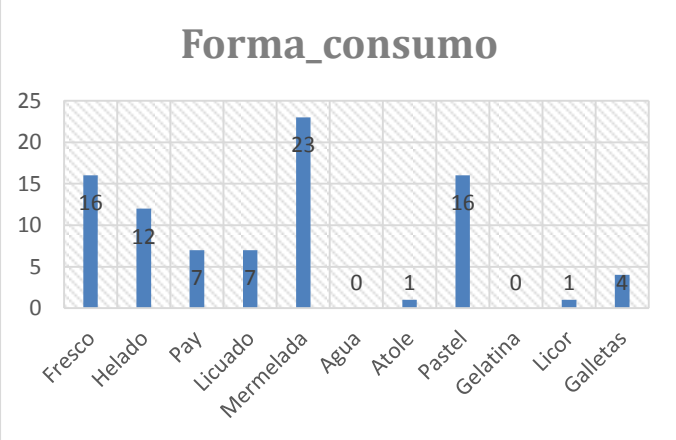
Las funciones de demanda del consumidor muestran las cantidades óptimas de cada uno de los bienes en función de los precios y de la renta del consumidor. Se expresan de la forma siguiente:

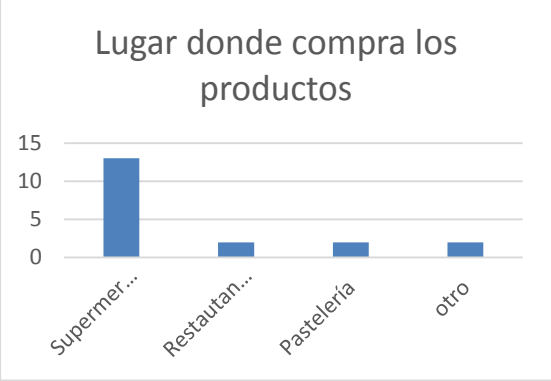
$$x^1 = x^1 (p^1, p^2, m)$$
$$x^2 = x_2((p^1, p^2, m)$$

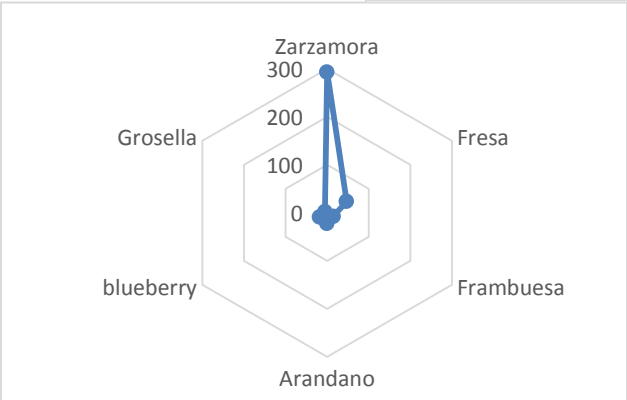
El primer miembro de cada ecuación representa la cantidad de demanda y el segundo es la función que relaciona los precios y la renta con esa cantidad.

RESULTADOS









Estimaciones de Logit

Variable dependiente: consume

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
const	-11.56**	-11.87**	-8.894*	-8.894*	-9.212**	-10.79**
	(-3.469)	(-3.219)	(-1.816)	(-1.805)	(-2.385)	(-2.533)
	[0.0005]	[0.0013]	[0.0693]	[0.0711]	[0.0171]	[0.0113]
likert	1.718**	2.068**	1.779**	1.778**	2.053**	1.982**
	(2.653)	(2.716)	(2.229)	(2.226)	(2.644)	(2.565)
	[0.0080]	[0.0066]	[0.0258]	[0.0260]	[0.0082]	[0.0103]
genero	2.786**	2.730**	3.117**	3.110**	2.823**	2.984**
	(2.263)	(2.225)	(2.205)	(2.193)	(2.232)	(2.140)
	[0.0237]	[0.0261]	[0.0274]	[0.0283]	[0.0256]	[0.0323]
trabaja	1.925*	1.973*	2.310*	2.305*	1.990*	2.263*
	(1.718)	(1.736)	(1.725)	(1.717)	(1.661)	(1.677)
	[0.0858]	[0.0826]	[0.0846]	[0.0860]	[0.0968]	[0.0936]
esco	1.685**	1.716**	1.572**	1.576**	1.547**	1.637**
	(3.772)	(3.605)	(3.229)	(2.878)	(3.312)	(3.390)
	[0.0002]	[0.0003]	[0.0012]	[0.0040]	[0.0009]	[0.0007]
casado		-1.391	-2.375*	-2.372*	-1.483	-2.185*
		(-1.584)	(-1.888)	(-1.876)	(-1.603)	(-1.831)
		[0.1133]	[0.0591]	[0.0606]	[0.1090]	[0.0671]
semantico			-0.2750	-0.2737		
			(-0.6914)	(-0.6830)		
			[0.4893]	[0.4946]		
edad			0.04823	0.04831		0.04756
			(1.146)	(1.147)		(1.154)
			[0.2516]	[0.2516]		[0.2485]
int_hog			-0.4943	-0.4931	-0.5098	-0.4955
			(-1.438)	(-1.433)	(-1.515)	(-1.420)
			[0.1505]	[0.1520]	[0.1298]	[0.1556]
ingreso				-1.693e-06		
				(-0.02308)		
				[0.9816]		
n	80	80	80	78	80	80
R^2 corregido	0.4041	0.4364	0.4905	0.4842	0.4676	0.4848
lnL	-26.14	-24.72	-22.34	-22.34	-23.35	-22.59

entre paréntesis los estadísticos t
valores p entre corchetes
* indica significativo al nivel del 10 por ciento
** indica significativo al nivel del 5 por ciento
Para logit y probit, el R^2 es el pseudo-R^2 de McFadden

CONCLUSIONES

Contamos con una población del 54% del género masculino y el 46% del género masculino. De los cuales ambos tienen un ingreso promedio mensual de $11,313.55797. Ellos se encuentran con un trabajo y tienen en su hogar por mayoría, habitan cuatro personas.
97 personas de la población encuestada conocen la zarzamora, mientras que 41 personas no tienen conocimiento sobre ella. De las cuales 62 personas la consumen y 25 no la consumen.
Los resultados de las encuestas arrojaron que los habitantes de Saltillo prefieren la zarzamora en mermelada, pastel y helado.
La forma de consumo por mayoría es en mermelada, en segundo lugar, en pastel y en tercer lugar en fresco.
Nuestra población encuestada compra $50.00 pesos mensuales en producto, lo equivalente una caja de zarzamora. Donde prefieren comprar en los supermercados.
Los habitantes de Saltillo, Coahuila están dispuestos a pagar $100.00 pesos mensuales por una caja de zarzamora de 120gr.
Los valores registrados indican que prefieren 293 veces la zarzamora a cualquier otra fruta.

BIBLIOGRAFIA

Libros

Hal R. Varian, A. B. (2010). *Un Enfoque Actual. Micro Economía Intermedia.* (H. R. Varian & A. Bosch, Eds.) (8va.). Estados Unidos: W.W. Norton & Company, Inc.

Naresh K. Malhotra. (2008). *No Title*. (N. K. Malhotra, Ed.) (Quinta). México: Pearson Prentice Hall.

CARACTERIZACIÓN DE LA MADURACIÓN DE JITOMATES, MANGOS Y PLÁTANOS MEDIANTE COLORIMETRÍA.

Vélez Ramírez Andrea Elizabeth[3] y Ramírez Granados Juan Carlos[4]

RESUMEN

Las características organolépticas de las frutas y verduras cambian según la etapa de maduración. Durante este proceso natural existen transformaciones en su textura, aroma, sabor y color. En esta investigación, se analiza el cambio del color externo de mangos manila, plátanos tabasco y jitomates saladette durante su maduración. Se utilizó una técnica de medición del color basada en el espacio *CIELAB.* En este estudio se demuestra que es posible determinar visualmente el grado de maduración en algunas frutas y verduras a través de su color superficial. Para este propósito, se generaron patrones de etiquetas con colores característicos de las principales etapas de maduración. Las etiquetas pueden ser adheridas a cada fruta o verdura para comparar su color y determinar si está inmadura, madura o en la senescencia, facilitando al consumidor el proceso de selección.

ABSTRACT

The organoleptic characteristics of fruits and vegetables change according to their level of ripeness. There are transformations during this natural process in texture, smell, taste and color. In this investigation, the change of external color of mangos, bananas and tomatoes is analyzed during their ripeness. The technique used to measure color is based on the *CIELAB* space. This study shows that it is possible to visually determine the grade of ripeness of some fruits and vegetables through its surface color. For this purpose, patterns of labels were created with the colors of the main stages of ripeness. The labels may be adhered to each fruit or vegetable to compare its color, and to determine if it is immature, mature or in the senescence, making the selection process easier for the consumer.

Palabras clave: Maduración, frutas y verduras, colorimetría.

INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y verduras ha disminuido, ya sea por economía, practicidad, disponibilidad o por la presencia de alimentos procesados en el mercado. Las nuevas generaciones no crecen con el hábito del consumo adecuado de estos alimentos, y por ende presentan una deficiencia vitamínica. Por otra parte, el consumo suficiente de frutas y verduras es importante ya que la ingesta inadecuada de estos alimentos es una de las principales causas de patologías como la diabetes, cánceres gastrointestinales, cardiopatías isquémicas y accidentes cerebrovasculares. (OMS, 2013)
Durante la maduración, los frutos sufren una sucesión de importantes cambios bioquímicos y fisiológicos que conducen al logro de las características sensoriales óptimas para su consumo. Generalmente, las características más importantes son el tamaño del fruto, forma, color de la superficie, color de fondo, firmeza, contenido de sólidos solubles, acidez, relación de sólidos y degradación de almidón. (Susana, 2008)
Factores sociales, técnicos y económicos han hecho que la industria alimentaria enfrente el desafío de buscar nuevas formas de satisfacer las necesidades de los consumidores proporcionándoles productos alimenticios visualmente atractivos, de buen sabor, alta calidad y bajo precio. El color es una de las cualidades sensoriales más importantes de los alimentos. Los consumidores usualmente asocian el color de los alimentos con su sabor y aroma. Por lo tanto, el color es un factor de calidad crítico. (Collins, 2000)

[3] UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS. Ciencias de la Salud. Carretera Zacatecas – Guadalajara km 6 ejido "La Escondida" Ciudad Universitaria Campus Siglo XXI C.P. 98160 Zacatecas, Zac.
andreavelez881@gmail.com
[4] UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Prolongación Río Lerma s/n, Colonia Suiza, C.P. 38060 Celaya, Gto.
jcramirez@ugto.mx

A pesar de que muchas personas han adquirido la habilidad de escoger correctamente las frutas y verduras maduras, hay quienes por falta de experiencia no saben cómo escoger una fruta o verdura en su punto óptimo para consumo, por lo que se requieren estrategias y herramientas que faciliten esta actividad.

Nosotros consideramos que es posible determinar el grado de maduración de las frutas y verduras a través de su coloración externa. Es por esto que el objetivo de este estudio es darle al consumidor una herramienta que le facilite saber si un fruto está maduro, inmaduro o en la senescencia; así como también el número de días que le faltan para madurar, o por cuantos días se puede considerar en un estado óptimo sin que haya comenzado el proceso de putrefacción. Para lograr lo anterior, se midió el color externo de los frutos durante un determinado periodo desde que estaban inmaduros hasta que comenzó su senescencia. También se midió la temperatura y la humedad relativa del lugar donde estuvieron almacenados como referencia de las condiciones ambientales a las que estuvieron expuestas las frutas y verduras utilizadas en este estudio. Esto podría favorecer al productor y consumidor, ya que existirían menos frutos desperdiciados, y se garantizaría la selección y consumo de alimentos en óptimas condiciones para aprovechar mejor sus nutrientes.

MARCO TEÓRICO

La madurez fisiológica es el proceso mediante el cual un fruto se forma, se desarrolla y crece a partir de una planta o árbol. Un fruto luego de ser cosechado continúa madurando hasta lograr el sabor, aroma y otras características propias. La madurez organoléptica de un fruto es el estado de desarrollo en que la fruta reúne las características deseables para su consumo tales como su color, sabor, aroma, textura, y composición interna. (Agro, 2012)

Uno de los 4 parámetros principales de la maduración organoléptica es el color externo del fruto. Este parámetro es una consecuencia de las reacciones químicas que se producen en los alimentos tras someterlos a algún proceso. Muchas de las variaciones de color son normales y no afectan a la inocuidad; sin embargo, en ocasiones el color o las manchas pueden ser una señal de deterioro. (Chavarrías, 2016) Cuando se trata de alimentos, el color y la apariencia son las impresiones más importantes, incluso antes de que el sentido olfativo se despierte con un aroma agradable. En el mundo actual, para los productos detrás de un cristal, refrigerados, congelados, en cajas, secos, empacados sin ventilación y envueltos en plástico, la apariencia es mucho más importante que su aroma. (Minolta, 2018)

En este trabajo se utilizó el color superficial de la fruta para estudiar su proceso de maduración, ya que es de mejor comprensión y puede ser más sencillo de utilizar en comparación con otras características sensoriales. Para esto, se utilizó una teoría para la representación del color.

La colorimetría es una técnica que describe y cuantifica el color de los objetos mediante la medición de componentes o coordenadas cromáticas cuya combinación lineal da origen a todos los colores percibidos por el ojo humano. Esta medición del color proporciona los valores de tres componentes que están presentes en la luz reflejada o transmitida por un producto alimenticio. (Minolta, 2018)

Un espacio de color es un sistema de interpretación del color, es decir, una organización específica de los colores en una imagen. Las representaciones de color dependen del modelo y de los objetos que lo poseen. Un espacio de color puede ser arbitrario, con colores particulares asignados según un sistema y estructurados matemáticamente.

El espacio de color *L*a*b**, también referido como *CIELAB*, es actualmente uno de los espacios de color más populares para evaluar el color de un objeto. Este espacio de color es ampliamente usado porque correlaciona los valores numéricos del color de manera muy similar a la percepción visual humana. Investigadores y productores lo usan para evaluar los atributos de color, identificar inconsistencias y expresar sus mediciones a otras personas en términos numéricos. En el espacio de color *L*a*b**, el eje *L** es el de luminosidad, y va de negro a blanco. Los otros dos ejes son las coordenadas cromáticas *a* y b**, y representan el contenido de colores complementarios verde–rojo, y azul–amarillo, respectivamente. (Minolta, 2014)

MÉTODOS Y MATERIALES

Se seleccionaron aleatoriamente 20 ejemplares de mango manila, 20 de plátano tabasco y otros 20 de jitomate saladette. Estos ejemplares fueron recién cortados del árbol o planta y estaban inmaduros como se muestran en la figura 1.

Fig. 1. Ejemplares de mangos, plátanos y jitomates empleados en el análisis de su maduración organoléptica mediante colorimetría.

Se aplicó una técnica de lavado con agua y jabón a cada fruto para retirar el polvo o cualquier suciedad y asegurar que no afectaran su maduración y a la medición de su color externo. Cada fruto fue acomodado de tal manera que no estuviera apilado y que no se tocara con otros especímenes como se muestra en la figura 1. Las frutas y verduras utilizadas fueron cubiertas con una tela de tul para evitar el paso de insectos y al mismo tiempo permitir la adecuada ventilación de los ejemplares.

Para las mediciones de colorimetría se utilizó un colorímetro de precisión modelo *AMT5001U* el cual puede proporcionar las coordenadas cromáticas en el espacio *CIELAB*. Diariamente a cada ejemplar se le hicieron 10 mediciones en diferentes partes de su superficie, y se calculó un color promedio del ejemplar. Después se recopiló en una base de datos esta medición promedio y se repitió el procedimiento con los 20 ejemplares de cada tipo de fruta o verdura. Luego, en cada día de medición se calculó el color promedio de los 20 ejemplares de cada tipo de fruta o verdura. Este procedimiento se hizo durante 16 días para los mangos y jitomates, y durante 13 días para los plátanos ya que su proceso de maduración fue más rápido.

Durante los periodos de análisis, también se midió la temperatura del lugar donde los ejemplares fueron almacenados; así como la humedad relativa del aire con la ayuda de un termómetro e higrómetro. Además, se tuvo especial cuidado en que la luz solar no irradiara directamente a las frutas y verduras para que tampoco interfiriera con el proceso de maduración. Una vez recopilados los datos, se hizo un análisis estadístico del cambio de color como función del tiempo durante el periodo de medición. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

RESULTADOS

Las mediciones de color representan variaciones en el proceso de maduración de cada tipo de fruta o verdura. Aquí se analizó el comportamiento del color superficial de los ejemplares y los días en que se pueden considerar en su punto óptimo para consumo. Aunque se obtuvieron mediciones del parámetro *L**, el cual indica el contenido de blanco o negro, no se incluyeron en estos resultados puesto que las frutas y verduras que se utilizaron en esta investigación no tienen tendencia hacia esas tonalidades. Por otra parte, la coloración verde en los frutos después de ser cosechados se debe al alto contenido de clorofilas, mismas que durante la maduración se descomponen y dan paso a otras sustancias y pigmentos naturales que proporcionan el color final a la fruta o verdura madura. Por ejemplo, en el caso del jitomate saladette, la coloración roja del fruto maduro se debe al contenido de licopeno; uno de los pigmentos llamados carotenoides. El licopeno es una sustancia química eficaz en la prevención de cardiopatías; así como, para prevenir diferentes tipos de cáncer. (Plus, 2018)

Con respecto a la humedad relativa del aire del lugar donde las frutas y verduras fueron almacenadas para su estudio, se observó que se mantuvo entre el 50% y el 55%; mientras que la temperatura máxima osciló entre los 23°C y los 27°C. Estos valores de humedad relativa y temperatura son característicos de la temporada de lluvias en verano.

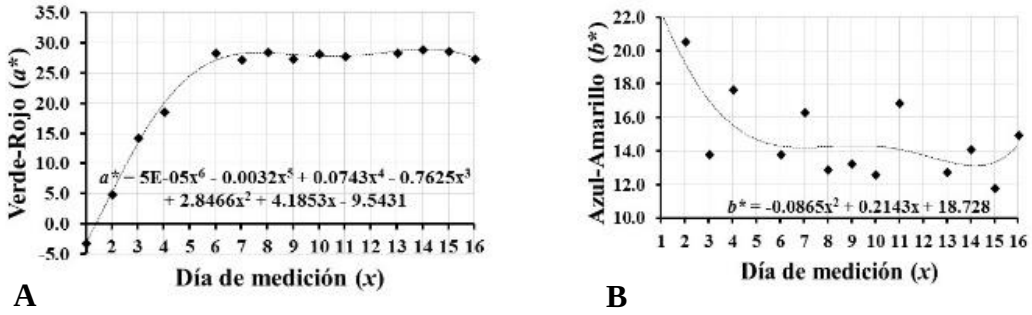


Fig. 2. Evolución de las coordenadas cromáticas a* y b* durante la maduración de jitomates saladette.

En la parte A de la figura 2 se puede observar la tendencia de coloración verde a rojo en los jitomates saladette. En el día 1, los jitomates eran verde puesto que la coordenada *a** tenía valores negativos. A partir del día 6 la coloración llegó a su punto máximo de rojo y se mantuvo hasta su último día de medición sin cambiar significativamente. En la parte B se observa que la tonalidad inicial es amarilla y va disminuyendo con el paso del tiempo. Basándonos en estas gráficas, su día óptimo de maduración fue el sexto, por lo cual podrían ser consumidos preferentemente entre los días 6 y 9.

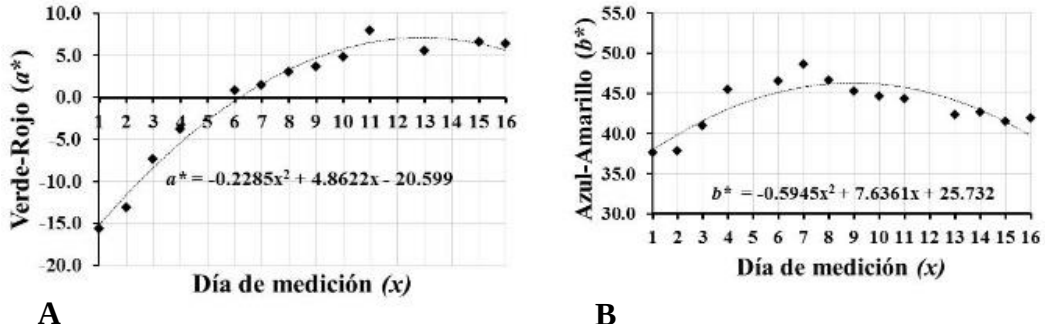


Fig. 3. Evolución de las coordenadas cromáticas a* y b* durante la maduración de mangos manila.

En la parte A de la figura 3 se puede observar que la coloración verde de los mangos manila disminuyó desde el primer día de medición hasta el día 6 donde empieza a tener valores positivos que corresponden a tonos rojizos. En la parte B podemos observar una tendencia hacia el color amarillo que alcanza su punto máximo en el día 7 y a partir de ahí la coloración amarilla disminuye ligeramente. Basándonos en este resultado se puede decir que entre los días 6 y 9 podrían ser consumidos en su estado óptimo de maduración.

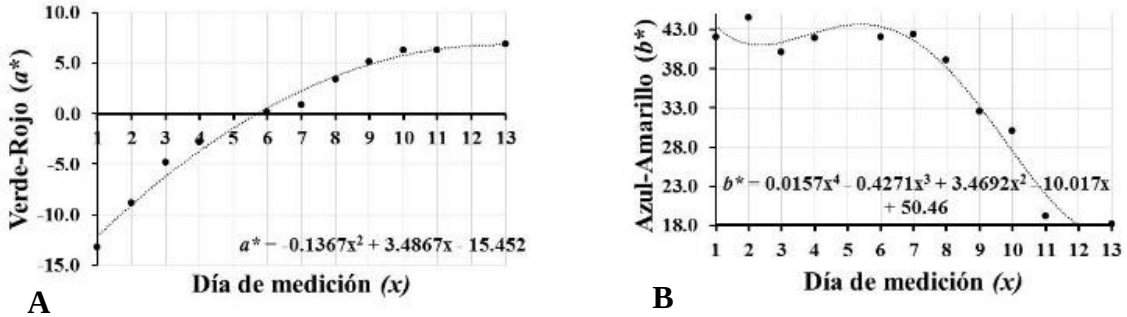


Fig. 4. Evolución de las coordenadas cromáticas a* y b* durante la maduración de plátanos tabasco.

En la parte A de la figura 4 se observa que al igual que el mango, el plátano mantuvo una tonalidad verde hasta el día 6, a partir de ahí su coloración va hacia la escala de rojos. En la parte B se puede observar que la tonalidad de amarillo se mantiene del día 1 hasta el 7, luego va descendiendo a una tonalidad menos amarilla. Su día óptimo de maduración fue el sexto, por lo cual, el periodo de consumo preferente fue del día 6 al 9.

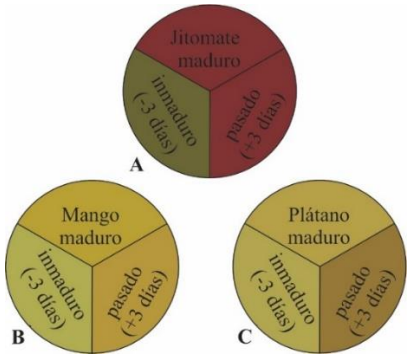


Fig. 5. Patrones de etiquetas colorimétricas para determinar el grado de maduración de jitomates saladette (a), mangos manila (b) y plátanos tabasco (c).

La figura 5 muestra los patrones para etiquetas que fueron generados con los colores característicos de las diferentes etapas del proceso de maduración en jitomates, mangos y plátanos. Estos patrones de etiquetas son las herramientas que ayudarían al consumidor a escoger adecuadamente un fruto en su estado óptimo para consumo. Las etiquetas podrían pegarse a cada fruto para que a través de una comparación visual y lado a lado ayuden al consumidor a determinar si el fruto está maduro, inmaduro o pasado; así como los días antes o después de que éste está maduro.

CONCLUSIONES

La pigmentación verde de las frutas y verduras inmaduras se debe a su contenido de clorofilas, mismas que durante la maduración organoléptica se van degradando dando lugar a otros pigmentos naturales que le dan la coloración específica a cada fruta o verdura madura. Con esta investigación se logró demostrar que es posible establecer una relación cualitativa y cuantitativa entre el grado de maduración de algunas frutas y verduras, y su color superficial. Esta caracterización le permite al consumidor determinar fácilmente si estas frutas o verduras se encuentran en su estado óptimo simplemente comparando los colores en las etiquetas colorimétricas con el color superficial del fruto, facilitando la selección y consumo adecuado de estos alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

AGRO. (14 de diciembre de 2012). *Bioleche Comercial*. Obtenido de https://biolechecomercial.wordpress.com/2012/12/14/maduracion-clases-de-madurez-de-las-frutas-y-sus-cambios-composicionales-en-su-proceso/

CHAVARRÍAS, M. (09 de junio de 2016). *Propiedades organolépticas de los alimentos.* Recuperado el 05 de julio de 2018, de Seguridad Alimentaria: www.consumer.es

COLLINS, D. (2000). Colouring our foods in the last and next millenium. *International Journal of Food Science and Technology* , 5 - 22 .

MINOLTA, K. (2014). Obtenido de http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/

MINOLTA, K. (2018). Recuperado el 2018, de http://sensing.konicaminolta.com.mx/learning-center/case-studies/FoodIndustryApps.pdf

OMS. (2013). Recuperado el 09 de julio de 2018, de http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index1.html

PLUS, M. (24 de 01 de 2018). *Medline Plus*. Obtenido de https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/554.html

SUSANA. (9 de enero de 2008). *ingenieraagronomasusana.blogspot.com*. Obtenido de ingenieraagronomasusana.blogspot.com

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES Y ESPECIES SILVESTRES DE LA FAMILIA DROSOPHILIDAE DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA

Vera Garcia, Andrea[1] y Riesgo Escovar, Juan R.[2]

RESUMEN

Los Drosophilidae son una *familia de dípteros frecuentemente utilizados en experimentación genética, en particular Drosophila melanogaster*, dado que posee un reducido número de cromosomas, un breve ciclo de vida y, sobre todo, un genoma secuenciado totalmente, muy semejante al del ser humano. Sin embargo se ha estudiado poco la diversidad de Drosophilidos en el centro de la República. De ahí la importancia de conocer la distribución y clasificación de esta familia en el centro de la República Mexicana, específicamente en el estado de Querétaro. Para poder llevar a cabo esta tarea se hizo uso de técnicas de biología molecular como la extracción de DNA.

ABSTRACT

The Drosophilidae is a *family of dipterans insects commonly used in genetic experimentation, particularly Drosophila melanogaster*, because it has a small number of chromosomes, a short life cycle and, above all, a completely sequenced genome very similar to humans. Regardless, there has been little work done on the diversity of Drosophilidae in central Mexico. Hence the importance of knowing the distribution and classification of this family in the center of the Mexican Republic, specifically in the state of Queretaro. In order to carry out this task, molecular biology techniques, such as DNA purification, were used.
Palabras clave: Amplicon, cebador, polimerasa

INTRODUCCIÓN

La Drosophilidae es una familia muy grande de moscas acaliptratas perteneciente a la superfamilia Ephydroidea, cuya distribución es mundial. (Markow, T. et al.; 2006) En la actualidad, la familia Drosophilidae abarca 3 952 especies distribuidas en 73 géneros, con dos subfamilias: Drosophilinae y y Steganinae (Gottschalk, M. et al., 2008) Los reportes muestran que se tienen alrededor de 120 especies de Drosophilidae en México, registrados principalmente en la Sierra Madre Oriental, la franja volcánica Transmexicana (Patterson, J. et al., 1944) y los desiertos de Sonora y Baja California. (Richmond, M. et al., 2012)

Todos los drosophílidos llevan a cabo el mismo programa de desarrollo: embriogénesis dentro del huevo, tres estadios larvarios, un periodo de pupa de al menos cuatro días y finalmente el imago o adulto. Su ciclo de vida holometábolo les permite vivir en dos tipos de hábitats distintos a lo largo de su vida. Durante el periodo larvario habitan sustratos blandos como tejidos vegetales o frutales, materia orgánica en descomposición, hongos, flores, en algunos insectos o en sus fluidos. En la etapa adulta, su capacidad de vuelo les permite buscar alimento, el cual es el mismo tipo de sustrato en el que se desarrollaron las larvas. (Powell, J., 1997)

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de moscas fueron colectadas del 11/Junio/2018 al 19/Junio/2018 dentro del campus de la UNAM en Juriquilla. Para ello se utilizó un método tradicional, que consistió en cuatro botellas de PET que contenían aproximadamente un plátano maduro machacado cada una, con todo y cáscara, un poco de levadura de pan, ramas de algún árbol (para que las moscas puedan pararse dentro de la trampa), y una cantidad mínima de agua para impedir que las moscas pudieran ahogarse. A las botellas se le hizo una ranura para que por ahí pudieran entrar las moscas y se colocaron a la sombra de un árbol. (Markow, T. et al., 2006)

[1] Instituto Tecnológico Nacional de México en Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica; Antonio García Cubas, FOVISSSTE, C.P:38010, Celaya, Guanajuato, andreavera1697@gmail.com
[2] Instituto de Neurobiología-UNAM, Boulevard Juriquilla 3001, C.P:76230, Santiago de Querétaro, Querétaro, riesgo@unam.mx

Protocolos utilizados

Purificación de DNA Genómico

Preparación de buffer (100 µl): A un tubo Eppendorf agregar 12 µl EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) [0.5M], 1.6 µl NaCl [5 M], 2.5 µl SDS (laurilsulfato sódico) [20%], 1.25 µl Tris (Tris hidroximetil aminometano) pH 8 [2 M], 5 µl Tris pH 9.2 [2 M], 0.005 g de sacarosa y aforar a 100 µl con agua desionizada.

Anestesiar moscas, usando CO_2, para tomar las necesarias (5 moscas) y machacar, después agregar 50 µl de buffer. Incubar mezcla a 68°C por 30 minutos, centrifugar 1 minuto y transferir sobrenadante a otro tubo para después agregar 30 µl acetato de potasio [8 M]. Dejar a 4 °C por 24 horas, agregar 2.5 veces el volumen de etanol [100%], y centrifugar a 14000 RPM por 8 minutos, decantar y agregar 200 µl de buffer TE (Tris-EDTA), añadir fenol y agitar. Centrifugar a 14000 RPM por 10 minutos, transferir sobrenadante a otro tubo y agregar 2.5 veces el volumen de etanol [100%], agregar 15 µl de acetato de potasio y volver a centrifugar a 14000 RPM por 10 minutos, después decantar y agregar 250 µl de etanol [70%]. Centrifugar a 14000 RPM por 10 minutos, decantar y agregar 20 µl de TE y suspender.

Hacer digestión al DNA obtenido, para esto tomar 5 µl de solución de DNA obtenida y ponerla en un tubo Eppendorf y agregar 2 µl de buffer de enzima de restricción, 0.5 µl de enzima de restricción (EcoR1) y aforar a 20 µl con agua desionizada, después centrifugar mezcla para homogenizar e incubar a 37°C por 1 hora.

Realizar electroforesis a la digestión para separar por tamaño el DNA con ayuda de un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. El gel se coloca dentro de una cámara de electroforesis y en él se carga un marcador de peso molecular y la muestra de DNA que se desea separar en carriles independientes.

Después, hacer la electroforesis en buffer TAE a 100 V por aproximadamente 30-40 minutos, y por último, colocar gel dentro de una cámara de luz UV para observar las bandas obtenidas.

Homogenado crudo para amplificar DNA por PCR

Preparación de 1 ml buffer Squishing (SB): A un tubo Eppendorf agregar 10 µl de solución Tris [1 M], 2 µl de EDTA [0.5 M], 5µl de NaCl [5 M], 10 µl de Tritón [10%] y aforar a 1 ml con agua desionizada.

Anestesiar 1 mosca, usando CO_2, y machacar, después agregar 50 µl de buffer SB y 0.5 µl de proteinasa. Incubar a 60°C por 30 minutos y después a 95°C por 2 minutos. Centrifugar 15 segundos.

Para preparación de PCR: Agregar en un tubo especial para PCR 3 µl de solución de DNA, 1 µl de cada uno de los cebadores, 10 µl de buffer 2X, 0.25 µl de polimerasa Phire y aforar a 20 µl con agua para PCR., centrifugar 15 s y meter en un termociclador siguiendo las siguientes condiciones:

Desnaturalización: 95 °C por 3 minutos, y

ciclos de 98 °C por 10 s.

Alineación: 55 °C por 10 s.

Extensión: 72 °C por 15 s con 40 ciclos totales

Correr una muestra en una electroforesis, como está descrito arriba, y analizar bandas obtenidas.

Después de corroborar que se hizo correctamente la extracción de DNA, se utilizó el mismo protocolo de homogenado crudo para amplificar DNA por PCR, pero ahora utilizando cebadores CO1 (Citocromo oxidasa 1, gen universal mitocondrial) y cambiando las condiciones para la realización de PCR:

Desnaturalización: 95 °C por 3 minutos, y

Ciclos de 98 °C por 10 s.

Alineación: 55 °C por 20 s.

Extensión: 72 °C por 1 minuto por 40 ciclos totales.

Primeramente, se realizó la extracción de DNA y PCR de los machos, después se cortaron las bandas obtenidas y guardaron a 4 °C, para posteriormente hacer la secuenciación de dichas bandas y conocer la secuencia, que es específica para cada especie, para de esta forma determinar su especie.

RESULTADOS

Figura 1. Moscas machos del grupo etiquetados como 1, 2 y 3

Figura 2. Amplicones producto del PCR vistos en cámara de luz UV de moscas 1, 2 y 3 respectivamente

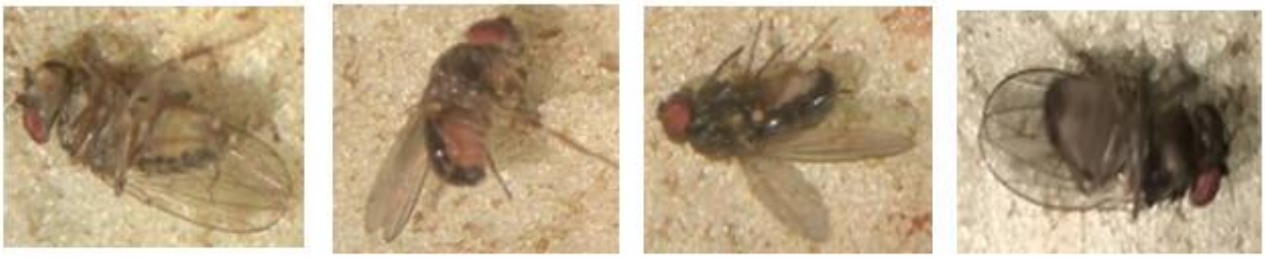


Figura 3. Moscas machos del grupo etiquetadas como 4, 5, 6 y 7

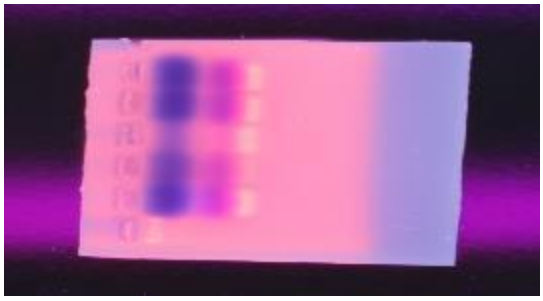


Figura 4. Amplicones producto del PCR vistas en cámara de luz UV de moscas 4, 5, 5, 6 y 7 respectivamente

Figura 5. Mosca macho del grupo etiquetada como 8

Figura 6. Amplicon producto del PCR visto en cámara de luz UV de mosca 8

Figura 7. Moscas machos del grupo etiquetadas como 9, 10, 11, 12 y 13

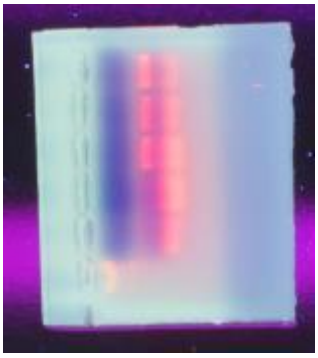


Figura 8. Amplicones producto del PCR visto en cámara de luz UV de moscas 9, 10, 11, 12 y 13

Figura 9. Moscas machos del grupo etiquetadas como 14, 15, 16 y 17

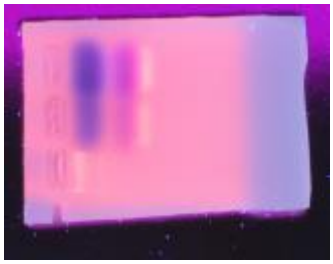


Figura 10. Amplicones producto del PCR visto en cámara de luz UV de moscas 15 y 16

Debido a la falta de reactivos no se pudo realizar la secuenciación de las bandas que se obtuvieron para, de esta forma, determinar la especie a la que pertenecen las moscas recolectadas. Por esta razón, solamente se realizó la clasificación taxonómica según la guía "The Drosophilidae of Mexico" de Patterson J. T. & Mainland, G. B., encontrando las siguientes especies:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de especies	
Drosophila victoria	Drosophila mulleri
Drosophila mojavensis	Drosophila simulans
Drosophila melanissima	Zaprionus indianus

CONCLUSIÓN

Este trabajo contribuye al conociiento de la diversidad y riqueza de Drosphilidae en las zonas en las que anteriormente no se tenían registro, como es el caso del estado de Querétaro. Esto permitirá en un futuro poder realizar comparaciones entre las mismas especies que se encuentren distribuidas en diferentes regiones del país.

BIBLIOGRAFÍA

Gottschalk M.; Hofmann P. & Valente V. (2008) Diptera, Drosophilidae: historical occurrence in Brazil. Check List. 4(4), 485-518.

Markow, T. & O´Grady, P. (2006) Drosophila: A guide to species identification and use. Londres, Inglaterra: Academic Press.

Patterson, J. & Mainland, G. (1944) The Drosophilidae of Mexico. Latin American Edition. University of Texas. Public. No. 4445

Powell, J. (1997) Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila model. Oxford University press. Nueva york, Estados Unidos.

Richmond, M.; Johnson, S. & Markow, T. (2012) Evolution of reprodutive morphology among recently diverged taxa in the Drosophila mojavensis species cluster. Ecology and Evolution, 2: 397-408.

SUSCEPTIBILIDAD DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS A IVERMECTINA AL 1.2%

Aylín Elena Jaime Hernández[1], Oscar Guadalupe Barrón Bravo[2] y Cesar Andrés Ángel Sahagún[2]

RESUMEN

Los antihelmínticos son utilizados para eliminar parásitos de los rumiantes. De la ivermectina se excreta el 98% en las heces de un animal y permanece en el medio ambiente, mayormente en el suelo. Debido a que los nematodos entomopatógenos son habitantes del suelo, son un indicador del bienestar. El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad de los NEP a la ivermectina al 1.2%. Los bioensayos consistieron en colocar de 200 µL de NEP (aproximadamente 50 nematodos) y fueron expuestos a tres diferentes tratamientos, el primero con ivermectina al 1.2%, el segundo con dimetilsulfóxido al 5% y el tercero solo con agua destilada. La susceptibilidad de las diferentes cepas de NEP fue mayor a 48.26% y menor a 92.13.

ABSTRACT

Anthelmintics are used to kill parasites of ruminants. Of ivermectin the 98% is excreted in the feces of an animal and remains in the environment, mostly on the ground. Due to the fact that the entomopathogenic nematodes are inhabitants of the soil, are an indicator of well-being. The objective of this study was to evaluate the susceptibility of the NEP to ivermectin to 1.2%. The bioassays consisted in place of 200 µL of NEP (approximately 50 nematodes) and were exposed to three different treatments, the first with ivermectin to 1.2%, the second with dimethyl sulfoxide to 5% and third party only with distilled water. The susceptibility of different strains of NEP was greater than 48.26% and less than 92.13.

Palabras Clave: antihelmínticos, control biológico, productos químicos.

INTRODUCCIÓN

Los antihelmínticos son los fármacos que se utilizan para la eliminación de los nematodos parásitos mayormente en rumiantes. Dentro de las lactonas macrocíclicas podemos encontrar distintos fármacos, los cuales son abamectina, doramectina y moxidectina, entre otros (Márquez, 2003).

La ivermectina es uno de los antihelmínticos más utilizados debido a su amplio espectro y duración contra diferentes especies de helmintos y ectoparásitos (Idika *et al*., 2017). Para el uso adecuado de la ivermectina se debe considerar la especie, el peso corporal, el estado fisiológico y otros aspectos para poder obtener una eficacia adecuada del fármaco el cual actúa sobre las formas larvarias así como sobre los adultos de los distintos parásitos (González-Canga *et al.*, 2009).

Más del 98% de ivermectina es excretada en las heces, aunque el porcentaje se altera dependiendo el modo de aplicación, la excreción de este fármaco puede llegar a afectar el medio ambiente ya que las heces permanecen en el suelo o en algunos cuerpos de agua a los cuales el fármaco es arrastrado (Beynon, 2012). El suelo es el factor más importante para la agricultura, además de ser la mayor parte de los ecosistemas que se necesitan para el bienestar humano. Para verificar el bienestar del suelo se pueden utilizar varios indicadores, entre estos esta la cantidad de nematodos encontrados en este, los nematodos tienen gran relevancia debido a que su ciclo de vida es más largo que el de los microbios metabólicamente activos, las poblaciones de los nematodos tienden a ser más estables y debido al conocimiento de su taxonomía además de que tienen un papel importante en los procesos ecológicos del suelo (Sánchez-Moreno y Talavera, 2013).

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae de nematodos entomopatógenos (NEP) son las más utilizadas como control biológico, ya que al utilizar los NEP se puede disminuir el uso de insecticidas y plaguicidas. Los NEP en su etapa infectiva utilizan como hospedadores a una gran gama de insectos en estado larvario provocando en sus hospedadores la muerte (Rodríguez *et al*., 2012), con la ayuda de bacterias específicas Gram-, con las que trabajan de manera simbiótica, las cuales son *Xenorhabdus* en la familia Steinernematidae y *Photorhabdus* la familia Heterorhabditidae (López-Llano y Soto-Giraldo, 2016).

El ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos presenta ocho estadios los cuales constan de: huevo, J1, J2, J3, J4 (separados todos por mudas), adultos hermafroditas, machos y hembras. En J1 son transparentes, sus movimientos son lentos y se alimentan, 10 horas después pasan a ser J2 los cuales son solo parcialmente transparentes, aproximadamente a las 144 horas pasan a J3, pero si en el hospedero no hay suficientes nutrientes estos salen con las

células bacterianas e infecta a un nuevo hospedero, si un J3 no sale mudara a J4 a las 168 horas, los adultos hembras y machos aparecerán a las 185 horas (Sáenz y López, 2011).

Sanderson *et al.* (2007) realizaron una investigación durante 265 días con distintas concentraciones de ivermectina y en ambientes acuáticos al aire libre, en este se demostró que los residuos de ivermectina seguían presentes después de los 229 días del tratamiento. En otro estudio realizado por Prasse *et al.* (2009), evaluaron la ivermectina en el agua, en este los resultados arrojaron que el 31.3% de la ivermectina aplicada inicialmente en el tratamiento se transformó hasta los 188 días, además de que con esta también se encontraron muchos otros productos de transformación.

Los nematodos gastrointestinales son las mayores limitantes en la producción pecuaria, para combatir las infestaciones de estos los ganaderos utilizan los antihelmínticos como desparasitantes generales en todo el ganado. Estos cumplen su función adecuadamente cuando el uso de estos es racional, mientras que si el uso no es moderado puede llegar a provocar estragos, en la microfauna encontrada en el suelo (Toro *et al.,* 2014). Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de los NEP a la ivermectina al 1.2%.

METODOLOGÍA

Este estudio se realizó en el laboratorio de parasitología y control biológico (LPCB-UG) de la Universidad de Guanajuato. Se seleccionaron tres muestras de NEP que pertenecen al LPCB-UG (M13, M18 y M40) todas obtenidas de suelos pecuarios de León e Irapuato, Guanajuato.

La reproducción de los NEP, se realizó en larvas de *Galleria mellonella* sobre cajas Petri de 100 x 15 mm, con papel filtro humedecido con agua estéril, cuando se logró observar juveniles infectivos dejando el cadáver se colocó la larva en una trampa de White. Después de 24 horas en la trampa de White se colectaron infectivos juveniles del líquido para para nuevamente colocarlos en una caja de Petri con papel filtro, agua estéril y nuevos insectos trampa para cerrar el ciclo de vida. Además en trampa de White se pueden almacenar en una placa de pozos y llevar a cabo un bioensayo.

Al iniciar un bioensayo se determinó la concentración de nematodos a utilizar, para esto se realizó un conteo previo en el microscopio estereoscópico de 200 µL, para verificar que la muestra tuviera un aproximado de 50 nematodos por pozo en la placa, en caso de ser necesario se diluyó la muestra. Para determinar la concentración de ivermectina se consideró una dosis más alta que la comercial más común (1%), que es al 1.2% y se diluyó en dimetilsulfóxido al 5% (DMSO).

Para realizar los bioensayos los NEP se distribuyeron en una placa de pozos con 24 pozos, se realizó un conteo en cada pozo y posteriormente se procedió a colocar los diferentes tratamientos en cada pozo los cuales consistían de ivermectina al 1.2 % diluida con dimetilsulfóxido al 5% (tratamiento 1), dimetilsulfóxido al 5% (tratamiento 2) y agua destilada (tratamiento 3). Se consideraron dos testigos el primero solo con agua (testigo negativo) y el segundo con la solución de dimetilsulfóxido al 5% (testigo positivo). El volumen que se obtuvo en cada pozo fue de 1200 µL, teniendo en total 3 tratamientos con cuatro repeticiones cada uno. Con cada tratamiento se utilizaron las tres muestras de NEP (M13, M40 y M18)

Para verificar la mortalidad de nematodos se incubaron a 25±1°C por 24 horas, en completa obscuridad. Posteriormente se realizó un conteo de NEP vivos y muertos por cada pozo y se pasó el contenido total a una nueva placa con filtros de polipropileno de 25 µm, para realizar la prueba de inhibición de la migración larvaria y separar los NEP muertos (con falta de motilidad) de los vivos. La nueva placa se incubó a 25±1°C por 24 horas en completa oscuridad. Posteriormente se retiraron los filtros y se realizó el conteo de los NEP vivos y muertos.

Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos con la fórmula de Sun-Shepard´s posteriormente se realizó un análisis de varianza en el cual se utilizó un diseño de bloques al azar (Factor A: tratamiento, Factor B: muestra de nematodo y Factor C: tiempo de realizada la inoculación), y la prueba de Tukey con el programa estadístico Statgraphics 16.1.18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las condiciones en que se realizó el presente estudio se demostró que los NEP fueron susceptibles a la ivermectina al 1.2%, en la prueba de inhibición de la migración larvaria y en la prueba de motilidad. Los porcentajes de susceptibilidad variaron de 0 a 92.13%; los mayores porcentajes con todas las cepas de NEP se observaron en el tratamiento 1 (IVM 1.2%) a las 48 horas (Tabla 1).

Se observó una susceptibilidad menor en la muestra M40 de 48.26% a las 24 horas en el tratamiento con ivermectina, mientras en el tratamiento 2 (DMSO 5%) se obtuvo una susceptibilidad de 36.77% para M13 a las 24 horas. La

susceptibilidad más alta se encontró en el tratamiento con ivermectina con un 92.13% en M18 a las 48 horas. Para el tratamiento con DMSO al 5% en la muestra M18 se obtuvo la mortalidad mayor de 71.38% a las 48 horas.

DMSO: dimetilsulfóxido; IVM: ivermectina; ±: desviación estándar; h: horas. Literales diferentes por columnas y por línea son estadísticamente diferentes (P>0.05).

Tabla 1. Porcentajes de susceptibilidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos pecuarios a ivermectina al 1.2% y dimetilsulfóxido al 5%.

TRATAMIENTO	M13 *a*		M40 *a*		M18 *a*	
	24h *b*	48h *a*	24h *b*	48h *a*	24h *b*	48h *a*
H_2O/DMSO/IVM1.2% *a*	67.36±6.33	83.73±11.75	48.26±5.78	75.56±19.25	60.00±10.07	92.13±3.61
H_2O/DMSO 5% *b*	36.77±5.05	55.75±12.99	43.20±3.10	55.90±20.04	53.05±7.79	71.38±3.01
H_2O *c*	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

En los análisis estadísticos el análisis de varianza demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos (P>0.05). Con el tiempo se encontró una diferencia estadísticamente significativa y la prueba de Tukey formo dos grupos correspondientes a las evaluaciones de 24 y 48 horas, de estos el porcentaje de susceptibilidad fue más elevado para las 48 horas (P>0.05). Respecto a la muestra de nematodo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas y la prueba de Tukey formó un solo grupo con las muestras utilizadas. Respecto a los diferentes tratamientos el análisis estadístico encontró una diferencia estadísticamente significativa y la prueba de Tukey formó tres grupos distintos en los cuales el que obtuvo mayor porcentaje de susceptibilidad fue el tratamiento que constó de IVM 1.2%, el segundo se formó con el tratamiento de DMSO 5% y el tercer grupo fue para el tratamiento de H2O (testigo).

Por su parte Evans *et al.* (2017), obtuvieron una susceptibilidad menor al 10% después de un conteo de 48 horas en larvas del nematodo parásito *Dirofilaria immitis* al utilizar la prueba de inhibición de la migración larvaria con ivermectina, estos resultados fueron considerablemente más bajos que los obtenidos en el presente estudio, esto pudo ser debido a que en este estudio el nematodo utilizado es entomopatógeno y en teoría ha presentado mayor exposición al desparasitante en el suelo y le ha permito desarrollar resistencia. Mientras que Demeler *et al.* (2010) obtuvieron un resultado de 15% de susceptibilidad en nematodos gastrointestinales de rumiantes al utilizar la prueba de inhibición de migración larvaria utilizando la ivermectina, esto puede ser debido a que como en el estudio anterior se utilizaron nematodos parásitos y estos probablemente han presentado mayor resistencia al producto desparasitante.

CONCLUSIONES

Los nematodos entomopatógenos utilizados en el presente estudio son susceptibles a la ivermectina al 1.2%.

BIBLIOGRAFÍA

EVANS, C., MOORHEAD, A., STOREY, B., BLAGBURN, B., WOLSTENHOLME, A. y KAPLAN, R. (2017). "Evaluation of the larval migration inhibition assay for detecting macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*" en *Veterinary Parasitology*, Vol. 246, [pp. 71-86].

TORO, A., RUBILAR, L., PALMA, C. y PÉREZ, R. (2014). "Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol" en *Austral journal of veterinary*, Vol. 46, [pp. 247-252].

BEYNON, S. (2012). "Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep" en *Veterinary Parasitology*, Vol. 189, [pp. 113– 124].

IDIKAA, I., NWAUZOIJEA, H., UJUB, C., UGWUOKEB, C. y EZEOKONKWOA, R. (2017) "Efficacy of ivermectin against gastrointestinal nematodes of pig in Nsukka area of Enugu State, Nigeria" en *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, Vol. 10, [pp. 39–42].

MÁERQUEZ, D. (2003). “Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control” en *Revista corpoica*, Núm. 1, Vol. 4, [pp. 55-71].
PRASSE, C., LÖFFLER, D. y TERNES, T. (2009), “Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system” en *Chemosphere*, Vol. 77 [pp. 1321–1325].
SÁENZ, A. y LÓPEZ, J. (2011). “Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo Heterorhabditis sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae)” en *Revista Colombiana de Entomología*, Núm. 1, Vol. 37, [pp. 43-47].
GONZÁLEZ-CANGA, A., SAHAGÚN-PRIETO, A., DIEZ-LIÉBANA, M., FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, N., SIERRA-VEGA, M. y GARCÍA-VIEITEZ, J. (2009). “The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species” en *The Veterinary Journal*, Vol. 179, [pp. 25–37].
SÁNCHEZ-MORENO, S. y TALAVERA, M. (2013). “Los nematodos como indicadores ambientales en agroecosistemas” en revista científica de ecología y medio ambiente, Núm. 1, Vol. 22, [pp. 50-55]
LÓPEZ-LLANO, R. y SOTO-GIRALDO, A. (2016). “Aislamiento de nematodos entomopatógenos nativos en cultivos de caña panelera y pruebas de patogenicidad sobre *Diatraea saccharalis* (lepidoptera: crambidae)” en *boletín científico del centro de museos*, Núm. 2, Vol. 20, Julio-Diciembre, [pp. 114-123].
RODRÍGUEZ, M., HERNÁNDEZ-OCHANDÍA, D. y GOMEZ, L. (2012). “Nematodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba” en *Protección Vegetal*, Núm. 3, Vol. 27, [pp. 137-146].
SANDERSON, H., LAIRD, B., POPE, L., BRAIN, R., WILSON, C., JOHNSON, D., BRYNING, G., PEREGRINE, A., BOXALL, A. y SOLOMONG, K. (2007). “Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms” en *Aquatic Toxicology*, Vol. 85, [pp. 229-240].

DETECCIÓN POR MÉTODOS MICROBIOLOGICOS DE *Salmonella* spp. EN FRESAS DE IMPORTACIÓN COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO

Anaya Ponce Carlos Alberto[1] y Nava Morales Gerardo Manuel[2]

RESUMEN

En los últimos años han aumentado los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas al consumo de alimentos frescos, como las frutas. La fresa es una fruta altamente apreciada por los consumidores debido a sus excelentes propiedades organolépticas, sin embargo se han visto involucradas en brotes de *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, Hepatitis A y Norovirus, debido a que se encuentran expuestas a contaminaciones por patógenos antes, durante y después de su cosecha. El propósito del presente trabajo fue identificar mediante métodos microbiológicos la presencia y prevalencia de *Salmonella* spp. En fresas de importación proveniente de EE. UU. Comercializadas en la ciudad de Querétaro. Para ello se trataron 40 muestras siguiendo la metodología de la NOM-210-SSA1-2014 utilizando agar Hektoen y XLD que son medios semi-selectivos para la identificación morfológica de *Salmonella*. Se obtuvo que solo 2 muestras de las 40 totales resultaron positivas, lo que significa que existe una prevalencia del 5% de *Salmonella* en fresas de importación, por lo que se pueden considerar un potencial medio de transmisión de enfermedades, lo que sugiere mejorar con urgencia las prácticas agrícolas y de procesamiento que aseguren la inocuidad de las frutas y vegetales, así como la evaluación de la calidad microbiológica de estos productos.

ABSTRACT

In recent years, outbreaks of foodborne diseases have increased in the area of fresh foods, such as fruits. Strawberries are a very popular fruit for consumers because they have been involved in outbreaks of *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, Hepatitis A and Norovirus, because they are exposed to contamination by pathogens before, during and after of your harvest. The purpose of this work was to identify the presence and prevalence of *Salmonella* spp. In strawberries imported from the EE. UU. Marketed in the city of Querétaro. For this, 40 samples were treated following the NOM-210-SSA1-2014 methodology using Hektoen and XLD agar, which are semi-selective media for the morphological identification of *Salmonella*. Two samples of the 40 resulting positive totals were obtained, which means that there is a prevalence of 5% *Salmonella* in the import fields, if it is considered a potential means of disease transmission. The agricultural and processing practices that ensure the safety of fruits and vegetables, as well as the evaluation of the microbiological quality of these products.

Palabras clave: Salmonelosis, Patógeno, Enterobacterias, fresa, importados.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años han aumentado los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) asociadas al consumo de alimentos frescos, como las frutas. En los Estados Unidos, el porcentaje de brotes transmitidos por frutas y verduras ha pasado de menos del 1% en los años setenta a más del 6% en la década de los noventa (Sivapalasingam et al., 2004). En Australia, las frutas y verduras frescas causaron el 4% de los brotes transmitidos por alimentos entre el 2001 y el 2005 (Kirk et al., 2008). Es por ello que las autoridades sanitarias han considerado estas patologías como un problema de salud pública. No obstante, en países subdesarrollados las ETA causadas por la ingesta de frutas y verduras contaminadas cada vez son más frecuentes. Dentro de los principales microorganismos patógenos involucrados en estos brotes están bacterias como *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* spp. Y *Listeria monocytogenes*; siendo *Salmonella* spp. El agente causal de la mayoría de los brotes.

[1] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas, Centro Universitario, C.P:76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, carlos12_ap@gmail.com

[2] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas, Centro Universitario, C.P:76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, gerardomnava@gmail.com

Salmonella se ubica dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, este género prolifera en un promedio de 18 horas y su temperatura óptima de crecimiento es de 32 – 37 ºC pero es capaz de crecer dentro un amplio rango de temperatura que va desde los 8 a 45 ºC y a un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores a 70 °C (Lennette, 1982). La salmonelosis es una infección que se transmite principalmente en la ingesta de alimentos, se estima en Estados Unidos que anualmente *Salmonella* causa 1,2 millones de enfermedades cuyos síntomas son diarreas, fiebre y calambres abdominales, aunque puede ser causada por cualquiera de los más de 2 500 serotipos que se han descrito hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia en México son *S. enteritidis y S. typhimurium.* (CDC, 2018).

La fresa es una fruta no climatérica, altamente apreciada por los consumidores debido a sus excelentes propiedades organolépticas. Estados Unidos es el principal productor mundial y el segundo importador según el valor. Entre 1999 y el 2000, las importaciones de fresa fresca en Estados Unidos crecieron a la tasa promedio anual de 14,9% en valor y de 12,1% en volumen. (Figura 1)

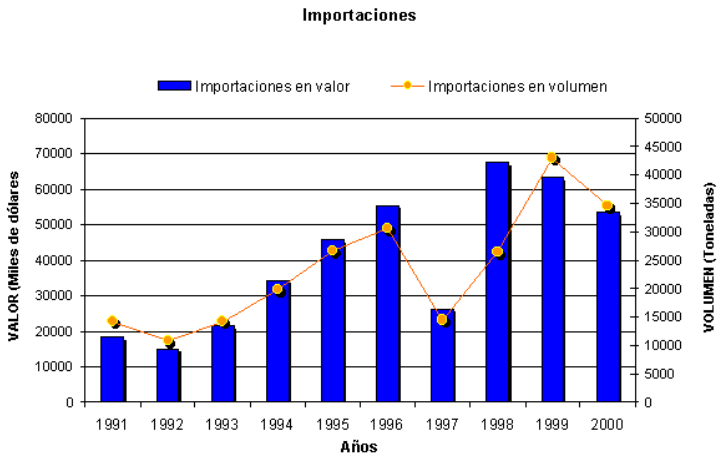


Figura 1. Importancia de la fresa en la economía estadounidense (Corporación Colombiana Internacional, 2002).

Las fresas se han visto involucradas en brotes de *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, Hepatitis A y Norovirus, debido a que se encuentran expuestas a contaminaciones por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha. En la precosecha la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire, y las personas que cuidan las tierras de cultivo son elementos importantes a tomar en consideración. En la pos cosecha destacan la maquinaria y equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos. Es por ello que deben ser buenas las condiciones sanitarias durante el procesamiento y comercialización; además es necesaria la evaluación de la calidad microbiológica de estos productos, a fin de asegurar la inocuidad de los mismos.

El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante métodos microbiológicos la presencia y prevalencia de *Salmonella* spp. En fresas de importación proveniente de EE. UU. Comercializadas en supermercados locales en la ciudad de Querétaro, así como obtener aislados para posteriores análisis moleculares.

MÉTODOS Y MATERIALES

Muestreo

Se compraron fresas frescas bajo las condiciones de ser importadas de EE.UU y estár empaquetadas en cajas plásticas tipo clamshell´s. En total fueron 20 muestras adquiridas en 10 supermercados de la ciudad de Querétaro (2 muestras por establecimiento). Las fresas fueron manejadas en condiciones asépticas y transportadas en una hielera al laboratorio el mismo día que se adquirieron.

Pre-enriquecimiento: Se pesaron 200 g ± 5 g de cada muestra y se colocaron en 200 mL de agua peptonada

bufferada (BWP), se agito manualmente durante 1 min y se extrajeron los sólidos en condiciones asépticas, este procedimiento se realizó por duplicado obteniendo un total de 40 muestras. Posteriormente las muestras se incubaron durante 24 h a 37 ° ± 1 °C.

Detección de *Salmonella* spp.

Enriquecimiento selectivo: Se tomaron 0.1 mL y 1 mL de los pre-enriquecimientos y se inocularon en 9 mL de Rappaport-Vassiliadis con Novobiocina (RVS) y Tetrationato de Sodio con Novobiocina (MKTTn) respectivamente, los tubos con RVS se incubaron a baño maría a 42 °C ± 2 °C y los de MKTTn a 37 °C ± 1 °C durante 24 h.

Aislamiento y purificación: Los enriquecimientos selectivos se sembraron en placas de agar XLD y Hektoen, se incubaron a 37 °C ± 1 °C durante 24 h. Se identificaron las colonias positivas por su morfología y coloración bajo las condiciones del agar Hektoen donde las colonias son verdes claras, convexas y con precipitado negro por la producción de sulfuro de hidrógeno y en agar XDL donde las colonias son rojas con centro negro por la precipitación de ácido sulfhídrico. A las placas positivas se le hicieron dos pases más en su respectivo agar, para asegurar su aislamiento y purificación.

Almacenamiento: Una vez purificadas, se inoculo una colonia de cada muestra en Caldo Soya Tripticaseina y se incubaron a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas. Finalmente se almacenaron los aislamientos con glicerol para posteriores análisis mediante métodos moleculares.

RESULTADOS

De las 40 muestras totales se lograron identificar 2 muestras positivas para *Salmonella* (Tabla 1), tanto en agar Hektoen como en XLD, mostrando en este último un morfo tipo "típico" de esta bacteria al ser las colonias redondas y negras por la producción de ácido sulfhídrico, característica que es posible visualizar gracias al citrato férrico amónico que contiene el medio. (Figuras 1 y 2)

En el agar Hektoen se presentó un morfo tipo similar donde se tomaron como positivas las colonias verdes con un precipitado negro en el centro que al igual que en el agar XLD, la presencia de citrato férrico amónico y tiosulfato sódico permite la visualización del sulfhídrico.

Tabla 1. Resultados del crecimiento de Salmonella en Agar Hektoen y XLD, en donde la muestra 29 y 30 fueron positivas.

Muestra	Crecimiento de Salmonella	Muestra	Crecimiento de Salmonella	Muestra	Crecimiento de Salmonella	Muestra	Crecimiento de Salmonella
1	-	11	-	21	-	31	-
2	-	12	-	22	-	32	-
3	-	13	-	23	-	33	-
4	-	14	-	24	-	34	-
5	-	15	-	25	-	35	-
6	-	16	-	26	-	36	-
7	-	17	-	27	-	37	-
8	-	18	-	28	-	38	-
9	-	19	-	29	+	39	-
10	-	20	-	30	+	40	-

Si hubo crecimiento	+
No hubo crecimiento	-

El aislamiento puro de las colonias identificadas como *Salmonella* no se consiguió, ya que como se observa en la

figuras 2 y 3 hubo desarrollo de otras entero bacterias que crecieron alrededor de las colonias de *Salmonella*, las cuales se pueden distinguir en color amarillo resultado de la acidificación del medio por la fermentación de azucares que no son fermentables por *Salmonella*.

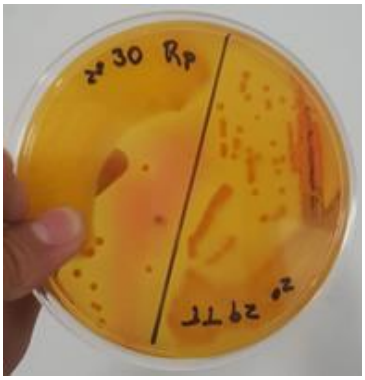


Figura 2. Primera inoculación de muestras en agar XLD, se observa la precipitación de ácido sulfhídrico (colonias negras) propia de Salmonella.

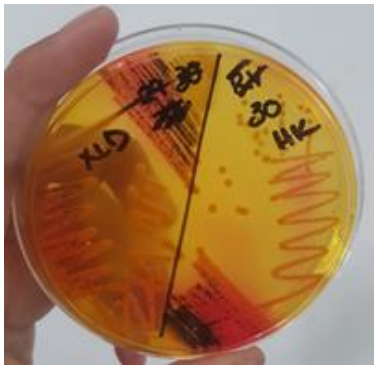


Figura 3. Primer pase de colonias en agar XLD, se observan entero bacterias (colonias amarillas) fermentadoras de azucares no fermentables por Salmonella.

Lo obteniendo indica que existe una prevalencia del 5% de *Salmonella* en estas frutas. Sin embargo, esto no confirma la ausencia del patógeno, así como el aumento en su prevalencia debido a que la contaminación puede suceder antes, durante y después de su cosecha. En el año en 2001 detectó la presencia de *Salmonella* en 143 muestras de fresas de exportación (FDA, 2001), lo cual es preocupante puesto que la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU) y otras instituciones tienen la obligación de examinar, evaluar y aprobar una amplia gama de productos incluyendo alimentos que superen sus riesgos potenciales al consumidor.

Cabe mencionar que la capacidad infecciosa depende del grado de resistencia del hospedador (edad y estado inmunitario), la matriz en que la bacteria es ingerida y el estado fisiológico de la bacteria por lo que existe una gran variabilidad en las estimaciones de dosis infectivas aunque comúnmente se acepta que oscila entre 106 y 108 unidades formadoras de colonias (Humphrey, 2004).

A pesar de los valores comúnmente aceptados, los resultados de la investigación de diversos brotes asociados a diferentes alimentos demuestran que en ocasiones la dosis infectiva puede ser mucho menor (Tabla 2).

Tabla 1: Dosis infectivas estimadas de Salmonella spp. (Humphrey, 1994).

Table 1 | **Estimates of the infective dose of *Salmonella* spp.**

Foodstuff	Serovar	Infectious dose (CFU)
Cheese	Typhimurium	1–10
Chocolate	Eastbourne Napoli Typhimurium	<100 10–100 10
Maize snack	Agona	2–45
Paprika-flavoured potato chips	Saint Paul, Javiana, Rubislaw	<45
Peanut butter	Mbandaka	10–100

Derived from epidemiological evidence of outbreaks. CFU, colony-forming units. Data taken from REF. 43.

Ejemplo está en la investigación de un brote de *Salmonella enteritidis* por la ingesta de helado contaminado en EE. UU. Donde la dosis infectiva se estimó como menor a 28 células (Vought y Tatini, 1994).

CONCLUSIONES

Se logró identificar a *Salmonella* spp. En 2 muestras de 40 totales de fresas importadas de EE. UU. Dado lo obtenido se demostró que la fresa es un potencial medio de transmisión de enfermedades causadas por *Salmonella* spp, entre las posibles causas de la contaminación por patógenos, es la exposición a estos antes, durante y después de su cosecha por lo que se deben mejorar las prácticas agrícolas y de procesamiento que aseguren la inocuidad de las frutas y vegetales, así como la evaluación de la calidad microbiológica de estos productos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pudo ser realizado gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro, institución que brindó instalaciones, material y reactivos para trabajar.

Agradezco ampliamente a nuestro profesor guía, el Dr. Gerardo Manuel Nava Morales que con su seriedad científica y profesional me ayudó en todo momento para que este trabajo fuera exitoso. A las estudiantes de maestría Guadalupe Balbuena y Fernanda Ricart, quienes me compartieron de sus conocimientos y experiencia en el laboratorio.

Finalmente quiero agradecer al 20° Verano de la Ciencia de la Región Centro por darme la oportunidad de adentrarme a la investigación científica.

BIBLIOGRAFIA

EFSA. (2006). "Preliminary Report on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks of Gallus gallus" en The EFSA Journal, Vol. LXXXI.

ISAACS, S. (2005). "An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*" en J Food Prot, Vol. LXVII

ARCHER DL, K. J. (1985) "Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States" en Food Protect, Vol. XCIV.

CARLOS A. (2017). "Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa extracts and chemical sanitizers on strawberries" en Journal of Food Safety, 1-8.

CDC. (S/A). "Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades" en Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Consultada en https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/salmonella/index.html (Fecha de consulta 01-08-2018).

BIALKA, K.L. (2008). "Efficacy of pulsed UV-light for the decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 And Salmonella spp. on raspberries and strawberries" en Journal of Food Science, Vol. LXXIII

NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

ELIKA. (2008). "Estudio cuantitativo del consumo de alimentos en la CAE" Consultada en https://www.elika.eus/ (Fecha de consulta 10-08-2018).

CRECIMIENTO TEMPRANO DE PLANTAS DE TOMATE FERTILIZADAS CON FÓSFORO MICROENCAPSULADO Y HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES

Matehuala Velázquez Claudia Isabel [1] y Cárdenas Flores Antonio [2]

RESUMEN

El fósforo es un macronutriente de vital importancia en los cultivos vegetales, sin embargo, este compuesto es escaso para el aprovechamiento de la planta. Por ello, los fertilizantes de fosfatos han tenido una gran importancia dentro de la producción de vegetales. El inconveniente con esta práctica, es que se excede su uso, creando eutroficación en los suelos. Por ello, se ha optado por utilizar nuevas tecnologías que permitan una nutrición paulatina de los cultivos sin afectar el medio ambiente. Entre ellos se encuentran los fertilizantes encapsulados y los biofertilizantes, los cuales están formulados con microorganismos. En el presente trabajo se analizó el crecimiento vegetal de plantas de tomate tratadas con un fertilizante encapsulado de MKP y almidón y un biofertilizante. Se determinó que no existe gran diferencia el usar un fertilizante convencional con el fertilizante encapsulado, siendo este último una gran alternativa como sustituto del primero. Se comprobó que la nutrición con el encapsulado es mejor en presencia del hongo micorrícico utilizado, por lo que se puede hablar de una complementación entre ambos fertilizantes (encapsulado y biológico).

Palabras clave: Fertilizantes encapsulados, crecimiento vegetal, fósforo, micorriza, *R. intraradices*.

INTRODUCCIÓN

Indudablemente, la agricultura representa un importante sector a nivel nacional, por lo que demanda ininterrumpidamente nuevas tecnologías. Un factor de gran importancia dentro de la producción agrícola es la nutrición vegetal por lo que, desde hace años, se han formulado fertilizantes que permitan al cultivo obtener todos los nutrientes necesarios para crecer. El fósforo es un componente clave en el crecimiento vegetal, considerándose como un macronutriente. Éste se encuentra presente en las plantas como componente de fosfolípidos, nucleótidos y moléculas transportadoras de energía, principalmente (Taiz-Zeiger, 2007). Este nutriente es aprovechado por la planta en forma mineral, pues las raíces se encargan de absorberlo en forma de fosfato (PO_4^{-3}) para después distribuirlo al resto de la célula (Hawkesford *et al*, 2012). El aprovechamiento de los fertilizantes fosfóricos es muy bajo, oscilando entre 10 y 30% (Navarro García *et al*., 2014), por lo que se incrementa el uso de éstos. Este fenómeno es debido a que el fósforo se fija al suelo (Vance, 2001) dependiendo de las condiciones en que se encuentre, tales como pH y concentración de otros minerales, por lo que resulta cada vez más difícil de utilizar eficientemente.

Actualmente estamos rumbo a una crisis de escasez de este nutriente en los suelos, dado que, a pesar de estar presente, éste no se encuentra accesible para la planta (Fernández, 2007). Por ello es que el uso de fertilizantes fosfatados para mantener la producción agrícola actual va en aumento, causando un daño medio ambiental mediante eutroficación, pudiendo llegar a los mantos freáticos.
Una alternativa que se ha desarrollado en los últimos años es el empleo de fertilizantes encapsulados con polímeros degradables, los cuales permiten la liberación paulatina del nutriente (Zhang *et al.*, 2000). De esta manera, nos aseguramos que la liberación del fósforo sea aprovechada por la planta sin llegar a una eutrofización en el suelo. Aunado a esto, se ha implementado el uso de hongos micorrícicos como biofertilizante, lo cual le confiere a la planta una protección mediante una relación simbiótica (Manck y Requena, 2016) e incluso promoviendo un mejor crecimiento de la planta. Simplemente una solución prometedora al campo y el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo es evaluar el crecimiento vegetal de las plantas de tomate rojo tratadas con un encapsulado de fosfato monopotásico (MKP) y almidón, en presencia o ausencia del hongo micorrícico, *Rhizophagus intraradices.*

METODOLOGÍA

Se usó como modelo de estudio la planta de tomate rojo. Las cápsulas de fósforo fueron proporcionadas por el Dr. Carlos Espinoza del Departamento de Materiales Avanzados de CIQA, las cuales fueron elaboradas a partir de almidón, como matriz de encapsulamiento, y fosfato monopotásico (MKP) mediante la técnica de secado por

aspersión. La aplicación de fertilizante encapsulado se realizó acorde a la concentración de MKP y lo recomendado para el cultivo. Los tratamientos realizados se midieron con presencia (+) y ausencia (-) del hongo micorrícico *Rhizophagus intraradices*, dicha cepa fue proporcionada por la empresa biofábrica Siglo XXI.

Los ensayos se realizaron en invernadero en estadio de desarrollo de plántula en macetas de 6 L. Se realizaron 4 tratamientos para nutrir a la planta: con el encapsulado de fósforo (E), con el fertilizante convencional (M), con almidón sin fertilizante (A) y el control negativo (T), al cual no se suministró fertilizante de fosfato. Se realizaron 5 repeticiones para cada tratamiento para obtener un valor promedio. Las plantas fueron cultivadas en invernadero en sustrato de turba: perlita, y se les proporcionó en suficiencia el agua y el resto de los nutrientes esenciales a través de fertirriego.
Las plantas se analizaron mediante muestreos destructivos realizados a los 30 días después de siembra, en donde se tomaron muestras cada 12 días (5 muestreos en total). En este reporte sólo se hacen expresos los datos obtenidos en el primer muestreo, en el cual la planta sólo tiene 30 días de siembra.
Se evaluó el crecimiento de las plantas bajo estos tratamientos mediante la altura, grosor de tallo, peso fresco y seco, y área foliar. La altura se midió desde la base del tallo hasta el ápice; el grosor del tallo se midió con un vernier en la zona más gruesa del mismo; el peso fresco se obtuvo tras extraer la planta de la maceta (tallo, hojas y raíz), sin considerar el sustrato (tierra), mientras que el peso seco, tras secar por 72 h a 70 °C; por último, el área foliar se determinó con el Medidor de Área Foliar Li-3100C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La altura y el grosor de una planta son la primera señal de un buen crecimiento vegetal. En la Figura 1 y 2 se expresa el crecimiento medido en estos dos parámetros. En la Figura 1, podemos observar que la diferencia de altura entre los tratamientos no es visible a simple vista. Al evaluar este crecimiento, podemos observar que no existe una diferencia significativa entre el fertilizante encapsulado con el convencional, sin embargo, cuando comparamos el tratamiento E y el de almidón (matriz del encapsulado), existe una diferencia notoria. Inclusive, observamos que el tratar a la planta con el almidón es equivalente a no darle ningún nutriente de fósforo (T). Con esto podemos inferir que el almidón por sí solo tiene una repercusión en el crecimiento de la planta. Se sospecha que éste atrapa los demás nutrientes del medio, privándolos de la planta, sin embargo, no se logró comprobar dicho planteamiento. Centrándonos en los tratamientos E (+/-) y M (+/-), observamos que existe un crecimiento ligeramente mayor en presencia del hongo micorrícico, aunque es más notorio en el tratamiento con el encapsulado.

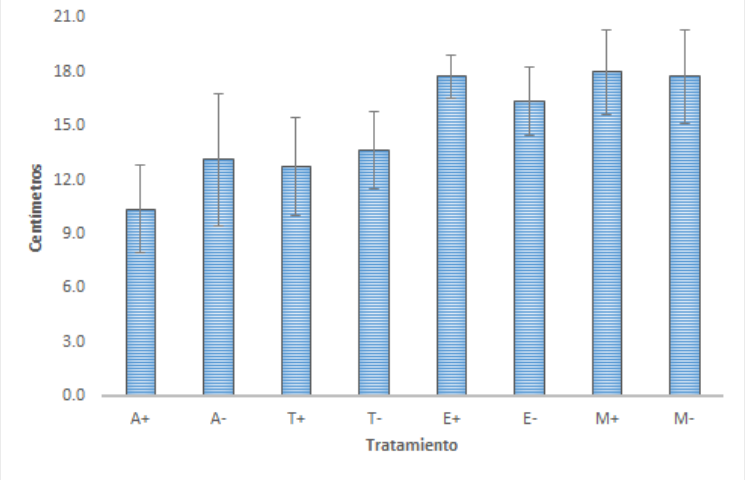


Figura 1. Altura de plantas de tomate (cm) en tratamientos con almidón (A), encapsulado de fosfato (E), fertilizante convencional (M) y control negativo (T) en presencia o ausencia de hongo micorrícico, (+) y (-) respectivamente.

Ahora bien, en la Figura 2 se presenta el diámetro del tallo de las plantas. Ésta característica es más notoria, dado que es perceptible a simple vista. El comportamiento es similar al caso de la altura, dado que los tratamientos con el encapsulado y el fertilizante convencional se asemejan. El grosor con el tratamiento E es notoriamente más grande al control negativo (T), lo cual nos asegura que la planta está nutrida. Nuevamente se aprecia que las plantas tratadas

con almidón tienen un tallo más delgado y frágil que el control negativo (T). De igual manera, el grosor se ve afectado por la presencia o ausencia del hongo, en el cual es ligeramente mayor cuando existe presencia, exceptuando los tratamientos A y T.

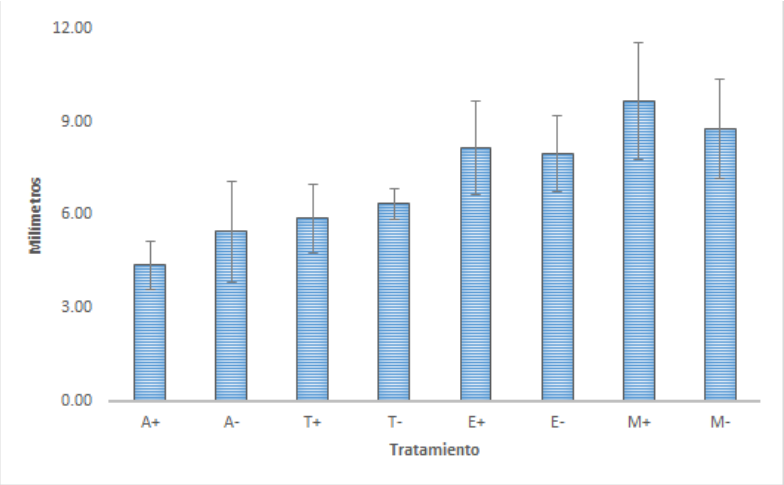


Figura 2. Grosor de tallo (mm) de plantas de tomate en tratamientos con almidón (A), encapsulado de fosfato (E), fertilizante convencional (M) y control negativo (T) en presencia o ausencia de hongo micorrícico, (+) y (-) respectivamente.

La humedad de una planta es característica de la misma, por lo que el evaluar su peso fresco y seco brindan un panorama de la cantidad de biomasa producida sin considerar el líquido. Por ello en la Figura 3 se hace gráfico este parámetro, comparando ambos pesos. Observamos que existe una gran diferencia de pesos en todos los tratamientos. Centrándonos en los tratamientos M y E, produjeron la mayor cantidad de biomasa, lo cual se traduce a un crecimiento favorable. Cuando hablamos de un crecimiento favorable, hablamos de una mejor captación de fósforo, por lo que el mero hecho de tener un buen crecimiento -casi equiparable con el fertilizante convencional-, hablamos de una eficiencia aceptable de liberación del nutriente del fertilizante encapsulado. Con esta misma Figura podemos vislumbrar la humedad de cada planta con los tratamientos, teniendo una mayor cantidad de agua en los tratamientos M y E, reflejo de una planta sana.

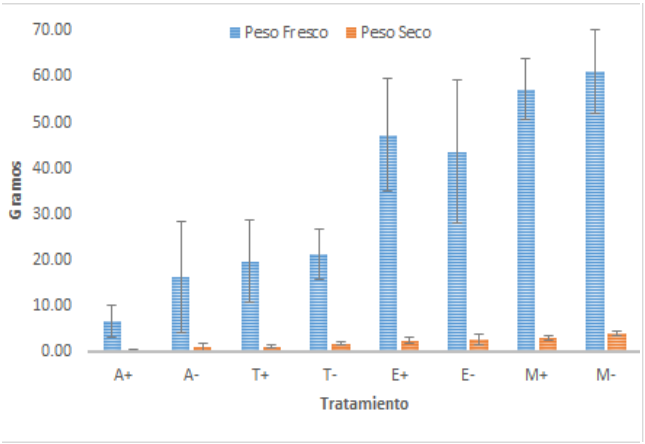


Figura 3. Peso fresco contra peso seco de las plantas.

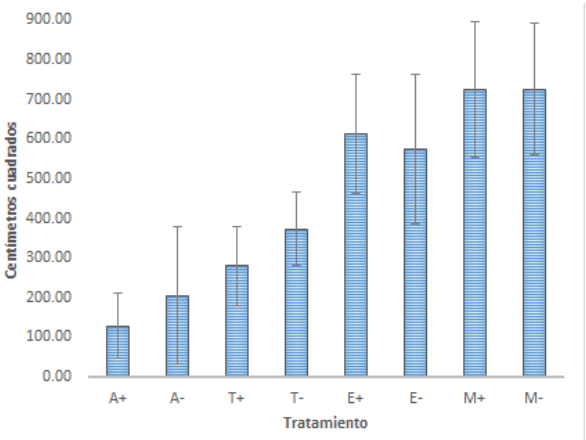


Figura 4. Área foliar de las plantas con los diferentes tratamientos.

El área foliar está estrechamente relacionada con el crecimiento vascular de la planta y por consiguiente, en la fotosíntesis de la misma. Por lo que resulta un parámetro de gran importancia para comprender cuán grande es la planta. En la Figura 4 se puede apreciar esta característica, siendo las de mayor área foliar las sometidas al tratamiento con el fertilizante convencional (M), seguidos del tratamiento con el encapsulado. Nuevamente se obtuvo

que el tratamiento con almidón fue el de menos área, inclusive menor que el control negativo. En esta parte sólo se evaluó el foliolo de la hoja de la planta de tomate.

Cabe destacar que en todas las figuras se observa una varianza grande, y ésto es debido a que las plantas no fueron completamente uniformes. Ésto es común, dado que hablamos de organismos completos y es complejo obtener un crecimiento exacto e invariable. Se realizaron más evaluaciones para analizar el comportamiento de las plantas a través del tiempo, sin embargo en este primer muestreo se obtuvieron los resultados esperados: en el tratamiento con almidón no se obtuvo un buen crecimiento, de acuerdo al control negativo, mientras que las plantas tratadas con el fertilizante encapsulado obtuvieron resultados equiparables con las tratadas con el fertilizante convencional.

CONCLUSIONES

Las plantas que crecieron con el encapsulado como fuente de fósforo crecieron de forma similar a las tratadas con el fertilizante MKP comercial. Este comportamiento brinda evidencias de que el MKP encapsulado fue liberado al medio y pudo ser aprovechado por el cultivo, sugiriendo su uso como alternativa y sustituto del MKP convencional, cuyo fin es prevenir la eutroficación generada por el mismo. Aunado a esto, se obtuvo un efecto favorable con el biofertilizante a base del hongo micorrícico, *R. intraradices*, en el cual, en presencia de este microorganismo, aumentaba el crecimiento ligeramente en tratamientos M y E. Para poder obtener resultados conclusivos se debe considerar el crecimiento de las plantas a lo largo del tiempo bajo estas mismas condiciones, sin embargo, en este primer muestreo se obtuvieron resultados prometedores.
Se puede concluir que el empleo del fertilizante encapsulado y el hongo micorrícico pueden favorecer el crecimiento vegetal, por lo que se vuelven una alternativa ecológica y sustentable para la producción agrícola.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Antonio Cárdenas por el tiempo y oportunidad brindados para formar parte del proyecto y equipo de trabajo, además del asesoramiento brindado a lo largo del verano. Así mismo, a los Ing. Andrés Arredondo y Ing. Edgar Rodríguez por las enseñanzas compartidas, tiempo y compañía durante la estancia

BIBLIOGRAFÍA

Fernández, M. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLI (2), 51-57. Consultada en http://www.redalyc.org/pdf/2231/223114970009.pdf, (fecha de consulta: 17-07-2018).
Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T. M. R., Schjørring, J. K., Møller, I. S., y White, P. (2012). Functions of macronutrients. In Marschers's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier Science.
Manck-Götzenberger, J., y Requena, N. (2016). Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato SWEET Sugar Transporter Family. Frontiers in Plant Science, 7, 487. Consultada en http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00487, (fecha de consulta: 21-07-18).
Navarro García, G., Navarro García, S., y Ginés Navarro García, S. N. G. (2014). Fertilizantes: química y acción (No. 631.8 N3F4).
Taiz, L. y Zeiger, E. (2007). Fisiología Vegetal. De la present edició: Publicacions de la Universitat Jaume, volumen 1. p. 119-125.
Vance, C. P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiology, 127(2), 390–397.
Zhang, M., Nyborg, M., Malhi, S. S., McKenzie, R. H., y Solberg, E. (2000). Phosphorus release from coated monoammonium phosphate: effect of coating thickness, temperature, elution medium, soil moisture and placement method. Canadian Journal of Soil Science, 80(1), 127-134.

APLICACIÓN DE UN LÁTEX POLIMÉRICO COMESTIBLE COMO RECUBRIMIENTO PARA ARÁNDANOS AZULES EN POSCOSECHA

Daniela Nataly Díaz Zepeda[1] y René Darío Peralta[2]

RESUMEN

Debido al incremento en la demanda de arándano azul, últimamente, los métodos para optimizar su comercialización han sido tema de interés. El presente trabajo estudia el efecto del Poli (acetato de vinilo-co-alcohol vinílico), como recubrimiento de arándanos azules para prolongar su vida útil. Se evaluaron un testigo y tres tratamientos; látex (P(VAc-co-VA)), látex con nanopartículas de óxido de zinc (NP´sZnO) y látex con NP´sZnO y grafeno. Los frutos se almacenaron a temperatura de 25°C y condiciones controladas de 4°C durante 8 y 16 días. Los recubrimientos no mostraron efectos significantes en pérdida de peso, contenido de sólidos y pH. Sin embargo, se muestra un efecto significante de la temperatura de almacenaje. Los resultados nos incentivan a evaluar mayor cantidad de frutos, reduciendo la incertidumbre producida por factores biológicos.

Palabras Clave: Arándano azul; Recubrimiento; Poscosecha; Poli (acetato de vinilo-co-alcohol vinílico).

ABSTRACT

Lately, the increase of commercial demand of blueberries has led to the interest in developing methods to prolong their shelf life. In this work, the effect of Poly (vinylacetate-co-vinyl alcohol), P(VAc-co-VA), as coating for blueberries to increase their commercial life is studied. Three treatments were evaluated; latex (P(VAc-co-VA)), latex with zinc oxide nanoparticles (NP´sZnO) and latex with NP´sZnO and graphene. Fruits were stored at room temperature (25°C) and controlled conditions of 4°C for 8 and 16 days. Coatings did not show significant effects in weight loss, solids content and pH. However, a significant effect of the storage Temperature is shown. These results encourage us to reduce the uncertainly produced by biological factors, incrementing the quantity of blueberries in the experiment.

Key Words: Blueberry; Coating; Postharvest; Poly (vinylacetate-co-vinyl alcohol).

INTRODUCCIÓN

Los recubrimientos comestibles para productos alimenticios frescos constituyen una tecnología que ha ganado terreno en los últimos años como alternativa para mejorar la calidad de los alimentos, y a la vez, proteger sus propiedades durante el transporte y vida en anaquel. Para esto se utiliza una amplia variedad de materiales que incluyen metales rígidos y flexibles, vidrio, plásticos flexibles, papel, películas y recubrimientos biodegradables, etc. Estos recubrimientos son aplicados directamente en los alimentos como una fina capa entre algunos componentes dentro del producto. La mayoría de las veces no contribuyen con un valor nutritivo significativo, por lo que se consideran más como un aditivo.

El cultivo de arándano ha aumentado su superficie a 15,000 hectáreas en tan solo 4 años y se encuentra extendido en países como China, Japón, Chile, Nueva Zelanda, Argentina y México. (FAO, 2017). Este crecimiento ha prosperado en México, impulsado por la cercanía con el mercado de Estados Unidos y por la diversidad climática, pues tan solo en el año 2015 se reportó una producción de 15,489 toneladas con un valor de exportación de 121 millones de dólares (SIAP, 2016).

Los arándanos son frutos climatéricos, es decir, su proceso de maduración continua después de ser cortados del arbusto, por esto la sobre madurez les afecta incipientemente, también, son susceptibles al desarrollo de enfermedades, en su mayoría causadas por hongos (Wright, ycol. 2003). En el campo comercial, son considerables las pérdidas generadas por el deterioro de los frutos en el periodo de poscosecha.

Hay poca bibliografía relacionada con la aplicación de polímeros sintéticos para recubrimiento de frutos. Por esta

[1]Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Ing. José Cárdenas Valdez, Col. República, C.P.:25080, Saltillo, Coah., danieladiazzepeda@uadec.edu.mx

[2] Centro de Investigación en Química Aplicada, Procesos de Polimerización; Blvd. Enrique Reyna No. 140, Col. San José de los Cerritos, C. P.:25294, Saltillo, Coah. rene.peralta@ciqa.edu.mx

razón es un tema atractivo en la actualidad. En este ámbito, destaca el uso de Poliacetato de vinilo debido a que se ha comprobado que mejora las propiedades organolépticas del fruto (Strübing et al., 2008).A su vez, este actúa como copolímero con el Alcohol polivinílico por acción de grupos hidroxilos formando el Poli (vinil alcohol-co-acetato de vinilo) (Figura 1), este compuesto tiene la particularidad de ser altamente aditivo, además de ser de grado alimenticio.

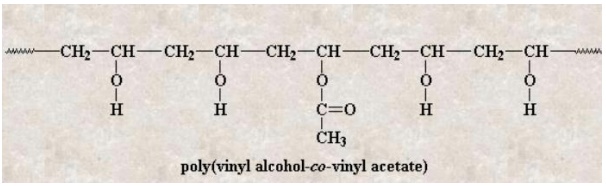


Figura 1. Estructura química del Poli (vinil alcohol-co-acetato de vinilo)

En el presente estudio se analiza la aplicación del Poli (vinil alcohol-co-acetato de vinilo) como recubrimiento para arándanos azules. Dicho látex se modificó con nanopartículas de óxido de zinc y grafeno, en diferentes tratamientos, esto con el fin de ser más efectivo contra la actividad microbiana. Se determina el efecto de dicho recubrimiento en la vida poscosecha de los frutos y se analizan los resultados a través de ciertos parámetros.

MÉTODOS Y MATERIALES

Preparación de los recubrimientos, látex polimérico poli (acetato de vinilo-co-alcohol vinílico)
Se prepararon tres recubrimientos poliméricos, sintetizados en los laboratorios de la Planta Piloto 2 del Centro de Investigación en Quimica Aplicada (CIQA). Se siguieron las fases que se describen a continuación:

Fase 1: Destilación del acetato de vinilo (VAc)
La destilación de dicho monómero se llevó a cabo a presión reducida, temperatura baja y agitación. En un matraz bola de 1 L se vertieron 500 mL de VAc, se conectó a una columna de destilación unida a un distribuidor, en el cuál, dos de sus salidas fueron selladas, mientras que en cada una de las dos restantes se colocó un matraz para recolección. A continuación, se unió una bomba de vacío, conectada a un Chiller con el fin de recolectar los remanentes en la bomba. El producto destilado se almacenó a 4°C hasta su uso en las siguientes polimerizaciones.

Fase 2: Polimerización
En la campana de extracción se montó un reactor con un estopero de vidrio en la boca del centro de la tapa del reactor, pasando la propela de acero inoxidable a través de este y se inserta en la ranura del motor de agitación. El mismo se utilizó en las siguientes reacciones:

Recubrimiento # 1, látex: En un reactor de 500 ml se depositaron 330g (78.74 %) de agua desionizada, 0.068g (0.016%) de per-sulfato de amonio (APS), 0.7g (0.16 %) de do decil sulfato de sodio. En un vaso de precipitado se pesaron 25 g de alcohol polivinílico y se reservó. Posteriormente, se añadió el alcohol polivinílico poco a poco, a una temperatura de 30°C y agitación a 60 rpm, a medida que se agregaba el reactivo la velocidad subió a 190 rpm, se dejaron transcurrir 30 min una vez que se añadió todo el reactivo. El sistema se aisló y se pasó argón para mantener una atmósfera inerte. Se agitó por un ahora más a 60°C y 190 rpm.
En un matraz Erlenmeyer se preparó una solución de 60g (14.31 %) de acetato de vinilo anteriormente destilado más 4.2 g (1 %) de éter. Posteriormente, se desgasificó inyectando argón. Con la ayuda de una bomba dosificadora y una jeringa previamente desgasificada con argón se inyectaron 0.249 ml/min de la solución preparada de VAc y éter en el reactor a través de un de las bocas de la tapa a una temperatura de 60°C a 190 r.p.m. en el lapso de una hora y veinte minutos. Posterior a la adición de la solución, se continuó agitando por una hora más, pero a una velocidad de 200 r.p.m.

Recubrimiento #2, látex con nanopartículas de óxido de zinc (NP´s ZnO): En un matraz Erlenmeyer se depositaron 500 ml de agua desionizada y se agregaron 9.5 mg de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO), está mezcla se sónico por lapsos de 15 segundos, 4 veces. En un rector de 500 ml se depositaron 230g (78.74 %) de agua desionizada, se agregaron 100 g de la solución preparada con las nanopartículas de ZnO, 0.70 g (0.016%) de surfactante do decil sulfato de sodio (SDS).
Se monto el reactor y se inició la agitación mecánica a 300 r.p.m. durante 20 minutos, después de este tiempo se agregaron 0.068g de iniciador per-sulfato de amonio (APS), se dejó agitar por 5 minutos. Posteriormente se

añadieron 25 mg de alcohol polivinílico a 30°C y se dejó agitar por 30 min. Después se preparó una solución de VAc con éter, como se describió anteriormente y se añadió en semicontinuo al reactor con una jeringa desgasificada. Por último, se dejó agitando por dos horas más.

Recubrimiento #3, látex con NP´s ZnO y grafeno (G/ZnO): En un matraz Erlenmeyer se depositaron 250 ml de agua desionizada y se agregaron 2.5 mg de nanopartículas de grafeno con óxido de zinc (G/ZnO), está mezcla se sónico por lapsos de 15 segundos, 4 veces. En un rector de 500 ml se depositaron 230g (78.74 %) de agua tipo Mili Q, se agregaron 100 g de la solución preparada con las nanopartículas de G/ZnO, 0.70 g (0.016%) de surfactante do decil sulfato de sodio (SDS). El reactor con los reactivos contenidos se sonicó en un baño de ultrasonido por lapsos de 30 segundos por 3 veces. Después se siguió exactamente el mismo procedimiento descrito en el segundo párrafo del recubrimiento #3.

Aplicación de tratamientos en arándano azul

Se utilizaron arándanos azules adquiridos en la tienda Costco, posterior a la compra se realizó una selección de los mejores frutos, libres de daño mecánico y microbiano.

Figura 2. Arándano azul adquirido para la experimentación

El diseño experimental consistió en un muestreo completamente al azar, factorial (días, temperatura, tratamientos). 4 frutos X 4 días (4, 8, 12 y 16) X 4 tratamientos (sin látex, látex, látex + NP´s ZnO y látex + NP´s ZnO/grafeno) X 2 temperaturas (4 y 25 °C) X 3 (triplicados) + 12 del día inicial = 396 frutos.
Después de la selección se lavaron y desinfectaron los frutos, a continuación, se aplicaron los recubrimientos manualmente, y se dejaron secar con ayuda de un ventilador de pedestal.
Se eligieron 96 frutos por su tamaño similar, para calcular la pérdida de peso se etiquetaron con e diferentes colores: 24 frutos con etiqueta azul, 24 frutos con etiqueta amarilla, 24 frutos con etiqueta verde y 24 frutos con etiqueta roja, los cuales se pesaron uno a uno.
Para la realización del muestreo al azar de los frutos, se tomaron 96 frutos a los que no se les recubrió, 96 frutos a los que se les recubrió con látex, 96 frutos que se recubrieron con látex + NP´s ZnO, 96 frutos a los que se les aplico látex + NP´s G/ZnO.
Los frutos etiquetados y pesados para determinar la pérdida de peso fueron separados al azar en dos grupos de 12 frutos cada uno, un grupo se almaceno en una cámara climática a 4°C con una humedad del 76% y el otro grupo se almaceno a temperatura ambiente a 25°C sin humedad controlada.
De los frutos destinados para el muestreo al azar, se tomaron 48 frutos de cada tratamiento, los cuales se almacenaron en una cámara climática a 4°C con una humedad del 76% y los otros 48 frutos de cada tratamiento se almacenaron a una temperatura de 25°C sin control de humedad (temperatura ambiente). A estos frutos destinados para muestreo al azar no se les peso, debido a las distintas pruebas, que al final terminan por destruir el fruto.

Muestreo y Parámetros

Pérdida de peso: La pérdida de peso se evalúa cada día de muestreo en frutos independientes. Los resultados se obtienen mediante la ecuación 1:

$$\%\ PP=(1-Pn/Pi)100 \quad (1)\ *$$

*Dónde: %*PP*= porcentaje de pérdida de peso; *Pn*= peso final (día de muestreo); *Pi*= peso inicial.
Firmeza: Esta prueba se realiza en cada uno de los frutos, para ello se emplea un texturómetro (Texture Technologies, TA. XTExpress, E.U.A.), el cual perfora en tres puntos diametralmente opuestos en la zona ecuatorial

de los frutos a una velocidad de 5 mm/s a una distancia de 4 mm, cuyo puntal es de 2 mm de diámetro. Los resultados son expresados como la fuerza de compresión en Newtons (N).

Solidos solubles: Con ayuda de un refractómetro (Brix: 0-53% - Refractómetro Digital Atago PAL-1) se mide el concentrado de sacarosa.

Medición del pH: El pH se determina utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments HI 2213 pH/ORP Meter).

RESULTADOS

La pérdida de peso de los arándanos según la Figura 3 aumentó notablemente cuando se almacenaron los frutos a 25°C (p= 0.070), perdiendo peso hasta un 60%, y almacenados a 4°C (p=<0.05) perdiendo hasta el 10% de su peso. El tratamiento que conservo más el peso del fruto fue el recubrimiento de látex con NP´s de óxido de zinc con grafeno y la menor conservación ocurrió con los frutos sin recubrir.

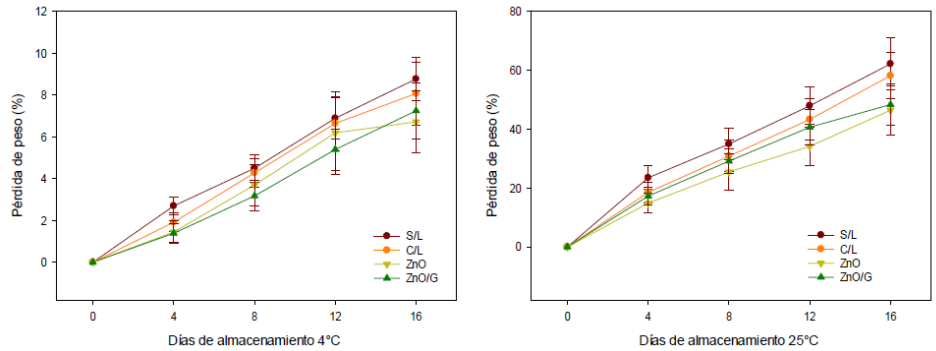


Figura 3. Porcentaje de pérdida de peso de los arándanos azules con los tratamientos de poli (vinil acetato-co-alcohol polivinílico) (sin recubrimiento, látex, látex NP´s ZnO, látex NP´s G/ZnO) almacenados a 4 y 25°C.

Los frutos con mayor firmeza fueron los almacenados a 4°C (p= 0.011) recubiertos con látex con nanopartículas de óxido de zinc, con una menor firmeza a 25°C (p=0.002).

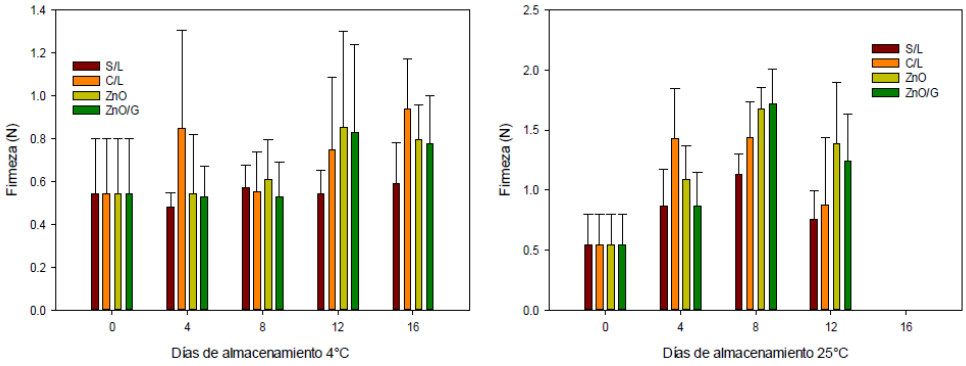


Figura 4. Firmeza resultante de los arándanos azules con los tratamientos de poli (vinil acetato-co-alcohol polivinílico) (sin recubrimiento, látex, látex NP´s ZnO, látex NP´s G/ZnO) almacenados a 4 y 25°C.

Los sólidos solubles totales resultaron tener mayor porcentaje presente en los arándanos azules almacenados a 25°C (p<0.05) con 12.37% para los frutos sin látex. Los frutos almacenados a 4°C el porcentaje de solidos fue de 12.1% con tratamiento de NP´s de grafeno con oxido de zinc.

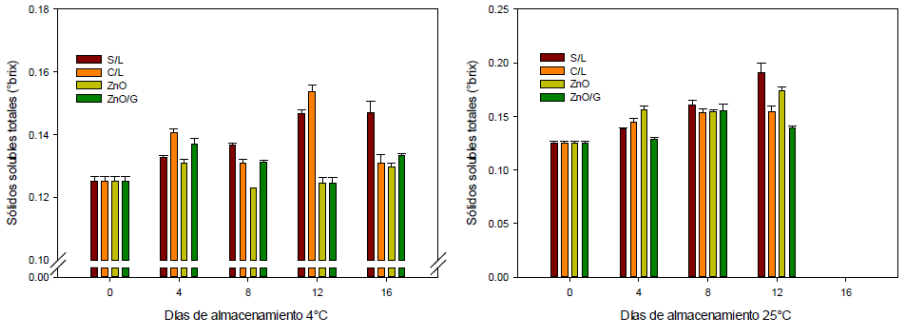


Figura 5. Sólidos solubles totales de los arándanos azules con los tratamientos de poli (vinil acetato-co-alcohol polivinílico) (sin recubrimiento, látex, látex NP´s ZnO, látex NP´s G/ZnO) almacenados a 4 y 25°C.

El pH de los frutos se conservó más acido en el almacenamiento a 4°C ($p<0.05$) siendo el tratamiento de NP´S de óxido de zinc el que mantuvo el pH del fruto y a 25°C ($p<0.05$) se perdió más ácidos.

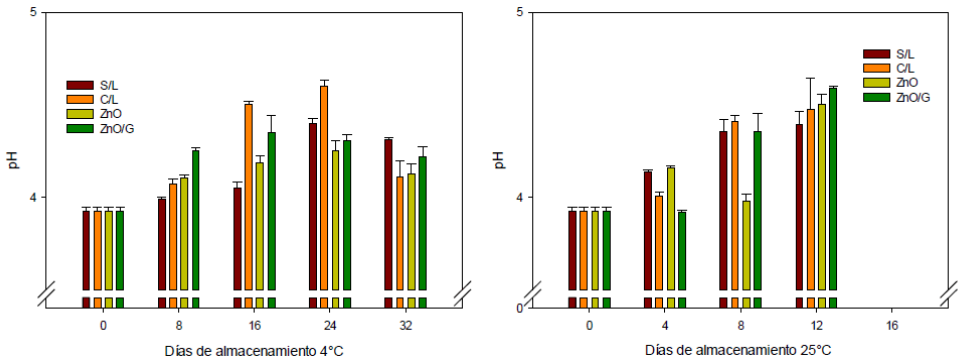


Figura 6. pH de los arándanos azules con los tratamientos de poli (vinil acetato-co-alcohol polivinílico) (sin recubrimiento, látex, látex NP´s ZnO, látex NP´s G/ZnO) almacenados a 4 y 25°C.

CONCLUSIONES

Los recubrimientos brindaron resistencia, gran brillo y un color más oscuro al natural del fruto, reducen la pérdida de peso por deshidratación, por lo que se puede decir que alargan el tiempo de vida anaquel conservándolos.
Los frutos recubiertos a una temperatura de 4°C con un 76% de humedad, estos pierden apenas la décima parte de su peso después de 16 días. La conservación de los frutos a 25°C fue menor y su deshidratación aumento significativamente.
Los frutos utilizados en el trabajo experimental no se adquirieron enseguida de su cosecha, ya que se obtuvieron empaquetados, por lo que el fruto podría alcanzar más tiempo de vida anaquel si se recubriera después de su cosecha.
En pruebas con frutos, materia biológica, se debe tener una mayor cantidad de unidades experimentales debido a la variabilidad que aportan los factores propios del organismo, en algunas pruebas, la cantidad de pulpa no fue suficiente para obtener resultados certeros, esto nos encamina a ajustar el diseño experimental a una mayor cantidad de frutos.

BIBLIOGRAFÍA

Artículos de Revista

Acle José A., La polimerización continua en emulsión de copolímeros vinílicos, Revista Iberoamericana de Polímeros, 2002, Volumen 3(2).
Cagri A., Ustunol Z., Ryser E.T., Antimicrobial edible films and coatings. J. Food Prot., 2004, 67, 833–848.
Strübing, S., H. Metz y K. Mäder (2008). Characterization of poly (vinyl acetate) based floating matrix tablets. Journal of ControlledRelease 126: 149-155.

Artículos en Línea

INTAGRI. 2017. El Cultivo de Arándano. Serie Frutillas Núm. 17. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. Extraído de https://www.intagri.com/articulos/frutillas/El-Cultivo-de-Ar%C3%A1ndano-o-Blueberry

Wright, E. R., Pérez. B. A., Fernández, R. L., Asciutto, Rivera, M. C., Murillo, F., Vasquez, P., Divo de Sesar, M., Pérez, A.,Aguilar Heredia, L., Rosato, M. F., Crelier, A. y J. Baldomá. 2003. Conocimiento actual sobre enfermedades de arándano. Disponible en: www.agro.fauba.info/files/u1/wright.pdf.

“VISUALIZACIÓN DE MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA AGRICULTURA”

Dr. Braulio Gutiérrez Medina[1]

Alexis Vázquez Villa, Alejandra Judith Gutiérrez, Daniela Ramos Briseño[2].

RESUMEN

Dentro del estudio microscópico existen defectos propios de los instrumentos empleados, en los microscopios ópticos y en visualizaciones a campo claro específicamente, existe algo conocido como aberración de la señal, lo que ocasiona una distorsión de pequeños detalles que caracterizan la imagen inicial. Una aplicación para compensar numéricamente la degradación de estas imágenes es la deconvolución; esta técnica permite una restauración versátil del procesamiento de señales. Entre el estudio se sugiere que en la microscopia en campo claro y/o de fluorescencia, la restauración de imágenes sea una alternativa para mayor conocimiento de la morfología celular, siendo las bacterias E. Coli modelo de estudio. Para la solución se emplea un conjunto de logaritmos matemáticos, utilizando una función, conocida como PFS, función de extensión de punto modelada. La PFS de un dispositivo es la imagen de un único objeto. Este estudio, empleó una PSF modelada teóricamente, observando y procesando imágenes de bacterias E. Coli GFP a campo claro.

ABSTRACT

Within the microscopic study there are inherent defects of the instruments used, in the optical microscopes and in the clear field visualizations, there is something known as aberration of the signal, which causes a distortion of small details that characterize the initial image. An application to compensate numerically the degradation of these images is the deconvolution; this technique allows a versatile restoration of signal processing. Among the study, it is suggested that the microscopy in light field and / or fluorescence microscopy, the restoration of images is an alternative for deeper knowledge of cell morphology, with the E. coli bacteria being the study model. For the solution of defects to a set of mathematical logarithms is used, using a function, known as PFS, modeled point extension function. The PFS of a device is the image of a unique object. This study employed a theoretically modeled PSF, observing and processing images of E.coli GFP bacteria in the field.

Palabras clave

Deconvolución, PSF. Microscopia a campo claro. Fluorescencia, E. Coli GFP.

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de nuestra historia el hombre siempre se ha visto inmerso en emplear diferentes herramientas de la ciencia experimental con el objetivo de estudiar aspectos fundamentales de la bioquímica y de la biología celular. Varios tipos de organismo y células son empleados como modelos experimentales, debido a sus características. Las células procariotas (bacterias) son modelos ideales. La especie más estudiada es la enterobacteria E. coli, modelo ideal para estudiar mecanismos básicos de genética molecular. Los conceptos actuales de biología molecular como la comprensión de la replicación de ADN, expresión genética y síntesis de proteínas, se derivan de estudios realizados en dicha bacteria. El genoma de E. coli, consiste en aproximadamente 4.6 millones de pares de bases y codifica para alrededor de 4000 proteínas, en comparación con el genoma humano el cual es casi mil veces más complejo, debido a esto proporciona ventajas para realizar una análisis genético [1],[7].

Desde 1884 el microbiólogo Theodor Escherich comenzó estudios de microbios intestinales y su papel en la digestión y en enfermedades intestinales. Durante esta investigación descubrió una bacteria de crecimiento rápido a la cual llamó Bacterium coli commune. En la decana de 1940, su uso en diversos estudios establecieron el uso de E.coli como el organismo modelo bacteriano de elección [5].

[1] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), Nanociencias y materiales, Camino a La Presa de San José 2055, Lomas 4 sección, CP. 78216 San Luis Potosí, SLP · 01 444 834 2000 bgutierrez@ipicyt.edu.mx

[2] Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química; Cerro de las campanas s/n, Centro universitario, Las Campanas, C. P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro., daniela.bris@yahoo.com

Dentro de las características que facilitan el uso de dicha bacteria son sus condiciones de crecimiento, las cuales se encuentran bien definidas. E.coli es anaerobia facultativa y su temperatura de crecimiento optimo se encuentra definida a 37°C. Su reproducción se impulsa al reducir diferentes sustratos como el oxígeno, fumarato y aminoácidos.
El ciclo de vida de E.coli se basa en el proceso denominado fisión binaria y tiene un tiempo de reproducción de 20 a 60 min. La mezcla de nutrientes apropiada para su crecimiento incluye glucosa, aminoácidos, vitaminas, entre otros. Cada colonia bacteriana contiene hasta 108 células [3]. Dicha bacteria ha sido utilizada en trabajos de investigación como el de Herbert Boyer y Stanley Norman Cohen en donde se usaron enzimas de restricción y plásmidos para crear ADN recombinante lo que convirtió a E.coli como la base de la biotecnología.

E. coli es un hospedador muy flexible para la producción de proteínas heterólogas, esta producción de proteínas recombinantes implica varias expresiones de proteínas en E. coli, para ello han utilizado los plásmidos para introducir genes en los microbios que han llevado a un alto nivel de expresión de proteínas. Una aplicación muy útil e importante esta tecnología de ADN recombinante fue la producción de insulina humana por manipulación de E. coli. Así mismo las células de E. coli que han sido modificada se han utilizado en el desarrollo de vacunas, bioremediación y producción de biocombustibles. [4].
La bacteria de Escherichia coli (E. coli por su abreviación) suele tener infinidad de pruebas en materia experimental de microbiología, por motivo de ser una bacteria modelo, de manipulación sencilla.
La E. coli se encuentra en el ambiente, y abundantemente en el tracto intestinal de humanos y animales, incluyendo así diversos grupos de cepas. El medio de reproducción de estos microorganismos es [1].

II. METODOLOGÍA

III.1 Materiales

Cubreobjetos
Portaobjetos
Cinta scotch
Valap
Pipetas pasteur
Micropipetas
Puntas
Gas comprimido
Tubos Eppendorf de 15 ml
Microtubos cónicos

III.2 Equipo e instrumentos

Plasma-Cleaner "Plasmaflo pdc-fmg"
Microscopio óptico diseñado por el laboratorio de nanoestructuras I, de IPICYT.
Autoclave

III.3 Preparación de la muestra

Inicialmente se limpiaron cubreobjetos con gas comprimido y toallas de Kimtech para superficies, posteriormente se colocaron uno a uno, en un rack de porcelana el cual una vez listo se colocó dentro del equipo de Plasma-Cleaner Pdc-fmg, a una presión de 1000 mTorr por cinco minuto en la intensidad 110 Volts de luz ultravioleta. Se usaron los vidrios y con ayuda de la cinta scotch doble cara, se elaboraron canales entre los vidrios preparados, posicionando dos cintas a los extremos y dejando una separación al centro, para formar un canal.
Para el cultivo celular, se esterilizó material y caldo Luria (Luria Bertani **LB)**.
En un ambiente aséptico se colocaron dentro de un tubo eppendorf de 15 mL la cantidad de 5 mL de medio de cultivo LB, 5 uL de antibiótico Kanamicina a una concentración de 5 mg/L. A esto se le adicionó la cepa de bacterias de E. Coli GFP que se tomó de un stock previamente congelado y preparado en una concentración de glicerol del 50% y congelado a -80° C. [2]
Se incubó a una temperatura de 28° C, 170 rpm y durante 18 horas.

Previo a la toma de muestra se diluyeron las bacterias $^1/_9$; tomando 23 uL de bacterias y diluyendo en 243 uL de medio LB, posteriormente a esa solución de le adicionaron 30 uL de solución salina a 1M. Para la fijación de bacterias.
De esta solución final se tomaron de 7 a 10 uL para introducirlos en los canales anteriormente realizados con los cubreobjetos. Se inyecto en los canales y se selló finalmente la apertura inicial y final del canal con valap.
La observación a microscopio óptico fue trascurridos los 15 minutos de reposo de la muestra. El software LAbView fue en el que se manipulaba el control de la platina y los contrastes de luz, etc. Se tomaron imágenes a campo claro de las bacterias de E. Coli en foco.

Esas imágenes se procesaron en el apartado de deconvolutionLab instado en el programa de ImageJ. Anteriormente se trabajó en la solución de la integral: $PSF_{(X,Y,Z)} = \int_0^1 J_0[kNA\rho\left(X^2 + Y^2\right)^{1/2}\Big] * \sin(knz\{\left[1 - \left(NA\,^{\rho}/_{n}\right)^2\right] - 1\})d\rho$ para determinar la PSF específica con la cual se trabajaron las imágenes capturadas.
Se dio el procesamiento de deconvolución a todas las imágenes capturadas en el software mencionado anteriormente.
Las variables empleadas en la solución de la integral para la PFS fueron; NA= 1.3, $\lambda = 450nm$, n=1.515, 100 px en x & y. [2]

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

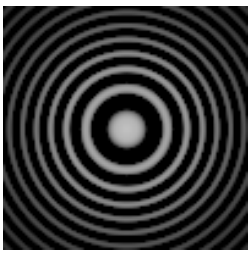


Fig. 1.- Perfil de PSF

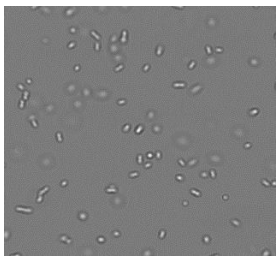


Fig. 2.- Bacterias E. Coli

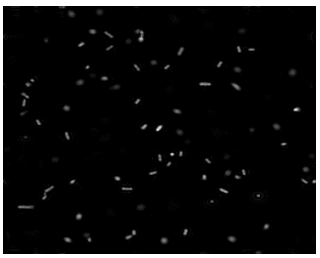


Fig. 3.- Deconvolución fig. 2

Fig. 4.- Bacteria a z= 2.0 um

Fig. 5.- B. con deconvolución

Fig. 6.- Formato tif, bacteria

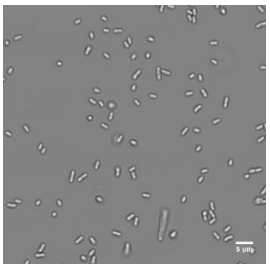


Fig. 7.- Bacterias a z= 2um

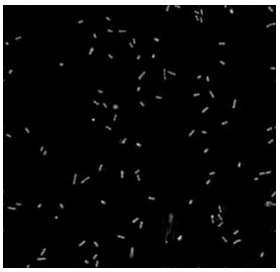


Fig. 8.- Deconvolución bact.

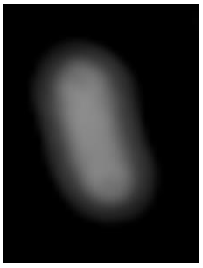


Fig. 11.- Zoom de deconvolución

La restauración imágenes mediante deconvolución, es un paso importante de corrección de error sistemático definido por el uso de procesadores de señales o imágenes, tales como los microscopios con los cuales para una medición

cuantitativa de las intensidades de píxeles en la imagen define un mejor análisis. Si no corregimos este error sistemático, los resultados del análisis de intensidad de la imagen podrían ser mucho más incorrectos que si corrigé antes del análisis. Es establecer el cero de la imagen a procesar y analizar posteriormente.

La calidad de la imagen se distingue por la resolución de la misma, en las imágenes procesadas se observan definidos los contrastes de las células deconvolucionadas, cada imagen con un contraste impreciso fue modelada matemáticamente con la función de extensión de punto que se resolvió en el programador MatLab, es importante considerar que si hay variaciones en la morfología y estructura celular se pueden conocer numéricamente el grado de afectación de un célula, se encontró la forma conocida de la estructura de bacterias E. Coli, que son los bacilos, es una célula modelo con lo que se trabaja fácilmente, se observó una complicación que implica el uso de microscopia a campo claro ya que dado que las bacterias tienen el citoplasma incoloro y el índice de difracción no difiere mucho entre el vidrio y el agua, es una ubicación subjetiva definir el foco de la bacteria, es decir en que posicionamiento de la platina hay que trabajar para realizar una restructuración adecuada. Sin embargo en el visualizador de imágenes del microscopio, LabView se logró establecer cuando las bacterias se encontraban en foco gracias a la determinación de un perfil de señal que dictaba los valores en que menos oscilaba el contraste de la imagen a n valor de la posición z, es decir la posición de la platina.

CONCLUSIONES

El procesamiento de señales constituye una serie de pasos internos dentro de un procesador de éstas mismas, en el caso de las imágenes obtenidas a campo claro en un microscopio la resolución de la imagen varia tanto como sea la apertura numérica, para restaurar se usó un apartado denominado deconvolutionlab, del programador ImageJ, se usó para restaurar detalles de muestras de células cultivadas a un mismo parámetro. Usando el algoritmo Tikhonov-Miller.

Se afirma que el uso de la deconvolución de restauración de imágenes amplia el conocimiento acerca de la morfología de una célula bacteriana y se propone que el empleo de esta técnica abarque una investigación en bactericidas que causen modificaciones en la morfología celular.

Así como se comprende que el algoritmo es específico para el empleo a cierto objeto y ciertas variables del equipo.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a las instituciones que dirigen el Verano de la Ciencia y que nos permiten hacer un intercambio del lugar de estudio. A CONACYT, IPICYT y al investigador anfitrión del instituto, el Dr. Braulio Gutiérrez, a mi alma máter la Universidad Autónoma de Querétaro y a los maestros de la misma por su instruido apoyo, Dr. Óscar Arillo, M. Gustavo Pedraza, Dra. Aurora Alvarado, M. Alejandro Núñez Vilchis, M. Erika Álvarez, M. Manuel Jaime, Vania L. Guerra y Luis D. Escobedo.

A mis padres, y hermanos por el apoyo y seguimiento de mis proyectos. A mis grandes amigos de Qro. Y a los nuevos amigos que hice en esta tranquila y agradable Cd. Gracias Alejandra Gutiérrez, Alexis Vázquez, Gamaliel Sánchez,

BIBLIOGRAFÍA

- Hemeg, H. A. (2018). Molecular characterization of antibiotic resistant Escherichia coli isolates recovered from food samples and outpatient Clinics, KSA. Saudi Journal of Biological Sciences, 25(5), 928-931. doi:10.1016/j.sjbs.2018.01.016 [1]
- Gutierrez-Medina, B. (2018). Quantitative Image Restoration in Bright Field Microscopy. *Biophysical Journal*, *114*(3). doi:10.1016/j.bpj.2017.11.2915 [2]
- Kamran M y col. (2014) Escherichia Coli as a model organism. Int. J. Engg. Res. & Sci. & Tech.Vol. 3. No.2. [3]
- R. and S. (2013). Bacteria churn out first ever petrol-like biofuel New Scientist. Retrieved from www.newscientist.com [4]
- Blount, Z. D. (2015, March 25). The unexhausted potential of E. coli. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.05826.001 [5]

- Antibacterial effect of gold nanoparticles against Corynebacterium pseudotuberculosis. (2017, April 28). Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314459917300030 [6]
- Kosov, S., Shirahama, K., Li, C., & Grzegorzek, M. (2018). Environmental microorganism classification using conditional random fields and deep convolutional neural networks. *Pattern Recognition, 77*, 248-261. doi:10.1016/j.patcog.2017.12.021 [7]
- Puil, M. L., Biggerstaff, J., Weidow, B., Price, J., Naser, S., White, D., & Alberte, R. (2006). A novel fluorescence imaging technique combining deconvolution microscopy and spectral analysis for quantitative detection of opportunistic pathogens. *Journal of Microbiological Methods, 67*(3), 597-602. doi:10.1016/j.mimet.2006.05.019 [8]
- Sage, D., Donati, L., Soulez, F., Fortun, D., Schmit, G., Seitz, A., . . . Unser, M. (2017). DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods, 115*, 28-41. doi:10.1016/j.ymeth.2016.12.015 [9]

CARACTERIZACIÓN DE SUSTANCIAS GRASAS EN CUTÍCULAS DE VEGETALES

Diana Gabriela Montoya Anaya[1], Lorena Vargas Rodríguez[2] y Gabriela Arroyo Figueroa[2]

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue la obtención y caracterización de sustancias céreas de las cutículas de *Agave salmiana* y *Opuntia ficus indica* (nopal). En la extracción de sus componentes céreos, se empleó la técnica de reflujo constante en un aparato Soxhlet, ensayada con dos solventes orgánicos a) hexano y b) éter de petróleo, en un periodo de 8 horas. Los resultados respecto al rendimiento (Hexano-Agave 4.5% y Éter-Agave 3.6%; Hexano-Nopal 8.8% y Éter-Nopal 6.1%), color y olor mostraron que las ceras son distintas unas a otras. Las propiedades de punto de fusión (P. f.) y ebullición (P. eb.) para las ceras fueron ensayadas, con un equipo Fisher Johns, y calentando las muestras dentro de un tubo en baño maría respectivamente, en ambos casos monitoreando los cambios físicos con registro de la temperatura. Los valores 67-76.3;54-66.2 y 61.2-69.4;52.5-66.6ºC para P. f. fueron determinados en los dos extractos (hexano; éter) de agave y los dos correspondientes (hexano; éter) también para el nopal, en ese orden. En tanto los P. eb., no se lograron concretar. Se examinó además el índice de saponificación, esta técnica consistió en calentar en reflujo contaste la muestra con una solución hidroalcohólica de KOH, para posteriormente titular con una solución de HCl. Los resultados para índice de saponificación no se lograron precisar debido a que para las cutículas debió modificarse la metodología a mayor peso de muestra (asunto de sensibilidad en la técnica). Derivado de las perspectivas orientadas a las aplicaciones alimentarias no solo de los componentes céreos, sino también de la materia prima (cutículas), se investigó el contenido de oxalatos de calcio en las cutículas, al reaccionar estequiométricamente (los iones oxalatos) con permanganato, determinando $1.14x10^{-5}$ mol y $3x10^{-6}$ mol, valor para $1.81x10^{-3}$g y $4.74x10^{-4}$g de cutícula de agave y de nopal respectivamente.

ABSTRACT

The objective of this investigation was the obtaining and characterization of waxy substances of the cuticles of *Agave salmiana* and *Opuntia ficus indica* (nopal). In the extraction of its waxy components, the technique of constant reflux was used in a Soxhlet apparatus, tested with two organic solvents a) hexane and b) petroleum ether, in a period of 8 hours. The results regarding yield (Hexane-Agave 4.5% and Ether-Agave 3.6%, Hexano-Nopal 8.8% and Ether-Nopal 6.1%), color and odor showed that the waxes are different from each other. The properties of melting point (P. f.) And boiling (P. eb.) For the waxes were tested, with a Fisher Johns equipment, and heating the samples inside a tube in a water bath respectively, in both cases monitoring the physical changes with temperature recording. The values 67-76.3, 54-66.2 and 61.2-69.4; 52.5-66.6ºC for P. f. were determined in the two extracts (hexane, ether) of agave and the two corresponding (hexane, ether) also for cactus, in that order. In as much the P. eb., They were not possible to realize. The saponification index was also examined, this technique consisted in heating at reflux, you counted the sample with a hydroalcoholic solution of KOH, and later titrated it with an HCl solution. The results for the saponification index could not be determined because the cuticle method had to be modified at a higher sample weight (subject of sensitivity in the technique). Derived from the perspectives oriented to the alimentary applications not only of the waxy components, but also of the raw material (cuticles), the content of calcium oxalates in the cuticles was investigated, when stoichiometrically reacting (the oxalate ions) with permanganate, determining 1.14x10-5 mol and 3x10-6 mol, value for 1.81x10-3g and 4.74x10-4g cuticle of agave and nopal respectively.

Palabras Clave: cutícula, ceras, agave, nopal.

[1]Diana Gabriela Montoya Anaya, Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingeniería, Lic. en Ing. Agroindustrial, Priv. Arteaga s/n, Colonia Centro, C.P. 38900, Salvatierra, Guanajuato, México. dianadiana97@hotmail.com

[2]Lorena Vargas Rodríguez y Gabriela Arroyo Figueroa[2], Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingeniería, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Priv. Arteaga s/n, Colonia Centro, C.P. 38900, Salvatierra, Guanajuato, México. vargasrlorena2016@outlook.com

INTRODUCCIÓN

Las ceras en general se han utilizado tradicionalmente para hacer velas para alumbrado, para encerar maderas, papel, telas y cuero, y como conservante entre otros usos. La parafina es el tipo más común de cera para la fabricación de velas; en tanto la cera de abeja además del uso en velas, aparece en cosméticos, farmacia y otros fines (Bennett. H, 1975). En el área alimentaria, las ceras se utilizan para recubrimiento de cítricos que permite no solo mejorar el aspecto de los mismos, sino también controlar su peso, retardar su envejecimiento y en definitiva alargar la vida comercial de los frutos manteniendo las condiciones organolépticas de los mismos (M. González, 2006). Por otra parte, una fuente vegetal abundante en peso seco de ceras, es la cutícula, se trata de una estructura producto de la evolución de las plantas superiores que las aísla y protege del medio externo que les rodea (Kunst y Samuels, 2003; Shepherd y Griffiths, 2006), constituyendo un elemento estructural esencial, de importancia funcional y ecológica. La ultraestructura de la cutícula varía ampliamente entre especies de plantas, tipos de órgano y su estado de desarrollo (Petit-Jiménez *et al*., 2007). No obstante, de esta variabilidad, todas las cutículas están constituidas principalmente de dos tipos de materiales lipofílicos: cutina y ceras cuticulares (Leide *et al*., 2007). La cutina es el principal componente de la cutícula, presente en una proporción que varía desde 40 a 80 % del peso total (Bargel *et al.*, 2006), en tanto las ceras cuticulares son muy variadas constituyendo desde el 20 al 60 % de la masa de la cutícula (Heredia, 2003).

Por lo mencionado anteriormente se estableció como objetivo de esta investigación caracterizar las sustancias céreas de cutículas de agave y nopal para posteriores aplicaciones.

METODOLOGÍA

Extracción de sustancias céreas para cutículas de agave y nopal. Las sustancias céreas fueron extraídas en 3g de cutículas de agave y nopal en aparato Soxhlet durante 8 horas con solventes de baja polaridad a) hexano y b) éter de petróleo, los matraces utilizados para dicho proceso fueron de 250mL adicionados de 3 perlas de ebullición. Una fotografía del proceso extractivo para agave se presenta en la Figura 1. El rendimiento de las ceras se obtuvo a partir de la ecuación 1.

$$Rendimiento\ de\ ceras = (g_{(obtenidos\ de\ cera)} / g_{(empleados\ de\ cutícula)}) * 100 \quad [1]$$

Punto de fusión (P. f.). La determinación del P. f. en las muestras extraídas se observa en las figuras 2a) y 2b), que fue realizada utilizando el equipo Fisher Johns, se consideró para esta técnica ceras de microcristalina, abeja y parafina.

Punto de ebullición (P. eb.). La técnica para determinación de los P. eb. consistió en colocar la muestra a un tubo de ensaye, el cual fue sometido a elevadas temperaturas en baño maría utilizando como medio para difundir el calor aceite comestible (marca tradicional 1-2-3). Los resultados de los valores fueron confusos, debido a que las ceras presentaron un punto de ebullición muy elevado.

Color. Con un atlas de colores (Harald Küppers, 1979), se determinó por comparación visual el color de las ceras tanto de cutícula de agave como de nopal.

Olor. A través del sentido del olfato se hizo la descripción de los olores que desprenden las ceras.

Determinación cualitativa de oxalato de calcio. Una dispersión problema de 0.25g de cutícula vegetal y 20ml agua desionizada (reposada 3 horas y agitada vigorosamente), se mezcló con 5mL de una solución tampón al 0.1 N y pH de 4.1 de ácido acético/acetato, posteriormente, se añadió un par de gotas de una solución de cloruro de calcio al 0.1N. Puesto que otros iones forman un precipitado blanco, se filtró el precipitado y se disolvió en ácido sulfúrico (se añadieron gotas), se agregó una gota de permanganato potásico al 0.1N y se calentó la muestra. Al calentarse la solución de permanganato potásico (de color violeta) se fue decolorando.

Determinación cuantitativa de la cantidad de oxalato de calcio. En solución acuosa (0.25g en 20mL de agua desionizada) de las cutículas de agave y nopal, se determinó la concentración de iones oxalato mediante una

titulación con una solución de permanganato potásico ($KMnO_4$) al 0.01N, el oxalato fue calentado previamente a 70ºC.

Determinación de índice de saponificación. Se peso 0.25g de muestra en un matraz balón de 250ml, se añadió 10ml de una solución hidroalcohólica de KOH al 0.7 N, posteriormente se calentó a reflujo durante 30 min, después que se enfrío a temperatura ambiente se tituló con una solución de HCl al 0.2 N, registrando el volumen de gasto de ácido.

Figura 1. Extracción en Soxhlet con éter de petróleo y hexano de las sustancias céreas de cutícula de agave.

Figura 2. Determinación del punto de fusión de las sustancias grasas extraídas de cutículas. *a) equipo Fisher Johns, b) muestra de cera en su punto de fusión.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de las sustancias céreas extraídas de agave y nopal fue calculado utilizando la ecuación 1, los resultados se presentan en la tabla 1. Se obtuvo un mayor rendimiento de los extractos hexánicos para cutículas de agave y nopal, además cerca del 100% mayor los rendimientos en nopal que agave.

Tabla 1. Rendimiento de componentes céreos de cutículas de agave y nopal extraídos en Soxlhlet

Cutícula de agave	Rendimiento (%)	Cutícula de nopal	Rendimiento (%)
Extracto etéreo	3.6	Extracto etéreo	6.1
Extracto hexánico	4.5	Extracto hexánico	8.8

El punto de fusión de una cera se define como temperatura a la cual el material cambia de estado sólido a líquido. Martindale (2003). Los puntos de fusión permiten orientar hacia los tipos de moléculas presentes en los extractos, los valores determinados se presentan en la tabla 2. Las ceras extraídas con éter de petróleo de agave y nopal presentaron similitud en su rango de P. f., 52-66.6^{o}C y cercanos al referente cera de parafina 50-62^{o}C, pero menor rango de

temperatura que las extraídas con éter (61- 76°C), las cuales además ahora recuerdan más a la cera microcristalina (61-75°C), lo cual indica que el solvente utilizado influye en su P.f.

Tabla 2. Puntos de fusión determinados para ceras extraídas de cutículas de agave y nopal con referentes

Muestra	Temperatura inicial °C	Temperatura final °C	Muestra	Temperatura inicial °C	Temperatura final °C
Cera de agave (Extracto etéreo)	54	66.2	Parafina	50	62
Cera de agave (Extracto hexánico)	67	76.3	Cera de abeja	54	ND
Cera de nopal (Extracto etéreo)	52.5	66.6	Cera microcristalina	61	75
Cera de nopal (Extracto hexánico)	61.2	69.4			

Martindale (2003), cita que la parafina tiene P. f. entre 50 – 61ºC, temperatura útil en fines terapéuticos y es usada como un medio de generación de calor por conducción. Desde el punto de vista químico, las parafinas provenientes por destilación del petróleo son alcanos en los que predominan las cadenas de carbono lineales con longitudes entre los C20 y los C60, acompañadas de cadenas que presentan ramificaciones de C1-C6 y de hidrocarburos que contienen en uno o varios ciclos de 5 ó 6 átomos de carbono (Musser, 1998). Respecto a la cera de abeja, se determinó solo la Temperatura inicial de 54ºC, Coggshall, W L *et al.* (1984), reportaron un P.f de 48- 68ºC, temperatura a la cual se utiliza para fabricación de velas. En el caso de la microcristalina, los valores aquí reportados 61-75ºC, difieren significativamente en la temperatura final con valores de 60-91ºC por Yukiko Eto (2010).

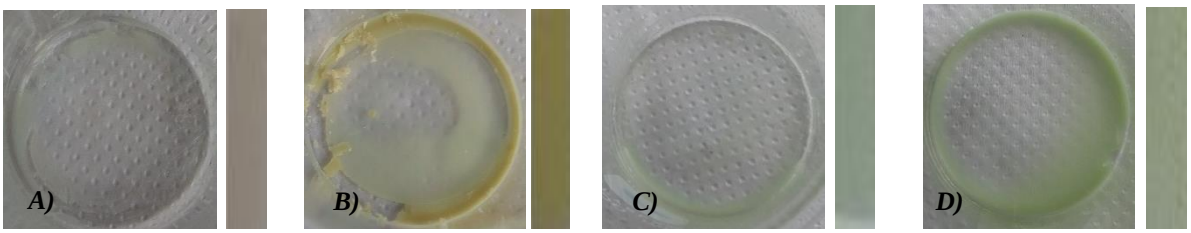


Figura 3. Color de las ceras de agave y nopal. *A) coordenadas A_{20}:M_{00} en cuadrante N_{10} para éter en agave, B) con coordenadas A_{70}:M_{00} en cuadrante N_{30} para hexano en agave, C) Las coordenadas C_{30}:A_{40} en el cuadrante N_{00} y, D) coordenadas C_{30}:A_{50} sobre el mismo cuadrante para éter:hexano en nopal respectivamente. Evaluado en la comparación con la gama de colores del Atlas.*

En cuanto a la observación del color los resultados se muestran en la figura 3; y del olor, las ceras extraídas en general recuerdan a la glicerina y todas excepto la de nopal-hexano se mezcla con un aroma a pencas (vegetal-fresco).

En la determinación de oxalatos de calcio, la prueba cualitativa brindó resultado positivo para ambas cutículas de agave y nopal; no obstante, de la observación visual, la cutícula de agave presenta mayor contenido, según lo indicado en la técnica para el cambio de color del permanganato, ver figura 4.

Figura 4. Determinación de oxalato de Ca en solución de cutícula. Caso fotografiado cutícula de nopal. Técnica cualitativa. *A la izquierda, el color violeta en muestras que evidencia presencia de oxalatos; a la derecha, misma solución luego de haber calentado.*

Se ha reportado que en algunas especies del género *Agave,* se encuentran cristales de oxalato de calcio almacenados en depósitos localizados sobre la superficie cuticular, los cuales pueden estar presentes en diversas formas, estos se convierten en un sistema de defensa contra insectos y animales (Salinas *et al*., 2001). Es bien sabido que el nopal contiene cantidades importantes de minerales entre ellos calcio, encontrándose en forma de cristales de oxalato o en forma libre. Rodríguez *et al.* (2007), reportan que tanto el contenido de calcio variando linealmente y el incremento de tamaño del cristal de oxalato de calcio dependen de la madurez del cladodio al mismo tiempo. Otros trabajos como el de Kostman *et al*. (2001), han demostrado que el ácido oxálico es sintetizado en plantas con capacidad de acumularlo, caso de las *Opuntias*. Así mismo, McConn and Nakata (2004), reportaron que la baja disponibilidad de calcio en el nopal está relacionada con la formación de sales de ácido oxálico. En el ensayo, la titulación triplicada de oxalatos de calcio con $KMnO_4$ (0.01N), comprendió la siguiente reacción:

$5\ C_2O_4^{-2} + 2\ Mn0_4^{-} + 16\ H^{+} \longrightarrow 10\ C0_2 + 2\ Mn^{2+} + 8\ H_2O$

que para cutícula de agave y de nopal se determinó el mayor valor promedio, $3x10^{-6}$ mol en agave respecto a $1.14x\ 10^{-5}$ mol del nopal. Estos valores deben reforzarse con mayor experimentación y técnicas más sensibles, debido a las cifras tan pequeñas aquí determinadas.

CONCLUSIONES

La caracterización de los extractos etéreos y hexánicos de cutículas de *Agave salmiana* y *Opuntia ficus indica* (nopal), obtenidos en la presente investigación demostraron ser diferentes unas a otras; por ejemplo, los extractos etéreos mostraron similitudes con la parafina en su P. f., en tanto los hexánicos fueron más cercanos al de la cera microcristalina. Por lo que se puede estimar aplicaciones de estos extractos cuticulares, pero aún más por ahora asociar a la composición química molecular. Por último, se destaca la elevada resistencia química y térmica cuticular, demostrada con las condiciones de obtención (8h de reflujo constante) de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

ARMENDÁRIZ, J. (2013). *Proceso de elaboración culinaria*. España, S.A. EDICIONES PARANINFO

BARGEL H, *et al.* (2006). "Structure–function relationships of the plant cuticle and cuticular waxes—a smart material? Funct" en Plant Biol. Núm.33, [pp.893-910].

BENNETT, H (1975). *Industrial waxes. Natural and synthetic waxes. Compounded waxes and technology*. New York, Chemical.

COGGSHALL, W L; MORSE, R A (1984). *Beeswax. Production, harvesting and products*. New York, Wicwas Press New York.

HARALD KÜPPERS, (1979). *Atlas de colores*, Barcelona, Blume.

HEREDIA, A. (2003). "Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer" en Biophys Núm. 1620, [pp. 1-7].

KOSTMAN T, *et al*, (2001). "Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts." en Plant Physiol Núm.125, [pp. 634-640].

KUNST L, A L SAMUELS (2003). "Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax" en Prog. Lipid Res. Núm.42, [pp.51-80].

LEIDE J, *et al*. (2007). "The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a β-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6)" en Plant Physiol. Núm.144, [pp.1667-1679].

MARTINDALE (2003). *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*, Barcelona, ARS MEDICA.

MCCONN M, NAKATA P. (2004). "Oxalates reduce calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalates." en J Agric Food Chem Núm.52, [pp. 1371–1374].

M.GONZALEZ (2006). "Horticultura internacional" en Asthor agrícola, S.A. Núm. 41, [pp. 67].

MUSSER, B.J. y KILPATRIK, P.K. (1.998). "*Molecular characterization of wax isolated from a variety of crude oils".* En Energy & Fuels. Núm. 12, [pp. 715-725].
PETIT-JIMÉNEZ D, *et al*. (2007). "Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de Mangifera indica l" en Rev. Fitotec. Mex. Núm.30, [pp.51-60].
RODRÍGUEZ M, *et al*. (2007. "Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation" en Plant Foods Hum. Nutr. Núm. 62, [pp. 107-112].
SALINAS, *et al*., (2001). "Irritant contact dermatitis caused by needlelike calcium oxalate crystals, raphides" en *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. Contact dermatitis. Núm. 44, [pp. 94-96].
SHEPHERD T, D W GRIFFITHS (2006). "The effects of stress on plant cuticular waxes" en New Phytol. Núm. 171, [pp. 469-499].
YUKIKO, ETO (2010). *Formulario medico farmacéutico*, Brasil, Pharmabooks

EFECTO PROMOTOR DE CRECIMIENTO DE PLANTAS DE BACTERIAS DE SUELO DEL AREA NATURAL PROTEGIDA CERRO DEL CULIACÁN

Diana Penélope Ramírez Aguirre[1] y Blanca Estela Gómez Luna[2]

RESUMEN

En el presente proyecto se llevaron a cabo estudios de bacterias que promuevan el crecimiento de plantas del área natural protegida del cerro de Culiacán de Guanajuato. Estas bacterias son aisladas de la misma zona y puesta en práctica para el fin ya establecido. Las bacterias requeridas son de características simples, esto con el fin de poder crecer en medios PDA, ACC y proceder a realizar su función como promotoras de crecimiento ya sea con un mecanismo directo o uno indirecto.
Una de las posibilidades que nos presentan los resultados en este proyecto, es, que dichas bacterias aisladas pueden ser utilizadas en la inoculación tanto en plantas frutales, como en hortalizas, así mismo, son de gran importancia económica ya que funciona como una estrategia para incrementar el desarrollo de diversas plantas y mejorar la producción de estas.

ABSTRACT

In this project we will study what kind of bacteria that promote the growth of plants of protected areas of the state of Guanajuato were carried out. These bacteria are isolated from the same area and put into practice for the purpose already established. The required bacteria are of simple characteristics, this in order to grow in PDA, ACC and proceed to perform their function as growth promoters either with a direct mechanism or an indirect one.
One of the possibilities presented by the results in this project is that these isolated bacteria can be used in inoculation both in fruit plants, as in vegetables; likewise, they are of great economic importance as it works as a strategy to increase the development of various plants and improve the production of these.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día uno de los problemas ambientales más comunes son la deforestación y la contaminación, debido a que estos afectan las condiciones sociales y ambientales del planeta, dado que incrementan la perdida de la biodiversidad; por ello se intenta fomentar procesos de rehabilitación de los ecosistemas y potencializar actividades de investigación y monitoreo constante de las diversas áreas naturales protegidas.
Es por ello que se están considerando sustancias que son reguladores de crecimiento vegetal, que en pequeñas concentraciones son capaces de regular procesos fisiológicos de la planta (Arteca, 1996). Gracias a su capacidad de regular el desarrollo vegetal, los inductores de crecimiento vegetal, en especial los del grupo de las auxinas, son utilizadas en agricultura. En general las auxinas son obtenidas por síntesis química, por lo cual la síntesis microbiológica de estas sustancias resulta ser de gran importancia pudiendo construir una alternativa viable en el contexto de una agricultura ecológica (Castillo et al.2005). Los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas son sintetizadas no solo por plantas, sino por microorganismos, incluidos, bacterias, hongo y actinomicetos (Tudzinzki y Sharon, 2002).
Las bacterias que al mismo tiempo degraden contaminantes orgánicos, y tengan la capacidad de actuar como promotoras del crecimiento vegetal para las plantas, son usadas en los protocolos de fitorremediación permitiendo que el proceso de remediación sea más eficaz debido a la relación que se establece entre la planta y las bacterias (Glick, 2012). Las bacterias que habitan en la rizosfera de las plantas, que viven en terrenos contaminados, tienen más probabilidades de ser buenas degradadoras de compuestos tóxicos, apoyando en las evidencias de las ventajas que aportan las plantas al proporcionar precursores de estructuras similares a los compuestos u objetos de la degradación, todo lo cual potencia dicho proceso al seleccionar rutas de degradación específicaspara estos contaminantes.
Dicho lo anterior, esto indica que la riosfera de las plantas en ambientes contaminados pudiera ser una fuente potencial de bacterias tolerantes y con capacidad de degradar cualquier compuesto que se encuentre en el ambiente,

1Universidad Autónoma De Coahuila, Ciencias Biológicas; Carretera Torreón Matamoros km 7.5C.P: 27000, Torreón, Coahuila. angelita_doki@hotmail.com
2Universidad de Guanajuato. IngAgroindutrial, Prolongacion Rio Lerma s/n Celaya, Guanajuato, C.P 38060, Celaya Guanajuato. be.gomez@ugto.mx

siendo así el motivo de esta investigación, determinar características de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en cepas aisladas de la rizosfera en suelos protegidos del estado de Guanajuato.

MÉTODOS Y MATERIALES

Muestreo de suelo: se tomaron muestras de suelo del área natural protegida del cerro de Culiacán, Guanajuato principalmente es bosque de encino, bosque tropical caducifolio y matorral crasicaule, con diferentes estados de alteración, reportándose 31 especies de quelicerados, 128 de insectos, 10 de anfibios, 21 especies de reptiles, 107 de aves y 46 especies de mamíferos.
El muestreo se realizó extrayendo centros de suelo ubicados a 10 cm de profundidad de la base del tronco (rizósfera). Estas muestras se guardaron en bolsas de polietileno y se almacenaron hasta dicho procesamiento.
Aislamiento y purificación: el procedimiento para el aislamiento de las cepas que se encontraron en las muestras de suelo fueron las siguientes: se prepararon botellas con 90 ml de agua estéril, y posteriormente se agregaron 10 gr de muestra de suelo previamente tamizada y lista para su práctica; se mantuvieron en agitación por 150 min y posteriormente se dejó sedimentar por 30 min.
Se tomo una muestra de cada uno de los frascos y se inoculo en placas con medio selectivo ACC, mediante el sembrador de colonias semi-automático AutomaticSpiral® SamplePlaterInterscience. El medio selectivo para ACCdesaminasa(1- amino- coclopropano- 1- carboxilato.), (Dworkin. M y Foster, J. W, 1958). La formula por 1 L. de agua desyilada: 4 g de KH_2PO_4, 6 g de $NaHPO_4$, 0.2 g $MgSO_4$, 1 mg $FeSO_4$, 10 mg H_3BO_3, 10 mg $MnSO_4$, 50 mg $CuSO_4$, 10 mg MoO_3, 7 mg $MgSO_4$, 2% glucosa (p/v), 0.2 % ácido glucónico (p/v), 0.2% ácido cítrico (p/v), 2% agar bacteriológico, el medio se suspende con ACC 3mM (sigma) como única fuente de nitrógeno.
Posterior al aislamiento se obtienen las 10 cepas promotoras del crecimiento de plantas, las cepas se inocularan en caldo de extracto de papa, por L 200 gr de papa, se hirvió en 1 L de agua destilada durante 20 min, se filtró el agua con algodón y gasa, agrego glucosa al 2%, ajustamos el volumen, por último se esteriliza 15 min a 15 Ib de presión; se vació en tubos falcón 15 ml y en seguida se inoculo con las cepas previamente aisladas, se dejo incubar por 48 hr y procedemos a inyectar. Se aplicó el inoculo a su respectiva línea de la charola de germinación.
Se preparó suelo en la charola de germinación: se tomó sustrato de suelo "Peat" y se mezcla húmeda con tierra para macetas (1:1). Se realizó la siembra de la semilla de rábano (*Raphanussativus)* en la respectiva charola, a una profundidad de 3 mm, posteriormenteagregamos 1 ml de caldo ya inoculado en su respectivo lugar de la charola, se dejó desarrollar hasta obtener un tamaño de raíz apto para la trasplantación de la planta en dicho espacio más adecuado.
Se tomó nota del desarrollo de la planta cada 6 días, obteniendo así el largo del tallo de la planta. Se realizó prueba de germinación para determinar la viabilidad de las semillas.
Tinción de Gram: Secolocaron de 1 a 2 asadas de inoculo sobre un porta objetos para hacer un frotis, se deja secar al aire y posteriormente se fijó con calor frente al mechero, se agregó cristal violeta 1 min (2%), se enjuagó a chorro de agua, se agrega lugol 1 min y en seguida se enjuago hasta desteñir con alcohol- cetona (1:1) o alcohol etílico al 95% por goteo sobre la preparación, hasta que el colorante vaya a la mitad del frotis para la reacción con agua, agregar safranina 1 min (2.5%) y posteriormente se enjuagó a chorro de agua. Se observó al microscopio.

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 10 cepas en medio selectivo para ACC. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de cada una de ellas y su descripción, en seguida en la Figura 1 se muestra imágenes al microscopio.

Tabla 1: Código de las cepas y tinción de Gram obtenidos durante el aislamiento.

Cepa	Gram	Forma	Cepa	Gram	Forma
304	Positivo	Cocobacilos	225	Negativo	Bacilos
254	Negativo	Bacilos	275	Negativo	Bacilos
264	Positivo	Bacilos	313	Positivo	Bacilo/coco
113	Positivo	Bacilos	265	Positivo	Coco/Bacilos
302	Negativo	Cocos	256	Negativo	Cocos

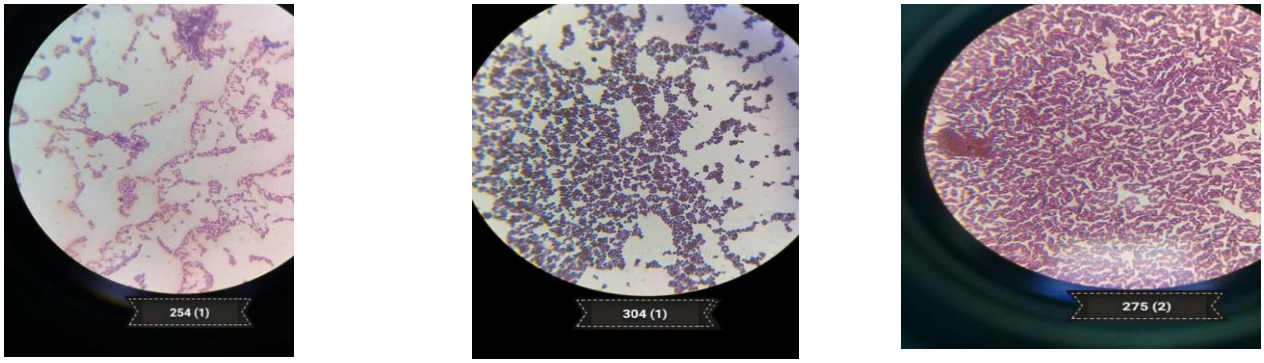


Figura 1. Fotos de algunas tinciones obtenidas de las cepas aisladas (254, 304, 275).

Como dato representativo, se realizó el porcentaje de germinación con el fin de conocer el estado de la semilla, a través del control y utilizando las mismas cepas aisladas; dicho esto se presentó un porcentaje mayor en las semillas inoculadas con las cepas 254, 302, 264, 225, que en el control (sin bacteria). Los resultados se muestran en tabla 2.

Tabla 2: Comparación de porcentaje de germinación de semillas de rábano a 6 días.

Cepa	**Semillas germinadas**	**% de germinación**
Control	7	70%
275	9	90%
265	9	90%
304	9	90%
254	10	100%
302	10	100%
113	9	90%
313	9	90%
256	8	80%
264	10	100%
225	10	100%

Tabla 3: Esta tabla demuestra el número total de semillas germinadas con cada cepa. (10 semillas por cepa).

Cepa	**Crecimiento "cm" (10 semillas c/cepa)**
Control	10
313	10
275	10
225	9
265	10
256	9
302	9
113	10
264	10
254	9
304	9

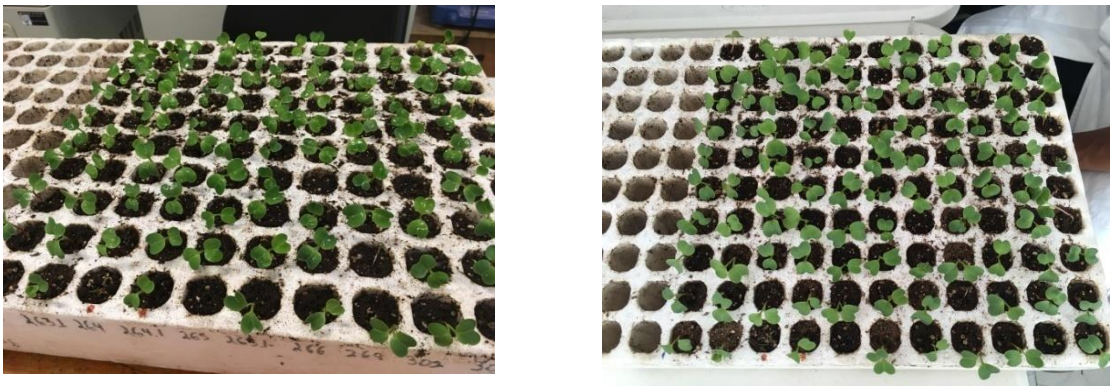


Figura 2. Plántulas en charola de germinación después de transcurrir 6 días de su respectiva siembra.

A continuación, se muestran los datos del desarrollo de la planta después de su correspondiente trasplante a un espacio grande. Figura 3 y en la Figura 4 se observan la imagen de las plantas a 4 semanas de desarrollo.

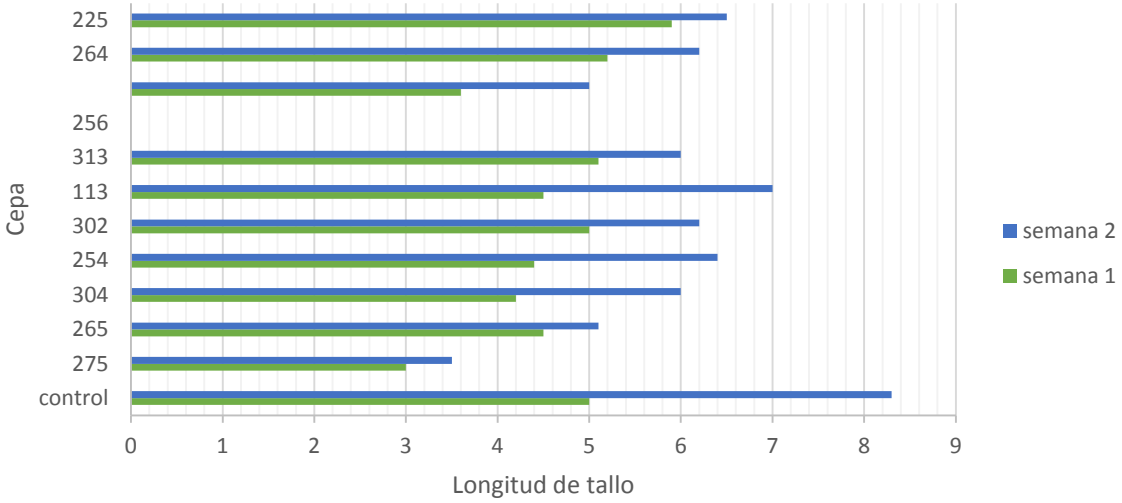


Figura 3: Tasa de crecimiento de rábano trasplantado durante 2 semanas.

Figura 4: Desarrollo de las plantas a 4 semanas.

CONCLUSIONES

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal de las plantas, resultaron ser una excelente herramienta biotecnológica, para favorecer el crecimiento y producción de la agricultura del estado, siendo así un repercursor para la mejora del medio ambiente ya que estas prácticas son amigables para este y contribuyen al mejoramiento y producción agrícola del país.

Las rizobacterias aisladas durante el proyecto muestran tener un efecto directo en el desarrollo de la planta, lo cual representa una alternativa positiva para obtener una mayor y mejor producción de cualquier planta de interés, en este caso ***RaphanusSativus*****,** sin el uso excesivo de productos químicos, reduciendo así lacontaminacion que se ocasiona y/o provoca en los suelos del estado de Guanajuato.

BIBLIOGRAFIA

Hidalgo, A. (2015). Análisis de compuestos involucrados en la promoción de crecimiento de plantas por Rizobacterias de guayaba (Tesis de pregrado). Universidad de Guanajuato, Celaya- Salvatierra.

GLICK, B. R. "Plant Growth-Promoting Bacteria:Mechanisms and Applications". *Scientifica*, 2012, 1, 1-15.

ARTECA, R. N. 1996. Plant growth substances:principles and applications. Primera edición. Chapman & Hall. Pennsylvania, USA. 332p.

CASTILLO, G.; ALTUNA, B.; MICHELENA, G.; SANCHEZ-BRAVO, J. Y ACOSTA, M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biologia, 27:137-142.

TUDZINSKI, B. y SHARON, A. 2002. Byosinthesis, biological role and application of fungal phytohormones. The mycota. 183-205

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS CODIFICANTES PARA BIOPÉPTIDOS DE INTERÉS HUMANO EN PLANTAS

Flores Gasca Diana [1] y Morales Domínguez José Francisco[2]

RESUMEN

Debido a la resistencia que han demostrados algunos microrganismos a los antibióticos, los biopéptidos antimicrobianos surgen como una alternativa a estos fármacos, además de tener función antibiótica, también se ha identificado que tiene otras funciones como: antivirales, antifúngicos, antitrombóticos, antioxidativos, entre otras. Los biopéptidos son fragmentos de proteínas que tienen actividad biológica importante y han sido identificados en diferentes seres vivos, mediante técnicas de biología molecular se analizaron diversas plantas para identificar la presencia del gen para la enzima Rubisco, la cual ha demostrado tener actividad antifúngica, el gen que se identificó tiene homología con el gen de Rubisco en la planta de *Moringa*.

ABSTRACT

Due to the resistance that some microorganisms have demonstrated against antibiotics, antimicrobial biopeptides emerge as an alternative to these drugs, in addition to having antibiotic function, it has also been identified that it has other functions such as: antiviral, antifungal, antithrombotic, antioxidant, and others. Biopeptides are fragments of proteins that have important biological activity and have been identified in different living beings, using molecular biology techniques analyzed various plants to identify the presence of the gene for the enzyme Rubisco, which has been shown to have antifungal activity, the gene that is identified has homology with the gene Rubisco in the plant *Moringa*

Palabras Clave: Biopéptidos antimicrobianos, genes, antibióticos, resistencia.

INTRODUCCIÓN

Un péptido es un polímero de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro. [1] La estructura de los péptidos es menos compleja que la de moléculas proteínicas más grandes, además poseen actividades biológicas significativas. [2]

Los efectos benéficos a la salud por parte de las proteínas podrían ser atribuidos a numerosas secuencias de péptidos que poseen actividades antimicrobianas, antioxidativas, antitrombóticas, antihipertensiva e inmunomoduladores. La actividad se basa en la composición inherente y la secuencia de sus aminoácidos, así como de su estructura. El tamaño de las secuencias activas puede variar de tres a veinte aminoácidos, aunque en ocasiones exceden este tamaño [3]. Los péptidos bioactivos forman parte de la respuesta inmune innata, la mayoría de los péptidos bioactivos producidos en las plantas poseen propiedades microbicidas que representan una nueva generación de antimicrobianos y precisamente es una de las actividades más estudiadas en péptidos [3].

Moringa Oleifera es una planta de zonas cálidas, dicha planta es originaria del Himalaya. En México se encuentra abundantemente en los pueblos de las costas del Pacífico. La planta también se cultiva en los poblados de las depresiones tropicales [4]. Se ha demostrado que la planta tiene propiedades antimicrobianas a nivel *in vitro* y molecular. En una investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se diseñaron 4 oligonucleótidos que amplifican fragmentos que codifican para enzimas con actividad antimicrobiana las cuales son: Glutatión S. Transferasa, Glicosiltransferasa, ATP sintasa y Rubisco.

[1]Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de ingeniería bioquímica; Antonio García Cubas 600, Colonia Fovissste, C.P: 38010, Celaya, Gto., 15031012@itcelaya.edu.mx [2]Universidad Autónoma de Aguascalientes, Laboratorio de biología molecular, Avenida Universidad 940, Colonia Universitaria, C.P: 20131, Aguascalientes, Ags., jfmoral@correo.uaa.mx

Las enzimas mencionadas anteriormente se encuentran conservadas en varias plantas las cuales mostraron contener fragmentos con actividad antimicrobiana. En el verano de investigación se identificaron estas secuencias de péptidos de interés humano en plantas adicionales a Moringa mediante los oligonucleótidos diseñados con anterioridad, específicamente para la enzima Rubisco.

MARCO TEORICO

Las enzimas son biocatalizadores de tipo proteico que ayudan a acelerar las reacciones metabólicas de los seres vivos además de que las enzimas en plantas son de importancia comercial por las propiedades que se le atribuyen como péptidos con propiedades antimicrobianas [1]. La enzima Rubisco también conocida como ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa cataliza el primer paso en la asimilación fotosintética neta de CO_2 y la oxidación fotorrespiratoria de carbono. Debido a que se encuentra en una gran cantidad en hojas verdes, se cree que es la proteína más abundante en la tierra [5]. Además de que se identificó como un péptido antimicrobiano.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) se descubrieron hace más de 90 años. Uno de los primeros reportados es la gramicidina en 1939 y se demostró su efectividad para proteger frente a la infección por neumococos. Son considerados antibióticos naturales presentes en todas las formas de vida, desde organismos unicelulares hasta mamíferos. Destacan por presentar un amplio espectro de actividad frente a hongos, bacterias, virus y protozoos, por lo que tienen una importante acción protectora en organismos que carecen de sistema inmune mientras que en los vertebrados forman parte de la inmunidad innata. Además, no son afectados por las mutaciones que provocan resistencia a los antibióticos clásicos [6]. La mayoría de los péptidos antimicrobianos descritos son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas, aunque existen otros que son el resultado de metabolitos secundarios [7].

Las plantas representan una fuente importante de péptidos con numerosas actividades biológicas tanto para su metabolismo como de importancia para el ser humano, a lo largo de los años los péptidos han sido aislados de las raíces, semillas, flores, tallos y hojas de plantas y son motivo de estudio por su potencial aplicación dentro de la biotecnología, además debido al incremento en la resistencia de los microorganismos a los fármacos disponibles, se buscan alternativas que permitan sustituir estos fármacos por péptidos bioactivos.[1]

Los péptidos y proteínas expresan su actividad antimicrobiana ocasionando lisis por unión y ruptura de la membrana de los microorganismos, otros penetran la membrana e interactúan con el interior de la célula ocasionando la formación de poros, produciendo que el contenido intracelular salga y por ende, causando su muerte. [8]

En plantas se han identificado diferentes PAM. Las thioninas se sintetizan predominantemente en hojas y flores y tienen una clara actividad contra hongos y bacterias. Del mismo modo, las defensinas tienen una marcada actividad contra hongos. Aparentemente la función de los PAM es proteger a las semillas durante la germinación, período en el que su concentración llega a ser hasta el 30% del total de proteínas liberadas. Otros ejemplos de PAM de origen vegetal son las heveinas y knottinas que son eficientes en combatir infecciones causadas por hongos y bacterias Gram+ así como las circulinas A y B del árbol tropical africano *Chassalia Parvifolia*. Estos últimos son péptidos circularizados, resistentes a la acción de proteasas y además tienen actividad. [9]

MÉTODOS Y MATERIALES

1. Extracción de DNA

Se trabajó con hojas de *Stevia Rebaudiana* y de *Citrus Sinensis* (Naranjo) las cuales fueron cortadas y lavadas con agua destilada. Para la extracción de DNA. El material vegetal se pulverizó con nitrógeno líquido y se colocó en tubo Eppendorf de 1.5mL, sin dejar descongelar se añadió 800 µL de buffer de lísis y 2.4 µL de β-Mercaptoetanol, se mezcló por inversión y se incubó a 65°C por 15 minutos con el fin de romper la pared y membrana celular para liberar el material genético

Con el fin de eliminar algún otro tipo de proteína del material genético se colocó la muestra en hielo durante 5 minutos y se añadió 500 µL de fenol-cloroformo, se mezcló hasta emulsificar, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min (12K/5min), enseguida se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio, se agregó 500 µL de fenol-cloroformo, se

emulsificó y centrifugó a 12K/5min, se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio, se adicionó 500 mL de cloroformo-alcohol isoamílico, se emulsificó y centrifugó a 12K/5 min.

Finalmente para precipitar el DNA se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló por inversión durante 1 min y se incubó a -20°C por 10 min, se centrifugó a 12K/5 min y se eliminó el sobrenadante, se agregó 200 µl de etanol al 70% y se mezcló por inversión, se centrifugó a 12K/5 min, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla, por último se suspendió con H_2O destilada estéril.

2. Determinación de concentración y pureza de DNA

Para comprobar que efectivamente se realizó la extracción de DNA se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV.
Para determinar la pureza y concentración de la muestra, se utilizó el espectrofotómetro para leer la absorbancia (A) con una longitud de onda (λ) a 260 y 280, y aplicar las siguientes fórmulas:

$$\textbf{\textit{Pureza}} = \textbf{\textit{A}}260/\textbf{\textit{A}}280 \quad (1)$$

$$\textbf{\textit{[µg/mL]}} = (\textbf{\textit{A}}260 - \textbf{\textit{A}}280) * \textbf{\textit{Factor dilución}} * 50\ \textbf{\textit{µg/mL}} \quad (2)$$

3. Amplificación del fragmento por PCR

A partir del DNA extraído de *Stevia Rebaudiana* y *Citrus Sinensis* se realizó PCR para la identificación del fragmento, adicionalmente se realizó la amplificación con DNA disponible en el laboratorio que corresponde a algunas, cactáceas, agaves, nolinaceaes, ajo, caña y guayaba. Si la muestra realmente tiene el péptido de interés deberá de amplificar con el oligonucleótido para Rubisco diseñado a partir de *Moringa Oleifera*.
En un microtubo Eppendorf agregar 6.25 µL del kit comercial Hot Start Aligenment, 3.25 µl de agua, 1 µl de cada oligonucleótido F y R y 1 µl de DNA, los cuales fueron puestos en un termociclador Select-Cycler II, bajo las siguientes condiciones de amplificación, especificadas en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación

Ciclos	Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Pre-desnaturalización	5	94
30	Desnaturalización	1	94
	Alineamiento	1	50
	Extensión	1	75
1	Extensión final	7	75

Las muestras amplificadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV.

RESULTADOS

1. Extracción de DNA

En el gel de agarosa se observó una banda correspondiente al DNA de hojas de *Stevia Rebaudiana*

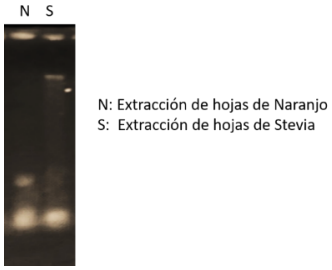


Figura 1. DNA de Stevia Rebaudiana y de Citrus Sinensis en gel de agarosa al 1%

2. Determinación de concentración y pureza de DNA

Con las lecturas en el espectrofotómetro se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración y pureza de DNA

DNA	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Concentración (*µg/mL*)	Pureza
Naranja	0.0422	0.03567	32.65	1.44680
Stevia	0.01983	0.01117	43.3333	1.776119

3. Amplificación de fragmento por PCR

A partir de la extracción de Stevia se amplifico para Rubisco

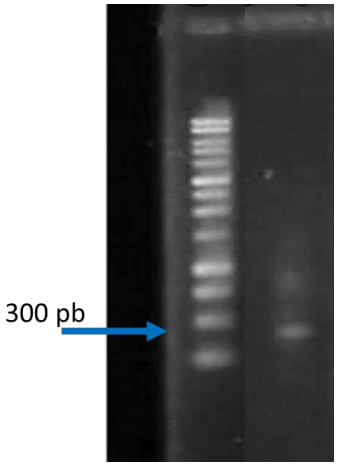


Figura 2. PCR de Stevia en gel de agarosa al 1%

Como se observa el DNA amplificó para Rubisco, se observa una banda obtenida tenue, se ha reportado que para Rubisco la banda es de aproximadamente 350 pares de bases (pb) y en este caso se obtuvo una banda cercana a los 300 pb.

A partir de la extracción de DNA de otras plantas disponibles en el laboratorio correspondientes a Cactáceas (C), Agaves (A) y Nolinaceae (N) y se decidió probar la presencia de PAM en fragmentos de Rubisco, se sometieron a PCR con las condiciones mencionadas anteriormente obteniendo los siguientes resultados

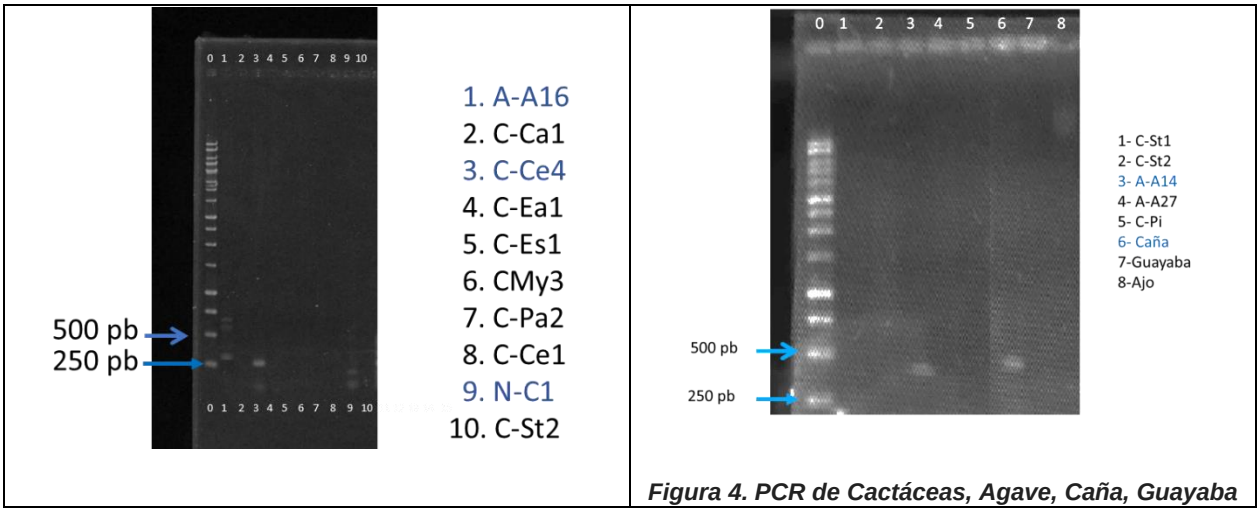


Figura 4. PCR de Cactáceas, Agave, Caña, Guayaba

Figura 3. PCR de Agave, Cactáceas y Nolinaceae para el gen de Rubisco en gel de agarosa al 1%	***y Ajo para el gen de Rubisco en gel de agarosa al 1%***

El gen de Rubisco amplifico para Agave A-A14 y A-A16, para Cactácea C-Ce4, Nolinaceae N-C1, y Caña en el caso de la planta A-A16, C-Ce4, A-A14 y Caña se observan bandas entre los 250 y 500 pb y coinciden con los datos reportados para *Moringa Oleifera*.

CONCLUSIÓN

Se identificó mediante PCR el fragmento de gen de la enzima de Rubisco para las plantas de: Stevia, Agave A-A14 y A-A16, así como en cactácea C-Ce4 y Caña, este fragmento identificado corresponde a una secuencia de aminoácidos el cual ha sido reportado en trabajos anteriores mediante técnicas bioinformáticas que tiene actividad antifúngica, el biopéptido que se identificó es homólogo al reportado en la planta *Moringa Oleifera* que cuenta con un tamaño cercano a los 300 pb, lo que concuerda con la banda obtenida en la electroforesis paralas plantas mencionadas anteriormente.

BIBLIOGRAFIA

Libros

[1] VOET, D., VOET, J. & PRATT, C. (2009) Fundamentos de bioquímica. Buenos Aires, Medica Editorial Panamericana

[2] MCKEE, T. & MCKEE, J. (2014) Bioquímica: Las bases moleculares de la vida, McGraw Hill Interamericana.

[8] RIVAS, C., ORANDAY, A. & VERDE, M. (2016) Investigación en plantas de importancia médica, Nuevo León, Omnisciencia.

Artículos de revista

[3] CABELLO, E., NÚÑEZ, M., & TORRES, V. (2016).” Actividad biológica de proteínas y péptidos.” En Rivas, C., Oranday, M.A., & Verde, M. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España, OmniaScience. 313-350.

[4] OLSON, M. & FAHEY, J. (2011)” Moringa oleífera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas” en Revista Mexica de Biodiversidad, Núm 82 [1071-1082]

[5] SPREITZER, R. (2002). “Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme.” en Annu Rev Plant Biol, Núm. 53, [pp. 449-475].

[6] GONZALEZ, M., SAN JUAN, J., MORALES, V. & OTERO, A. (2005)”Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas” en Revista cubana de medicina tropical, Núm. 2, Vol. 69.

[7] TELLEZ, G. & CASTAÑO, J. (2010) “Péptidos antimicrobianos” en Infectio, Núm.1 , Vol.14 , [pp. 55-67]

[9] MONTAÑO, K. & VARGAS, F. (2002) “Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro” en Interciencia, Núm. 1, Vol. 27, [pp. 21-27]

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MESTIZOS DE MAÍZ GENERADOS CON DOS PROBADORES CONTRASTANTES-I

Elisabeth Arellanes Jiménez[1] y Armando Espinoza Banda[2]

RESUMEN

Con el objeto de seleccionar las líneas con mejor aptitud combinatoria, en el verano de 2018 se evaluaron en el Campo Experimental de la UAAAN-UL 17 mestizos, dos híbridos y un probador de amplia base genética. La siembra se realizó el 14 de abril, en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones y la parcela experimental fue de dos surcos de tres metros de largo y 0.75m de ancho. En el actual reporte se analizaron las variables emergencia (EME), Floración masculina (FM) y femenina (FF). No se observó diferencia significativa para emergencia, en tanto que para floración masculina y femenina mestizos y testigos fueron estadísticamente diferentes. De los mestizos, el EN-04-2 x Ch fue el más precoz tanto en la floración masculina como la femenina. El testigo y probador Chojo, fue el de mayor precocidad con 50 y 52 días a FM y FF. Los testigos comerciales, fueron los más tardíos comparados con mestizos y probador. El mestizo EN-04-2 x Ch mostró el mayor valor negativo de ACG para FM y FF, lo cual es deseable por su precocidad

ABSTRACT

In order to select the lines with the best combinatorial aptitude, in the summer of 2018, 17 mestizos, two hybrids and a tester with a broad genetic base were evaluated in the Experimental Field of the UAAAN-UL. Planting was carried out on April 14, in a randomized block design with three replications and the experimental plot was two rows three meters long and 0.75m wide. In the current report, the variables emergency (EME), male flowering (FM) and female (FF) were analyzed. No significant difference was observed for emergence, while for male and female flowering, mestizos and controls were statistically different. Of the mestizos, the EN-04-2 x Ch was the earliest in both male and female flowering. The witness and tester Chojo, was the one of greater precocity with 50 and 52 days to FM and FF. The commercial witnesses were the later compared with mestizos and tester. he mestizo EN-04-2 x Ch showed the highest negative value of ACG for FM and FF, which is desirable for its precocity.

PALABRAS CLAVES

Mestizos, ACG, Probador.

INTRODUCCIÓN

México es el en centro de diversidad genética del maíz, y sus depósitos de germoplasma han contribuido de manera decisiva a la producción mundial del grano (Nadal, 2000). En los programas de mejoramiento genético modernos para maíz, el enfoque principal ha sido orientado a desarrollar paquetes tecnológicos para producir variedades con alta uniformidad y potencial de rendimiento. Este conjunto de factores han contribuido a reducir las opciones de diversidad genética utilizada en el desarrollo de variedades mejoradas, así como los criterios de selección aplicados en la evaluación del potencial genético, justifica emprender (Montenegro, et al., 2002). Sin embargo este método requiere demasiado tiempo para lograr el éxito, por lo que se considera conveniente realizar las pruebas tempranas de selección en base a aptitud combinatoria con el cual se evita una alta inversión de tiempo y dinero. Los probadores son esenciales para el éxito de un programa de mejoramiento de híbridos y donde se pueden utilizar diferentes tipos de materiales, incluyendo poblaciones, sintéticos, híbridos y líneas endocriadas, (Mendoza *et al*. 2000).[5]

Puesto que el comportamiento de las líneas *per-se* no provee una buena medida de su valor en combinaciones híbridas, el desarrollo de metodologías simples, rápidas y adecuadas para evaluar nuevas líneas ha sido un problema

[5] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Fitomejoramiento. Saltillo 400 # 462 colonia Valle Verde, C.P. 27054, Torreón Coahuila de Zaragoza.
Eli_emrriz@yahoo.com
[2]Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez S/N. Torreón, Coahuila, México. C. P. 27054. aebanda7@yahoo.com.mx

en la generación de híbridos con alto potencial productivo. El uso de la ACG y ACE como herramientas en el mejoramiento
genético es muy común no sólo para rendimiento de grano sino para otros caracteres (Lobato *et al*., 2010). Un buen probador debe discriminar y clasificar correctamente los genotipos evaluados (Mendoza *et al*., 2000). El uso de probadores de amplia base genética (Topcross) permite estimar la aptitud combinatoria general (ACG) de las líneas con las que se cruza.

El enfoque principal de un programa de mejoramiento genético moderno para maíz, ha sido orientado a desarrollar variedades mejoradas y/o híbridos (Montenegro *et al.* 2002). Dale y Matzinger (1953) sugieren híbridos por medio de probadores, los cuales empezaron a ocuparse por los años 1920 y 1930, en donde la problemática es que los probadores no daban una respuesta satisfactoria, en cuanto el rendimiento.

Se han realizado investigaciones con probadores de amplia y reducida base genética; En el año de 1990 en el estado de Veracruz, en dos ambientes diferentes, se evaluaron 23 líneas S_3, con dos probadores (reducida y amplia base genética), donde se encontró que el probador de reducida base genética resulto superior pero con significancia en las líneas, más sin embargo el probador de amplia base genética obtuvo el éxito en discriminar las líneas (Mendoza *et al.* 2000).

En Montecillo, Tecamac y estado de México del 2006, se evaluaron 50 líneas S_1 cruzadas con tres probadores: una línea de baja ACG, alta ACG y la variedad original, donde el mejor probador fue la línea de baja ACG, después la variedad original pero con menor valor discriminatorio que la línea de baja ACG, en cambio, la línea de alta ACG no mostro significancia (Lobato *et al.* 2010).

METODOLOGÍA

Actividades de investigación en el período del Verano de la Ciencia: Datos de cruzas Probador x Línea:

Localización. Campo experimental de la UAAAN-UL. Ubicado geográficamente entre 24° 30’ y 27° LN y entre 102° y 105° LO, a 1120 msnm.

El proyecto consto de dos etapas:

Primera Etapa. Durante el primavera-verano 2017 **s**e sembraron 24 líneas tipo braquiticas de maíz y un probador de amplia base genética o criollo identificado como Chojo, proveniente de San Juan de Guadalupe, Durango. Se sembraron dos surcos de tres metros de largo y 0.75m entre surcos por cada línea, con distancia de 0.25m entre planta. El probador se sembró cuatro surcos a tiempo, cuatro a 7 días, dos a 14 días y dos a 21 días después de la siembra de las líneas. Al momento en que empezaron a emerger los jilotes se cubrieron antes de la emergencia de los estigmas. Las líneas se polinizaron con el probador manualmente de tres a cuatro plantas y se autofecundo la primera planta de cada línea. Se cosecharon 17 mestizos el 24 de agosto del 2017, separando cada cruza en una arpilla. Además se tomaron datos de la floración masculina y femenina de líneas y probador.

Segunda Etapa, Para el Ciclo primavera-verano del 2018, se sembraron para la evaluación los 17 mestizos, Además se incluyó el probador (Chojo) y dos híbridos comerciales como testigos regionales. El diseño estadístico fue en bloques al azar, con tres repeticiones.

Siembra: Se sembró el 14 de abril en parcelas de 3m de largo y 0.75m entre surco y, a una distancia entre plantas de 0.15m depositando dos semillas en cada punto de siembra para un total de 84 plantas.

Manejo de cultivo. A los 25 días de después de la siembra cada parcela se aclaró, dejando 21 plantas por surco, para una densidad de 88,888 plantas ha^{-1}.

Control de maleza: Para el control de maleza se aplicó un herbicida pre-emergente HARNESS (Acetoclor: 2-cloro-N-etiximetil etilacet-o-toluidida al 75.3%), la dosis recomendada por la etiqueta del producto de 2.0-3.0 L/Ha a los 5 días posterior a la siembra.

Fertilización: La fertilización se realizó con la fórmula 200-100- 00 (N-P-K), por medio de riego presurizado por goteo con ayuda de Venturi.
Riego: Se utilizó cintilla calibre 6000, con emisores a 20 cm con un gasto de 1L/h y una presión de 7 Lb. La lámina total de riego fue de 59.74 cm y el INIFAP (2017) recomienda una lámina de riego de 65 cm, por lo tanto se encuentra dentro del rango de la lámina.

Control de plagas: Se llevó un control eficiente contra el *spodoptera frugiperda* se utilizó Clorpirifos 48 (Clorpirifos) con una dosis de 0.5-1.5 L/Ha, Kendo (lambda cyalotrina) con una dosis de 0.300 a 0.500 L/Ha, Coragen (Clorantraniliprol) dosis de 0.75-125 mL/100L y *Tetranychus urticae* se utilizó Abamectina (Abamectina) con una dosis de 60-80 L/Ha, Sunfire 240 SC (Clorfenapir) con una dosis de 0.30-125 cc/100L.

Variables evaluadas: Se tomaron datos de días a Emergencia y a floración masculina y femenina.

Análisis. El análisis de las variables se realizó con el programa SAS v.9.0, (2009).

Aptitud Combinatoria General. Este valor se estimó como la desviación del valor medio de cada mestizo respecto a la media general (Jenkins y Brunson, 1932).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza se concentran en la tabla 1. Para la emergencia, no se encontró diferencia significativa entre bloques y tratamientos, pues la emergencia presentó un rango muy estrecho que osciló entre los 6 y 8 días después de la siembra, con un promedio de 7.05 días.
La variable de la floración masculina puede observarse que en los bloques no se encontró diferencia significativa, en cambio, entre tratamientos la diferencia fue significativa. En contraste con emergencia, la floración se dio en un rango más amplio, de los 50 y 64 días después de la siembra, con una media de 57.83 días.

Tabla 1. Significancia de cuadrados medios de tres variables cuantificadas en 17 mestizos y tres testigos en el Campo Experimental de la UAAAN-UL, 2018.

Fuente	Grados de Libertad	EME	FM	FF
Tratamientos	19	0.39 ns	21.21 **	21.13 ****
Bloques	2	0.60 ns	2.46 **ns**	0.816 **ns**
Error Experimental	38	0.21	32.4	2.04
Total	59			
Media		7.05	57.83	60.01

**: Significativo al 5% de probabilidad, ns: no significativo. EME=Emergencia, FM=Floración masculina, FF=Floración femenina.

En la variable de la floración femenina se observó entre bloques no se observa diferencia significativa, no así entre tratamientos donde se detectó diferencia significativa. Los días a floración femenina, muestra un rango más amplio que en floración masculina, de los 50 a 67 días después de la siembra con una media de 60.01 días.

La diferencia que se encontró en las floraciones masculina y femenina es debida a la heterogeneidad que hay entre los tratamientos. En la Tabla 2, se muestran los valores medios de las variables evaluadas. Para emergencia los tratamientos, tanto mestizos como la variedad Chojo y los híbridos comerciales no fueron significativamente diferentes, pues la máxima diferencia que se observó fue de 1.33 días.

Para la floración masculina tanto mestizos como testigos fueron diferentes. El testigo y probador Chojo, fue el de mayor precocidad con solo 50.33 días a floración masculina, estadísticamente diferente al resto. Respecto a los mestizos, el grupo más precoz fueron **EN-04-2 x Ch** con un valor medio de 53.66 días, estadísticamente igual estadísticamente a los mestizos **EN-03-13 x Ch, EN-06-13 x Ch, EN-07-12 x Ch y EN-08-1 x Ch**, con 56.0, 56.33, 56.66 y 57.66 días respectivamente. En contraste, los tratamientos más tardíos fueron los testigos comerciales **Guepardo y RX-8520** con 61.33 y 63.00 días respectivamente y diferentes al resto de los mestizos y el testigo

Chojo. Resalta un grupo de cinco mestizos que muestran 59 y 60 días los cuales son estadísticamente iguales al testigo comercial Guepardo (61.33 días). La máxima diferencia entre los tratamientos la representó el híbrido RX-850 y Chojo con 12.67 días.

Tabla 2. Valores medios y Aptitud Combinatoria General (ACG) de Emergencia, Floración masculina y Floración Masculina de 17 mestizos, en el Campo Experimental de la UAAAN-UL, 2018.

	Medias			ACG		
Tratamientos	**EME**	**FM**	**FF**	**EME**	**FM**	**FF**
EN-02-7 x Ch	6.66 a*	58.30 cde	60.33 bc	-0.3865	0.421	0.318
EN-02-16 x Ch	7.33 a	59.00 bcd	60.33 bc	0.2835	**1.122**	0.318
EN-03-3 x Ch	7.33 a	57.66 cde	60.33 bc	0.2835	-0.219	0.318
EN-03-9 x Ch	7.00 a	57.66 cde	60.33 bc	-0.0465	-0.219	0.318
EN-03-13 x Ch	7.33 a	56.00 ef	59.00 bc	0.2835	**-1.879**	**-1.012**
EN-04-2 x Ch	6.66 a	53.66 f	56.66 c	**-0.3865**	**-4.219**	**-3.352**
EN-05-8 x Ch	7.00 a	57.66 cde	59.66 bc	-0.0465	-0.219	-0.352
EN-05-10 x Ch	7.00 a	59.00 bcd	60.66 bc	-0.0465	**1.122**	0.648
EN-05-12 x Ch	7.33 a	59.00 bcd	60.66 bc	0.2835	**1.122**	0.648
EN-05-15 x Ch	7.00 a	60.00 bc	62.66 ab	-0.0465	**2.122**	**2.648**
EN-06-13 x Ch	7.66 a	56.33 def	59.66 bc	**0.6135**	**-1.549**	-0.352
EN-06-16 x Ch	7.00 a	59.66 bc	61.66 ab	-0.0465	**1.781**	**1.648**
EN-07-7 x Ch	6.66 a	58.33 cde	59.66 bc	**-0.3865**	0.451	-0.352
EN-07-8 x Ch	6.66 a	58.33 cde	60.33 bc	**-0.3865**	0.451	0.318
EN-07-12 x Ch	6.66 a	56.33 def	58.33 bc	**-0.3865**	**-1.549**	**-1.682**
EN-08-1 x Ch	7.33 a	57.66 cd f	59.66 bc	0.2835	-0.219	-0.352
EN-08-12 x Ch	7.00 a	58.33 cde	59.66 bc	-0.0465	0.451	-0.352
Chojo(Ch)	6.33 a	50.33 g	52.00 d			
Guepardo	7.33 a	61.33 ab	62.66 ab			
RX-8520	7.66 a	63.00 **a***	66.00 **a***			

***Tratamientos con la misma letra, son estadísticamente iguales, (Tukey 0.05).** EME=Emergencia, FM=Floración masculina, FF=Floración femenina. La floración femenina muestra menos variación que la masculina, pues la máxima diferencia se observa entre RX-850 y el probador Chojo con 14 días, dos días más que en floración masculina. El híbrido RX-850, fue el más tardío con 66.0 días, estadísticamente igual al híbrido comercial Guepardo (62.66) y al mestizo **EN-06-16 x Ch** (61.66). Se observa a un grupo que contiene a 13 de los 17 mestizos evaluados con valores medios que oscilan de 59.0 a 60.66 días los cuales son estadísticamente iguales. El testigo y probador Chojo, al igual que en floración femenina, fue el de mayor precocidad con 52.00 días y, estadísticamente diferente al resto de los tratamientos.

La magnitud de los valores de ACG (Tabla1) para la variable EME se consideran bajos ya que son menores a la unidad. Con los valores positivos resalta el mestizo **EN-06-13 x Ch** (**0.6135**) el cual tiende a incrementar el número de días a la emergencia, en tanto los mestizos con los valores más negativos, tenderán a requerir menos días para emerger. Para la variable FM, los genotipos EN-04-2 x Ch, EN-03-13 x Ch, **EN-06-13 x Ch y** EN-07-12 x Ch muestran valores de ACG negativos, lo cual indica que transmiten a su progenie la condición genética de la precocidad, en contraste, los mestizos que muestran valores de ACG positivos y mayores a la unidad, condicionaran a ser más tardíos para alcanzar esta etapa fenológica. Para floración femenina (FF), se observa la misma tendencia, los mestizos con valores negativos mayores a la unidad contribuirán con mayor precocidad.

CONCLUSIÓN

Se concluye que de las tres variables evaluadas en los 17 mestizos y sus testigos:
No se observó diferencia significativa para emergencia, en tanto que para floración masculina y femenina mestizos y testigos fueron estadísticamente diferentes. De los mestizos, el EN-04-2 x Ch fue el más precoz tanto en la floración masculina como la femenina. El testigo y probador Chojo fue el de mayor precocidad con 50 y 52 días a FM y FF. Los dos testigos comerciales, fueron los más tardíos comparados con mestizos y probador.
El mestizo EN-04-2 x Ch mostró el mayor valor negativo de ACG para FM y FF, lo cual es deseable por su precocidad.

BIBLIOGRAFÍA

Jenkins, M. T. y Brunson A. M. 1932. Methods of testing inbred lines of maize in cross-breed combination. Am. Soc. Agron. 24:523-530.

Lobato O., R., Molina G., J.D., López R., J.J., Mejía C., J.A. y Reyes L., D. 2010. Criterios para elegir el mejorador probador de la aptitud combinatoria general para rendimiento de grano de líneas. Agrociencia 44(1):17-30.

Montenegro T., Rincón S., H.F., Ruiz T., N.A., León C., H. y Castaños N., G. 2002. Potencial genético y aptitud combinatoria de germoplasma de maíz tropical. Revista Fitotecnia Mexicana Vol. 25 (2): 135-142.

Nadal A. 2000. El caso del el caso de maíz mexicano en el nafta: en el NAFTA: Variabilidad genética y liberación comercial. file:///C:/Users/Isabel/Downloads/grain-893-el-caso-del-maiz-mexicano-en-el-nafta-variabilidad-genetica-y-liberalizacion.pdf

Mendoza M., Oyervides A. y Rodríguez S. 2000. Efectos de dos probadores en la selección de líneas. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 23:79-86.

Dale F., Matzinger. 1953. Comparison of three types of testers for the evaluation of inbred lines of corn. Agron.Jour. 45:493-495.

CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE ENDÓFITOS EN PHASEOLUS VULGARIS

López Salazar Felipe Abraham[6] y Mejía Teniente Laura[7]

RESUMEN

En este trabajo se intenta esclarecer la interacción que presentaron plantas de Phaseolus vulgaris con hongos endófitos aislados de un lirio acuático, ya que estos diversos hongos causaron una diferencia notable en el grosor del tallo de la planta, la altura y el número de trifolios. Estos fenotipos se estudiaron después de un periodo de 14 días posteriores a la siembra de las semillas inoculadas con los 5 diferentes hongos, a los cuales se les intento interpretar su intervención en las rutas de señalización de la planta encargadas de su crecimiento. Para concluir, se intentó volver a aislar estos hongos de los diferentes tejidos de la planta; Hoja de trifolio y Raíz, para definir si realmente estuvieron en la planta.

ABSTRACT

In this work we try to clarify the interaction between plants of Phaseolus vulgaris with endophytic fungi isolated from an aquatic lily, since these diverse fungi caused a notable difference in the thickness of the stem of the plant, the height and the number of trifolium. These phenotypes were studied after a period of 14 days after sowing the seeds inoculated with the 5 different fungi, which were trying to interpret their intervention in the signaling routes of the plant responsible for their growth. To conclude, an attempt was made to isolate these fungi from the different tissues of the plant; Leaf of trifolium and Root, to define if they really were in the plant.

Palabras Clave:

Fitohormonas; Rutas de señalización; Hongos endófitos; Estrés abiótico; Fenotipo.

INTRODUCCION

Se han caracterizado diferentes estilos de simbiosis tomando como base la interacción que conlleva el endófito y la planta, la cual puede ser mutualista o antagónica ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. En base a lo anterior se define como hongo endófito aquel que es aislado del interior de los tejidos de la planta, además de que no causa ningún síntoma de enfermedad. Dichos hongos habitan tejidos vegetales, aparentemente sanos y prevalecen especialmente en tejido de raíz ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Estos hongos se dividen en dos grupos (clavicipitaceous y no clavicipitaceous). Los clavicipitaceos son capaces de infectar solo algunas especies de pastos y no clavicipitaceas se encuentran en los tejidos asintomáticos de otras plantas ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Estos hogos poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica dentro de las plantas, aunque este proceso no se ha establecido del todo ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Se piensa que esta interacción entre el hongo y la planta es por medio de diferentes rutas de señalización que responden a diferentes estímulos como el ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. El ácido abscísico como ruta de señalización ayuda a los brotes que pasan por condiciones de estrés alrededor de las raíces, dando lugar actividad antitranspirante que ahorran agua, además del cierre o apertura de las estomas ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. El ácido salicílico (SA) actúa como señal mediadora contra patógenos. Además de que desempeña un papel durante la respuesta a estreses abióticos tales como sequía, enfriamiento, toxicidad de metales pesados, calor y estrés osmótico ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. El ácido jasmónico controlan las defensas contra ataques de herbívoro e infección de patógenos, además confieren tolerancia a estreses abióticos como el ozono, radiación ultravioleta, alta temperaturas y congelación. También actúa en el crecimiento de la raíz, la floración y senescencia de la hoja ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. El desarrollo de una planta no solo se ve estimulado por

[6] Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón, Ciudad Universitaria, Facultad de Ciencias Biológicas; Carretera Torreón Matamoros Km. 7.5, Ejido el Águila, C.P: 27275, Torreón, Coahuila, felipe_lopez1997@hotmail.com

[7] Universidad de Guanajuato, Campus Celaya Salvatierra, División de Ciencias de la salud e ingenierías; Avenida mutualismo, prolongación Rio Lerma, Colonia Enrique Colunga, Sede Mutualismo, C.P: 38060, Celaya, Guanajuato, laura.mejia@ugto.mx

las rutas de señalización sino también por diferentes fitohormonas que participan en la regulación del crecimiento de la misma, las cuales también se pueden encontrar afectadas por la actividad de endófitos ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Dentro de este grupo encontramos a él etileno, las citoquininas, auxinas y las giberelinas. El etileno es una hormona gaseosa que activa la maduración de la fruta, estimula la germinación, acelera la senescencia, inhibe la elongación, aumenta el crecimiento horizontal, inicia raíces adventicias y programa la muerte celular ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Las citoquininas desempeñan un papel en la embriogénesis, en el mantenimiento de meristemos de raíz, la formación de brotes y el desarrollo vascular ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Las auxinas promueven el establecimiento y el mantenimiento del dominio apical, en respuesta a la luz o a la gravedad. En el nivel celular, controla la división celular y elongación celular al alterar la plasticidad de la pared celular ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Las giberelinas fungen como hormonas de respuesta al estrés abiótico las cuales contribuyen a la restricción del crecimiento de las plantas en la exposición a varias tensiones, incluyendo el estrés de frío, sal y presión osmótica ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Por esta interacción a los hongos endófitos están íntimamente relacionados con la bioquímica de la planta, se les han atribuido algunos factores positivos para la adaptación de las plantas a diferentes fuentes de estrés abiótico **[14]**.

Métodos y materiales

Para la evaluación de la colonización de endófitos en Phaseolus Vulgaris se tomaron 5 diferentes hongos no identificados aislados de un lirio acuático. Con estos 5 diferentes hongos se inocularon las semillas de Phaseolus Vulgaris, a las cuales se evaluaron distintos parámetros para su entender la interacción que tuvieron los hongos con las plantas después de 2 semanas, tomando como día uno el día que se sembraron.

Selección de la semilla e inoculación

Para la elección de las semillas que se iban a utilizar para ser inoculadas con los 5 diferentes hongos se consideró que tuvieran fenotipos similares como: el tamaño, su diámetro y el color. Previo a la inoculación se contaba con la colección de hongos aislados en medios PDA. Para la inoculación de las semillas se preparó una solución de glucosa al 30 % en un matraz Erlen-Meyer de 500 ml como medio fijador, la cual fue esterilizada en la autoclave a 120 ºC por 15 minutos previo a su uso. Posteriormente se colocaron 20 ml de la solución de glucosa al 30 % en cada caja petri con los diferentes hongos y a las cuales se les removió el micelio con un asa digralsky, dichas suspensiones se vertieron en tubos falcón de 50 ml, a los cuales se les adicionaros 6 semillas del grupo elegido previamente para la inoculación. Cuando las estructuras fúngicas estaban fijadas a las diferentes semillas se retiraron de los tubos falcón y se dejaron secar en bolsas de aluminio por 24 horas. Cabe mencionar que al final se obtuvieron 5 distintos grupos de frijoles inoculados con diferentes hongos, más el control el cual no contaba con ningún tipo de hongo fijado a la semilla.

Preparación de las macetas y siembra de las semillas

Para evitar contaminación en nuestras semillas en el momento de la siembra, se limpiaron las macetas con una solución de alcohol etilico al 70% y cloro al 20 %. En el caso de la tierra se utilizó tierra comercial, la cual fue esterilizada en las mimas condiciones que la solución de glucosa al 30%. Posterior a la limpieza y a la esterilización se llenaron las macetas con la tierra hasta ¾ del volumen total de la maceta. Para la siembra de la semilla se tomó una profundidad para todas las semillas de 5 cm.

Invernadero y localización

Para evitar daño mecánico propiciado por el ambiente se colocó una malla sombra en la parte superior de las macetas, se debe aclarar que la malla sombra no interfería en el paso de la luz solar. Para acomodar las macetas se tomaron 6 cuadrantes con condiciones de luz similares donde pudieran estar las macetas pertenecientes a cada tratamiento.

Evaluación de los fenotipos y endófitos

Después del periodo de 14 días se le evaluó a todas las pantas de los diferentes tratamientos el diámetro del tallo, la altura y el número de trifolios que presentaban. Para la comparación de los datos se tomó un promedio con respecto a las medidas de las 6 repeticiones de cada tratamiento, descartando las plantas que mostraban síntomas de enfermedad. En el caso de la evaluación de los endófitos se tomaron muestras de los trifolios y de la raíz de cada tratamiento con el fin de verificar si realmente el hongo colonizo la planta, de manera que se pudiera aislar del interior de la hoja o de la raíz. Previo a las pruebas se prepararon cajas petri con medios PDA, además de una

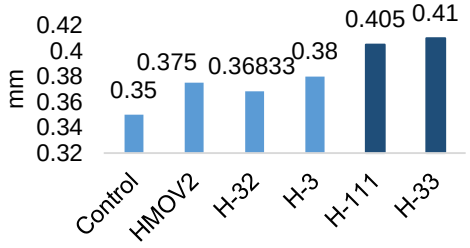
solución de cloro al 10 % y otra de alcohol etílico al 70 %. En el caso de las pruebas de aislamiento se debe desinfectar muy bien la parte exterior de las raíces y las hojas, con el fin de evitar el crecimiento de los microrganismos que pudieran estar presentes en el exterior de la planta. El primer paso para dicho proceso de desinfección fue la inmersión de nuestra muestra vegetal (raíz u hoja de trifolio) en la solución de alcohol por 3 minutos, posteriormente se colocó otros 3 minutos en la solución de cloro y se terminó con 3 lavados en agua estéril de 3 minutos por cada lavado. Cuando el material vegetal había pasado por los tres lavados se tomó una impresión de las muestras en una caja petri con medio PDA. La impresión se lleva a cabo colocando la hoja de trifolio o la raíz encima de la caja y haciendo presión sobre la misma con las pinzas de disección, esto con el fin de inocular la caja con material interno de la planta. En la segunda prueba de endófitos se toma la hoja de trifolio o la raíz que se usó para hacer las impresiones y se coloca en una placa de vidrio estéril para así poder trocear las muestras. Cuando se contaba con la mayoría de la muestra en pedazos pequeños, estos se colocaron distribuidos por una caja petri con medio PDA evitando el contacto de unas con otras, lo cual permitiría el crecimiento de los microrganismos que pudieran estar dentro de la hoja de trifolio o de la raíz. Con el fin de obtener un control en nuestros lavados se tomó un 1 ml del ultimo recipiente donde se lavó la muestra para inocular una caja petri con medio PDA, este control nos permitiría ver que tan efectiva fue la reducción de la carga

Microbiana. Esto quiere decir que si crecieran microrganismos en la caja donde se inoculo con agua los microrganismos que estén en las otras pruebas (impresión y trozos) no serían precisamente endófitos y los lavados no cumplieron su objetivo.

RESULTADOS

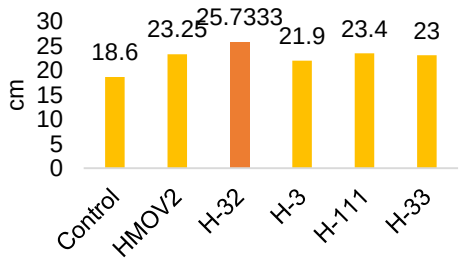
Después del periodo de 14 días se realizó la comparación final de los fenotipos esto con el fin de identificar crecimientos atípicos entres las plantas contrastando los anversos resultados con el tratamiento control. Como se mencionó con anterioridad se tomó el diámetro del tallo, la longitud de la planta y el número de trifolios como base para el estudio de la interacción hongo-planta. En el primer caso se contrasto el promedio del diámetro de los tallos de cada tratamiento, estos resultados se exponen en la tabla de abajo.

Grafica 1
Diametro del tallo



En la ***Grafica 1*** se observa que todas las plantas tuvieron un diámetro mayor con respecto al control, pero se destaca el grosor del tallo perteneciente a el tratamiento H-33, dicho grosor contaba con un diámetro de 0.41 mm.

Grafica 2
Altura de la planta



En la ***Grafica 2*** podemos apreciar como al igual que en la comparación del fenotipo anterior todas las plantas tuvieron un crecimiento mayor con respecto a la planta control, pero en este caso el crecimiento que se midió fue vertical. En esta evaluación el tratamiento representativo de este fenotipo fue el H-32 con 25.7333 cm de altura. En la última evaluación.

(***Grafica 3***) se encontró que el tratamiento H-33 tenía decremento en el número de trifolios promedio, al igual que el tratamiento H-32. Para ver si se logró volver a aislar los endófitos se elaboró una tabla donde se comparaban el crecimiento de los microrganismos en los medio PDA inoculados con diferentes tejidos de las plantas.

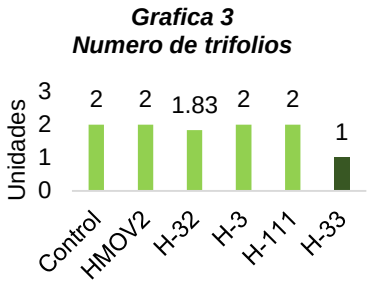


Tabla 1: Comparación de los medios PDA

Tratamiento	HMOV2		H-32		H-3		H-111		H-33	
Parámetro	*H*	*R*	*H*	*R*	*H*	*R*	*H*	*R*	*H*	*R*
Tozos	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Impresión	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
Agua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentos	-		-		-		-	-	-	-

Nota: *El símbolo – representa ausencia de microrganismos, el símbolo + la presencia o el crecimiento de los mismos y el color gris representa, en que parte de la planta hubo mayor colonización.*

En la ***tabla 1*** se puede ver como algunos microrganismos aislados de los diferentes tratamientos muestran producción de pigmentos además se observa también una preferencia por determinada parte de la planta ya que no se encontraban microrganismos en ambas partes de la planta. Es importante destacar que, aunque hubiera crecimiento en los medios inoculados con los trozos provenientes de la raíz o de las hojas de trifolio la colonización siempre será predominante en una parte. A pesar de que las cajas tenían crecimiento, solo de una se pudo re aislar el hongo endófito del tratamiento H-111, ya que las demás cajas había demasiado crecimiento de otros microrganismos. Los cuales impedían la identificación y aislamiento de los endófitos restantes.

DISCUSIÓN

Se debe mencionar que la ruta de señalización del etileno participa como señal, en respuesta a alguna infección y no solamente interactúa en el proceso de maduración de los frutos **[15]**.
En la ***Grafica 1*** se observa que el tratamiento H-33 presento el diámetro con mayor grosor dentro del grupo de estudio. En trabajos previos se ha reportado que el engrosamiento de los tallos es una respuesta a un incremento en la concentración de citoquininas en el tejido vascular **[16]**. Dicho incremento puede ser causado por la disminución en la síntesis de la citoquinina oxido-reductasa, la cual cataliza la degradación de las citoquininas **[17]**.
En el cado de la ***Grafica 2*** esta destaca la altura del tratamiento H-32. Se ha descubierto que el desarrollo del tallo es estimulado por la actividad de otras fitohormonas como las giberelinas y las auxinas **[18]**. En el caso de la giberelina se tiene reportado que existen hongos endófitos con la habilidad de sobre producir estas hormonas en respuesta a un estrés abiótico, dando como resultado una simbiosis entre el hongo y la planta donde el hongo provee este metabolito y la planta le brinda fuente de carbono **[19]**. El tratamiento H-32 es quien tiene la mayor capacidad de producir estas hormonas sin dañar a la planta, hasta este periodo de crecimiento.
En la ***Grafica 3*** se observa que el tratamiento H-33 presento la mitad del número trifolios promedio de la planta control. Cabe mencionar que en este trabajo no se contrasta la cantidad de nódulos presentes en las raíces sin

embargo, toma relevancia a la hora de intentar comprender la falta de trifolios del tratamiento H-33, el cual contaba con una baja cantidad de nódulos. Recordemos que nódulos fijan nitrógeno atmosférico y se lo dan a la planta en forma reducida de amonio **[20]**. Este amonio fijado posteriormente será convertido a aminoácidos y luego a proteína **[21]**. Existen 2 mecanismos para la regulación de la formación de nódulos, uno de estos es la autorregulación por medio de zonas de restricción y el otro es regulación negativa por medio de la ruta del etileno **[22]**. Esto explicaría la disminución de los nódulos, además se ha reportado que la ruta del etileno actúa sinérgicamente con las giberelinas y las auxinas **0**. Este fenotipo de los trifolios se podría explicar con la reducción de la concentración de giberelinas y las auxinas, causada por las citoquinas que engrosaron el tallo las cuales promovieron la síntesis de etileno que actuó sinérgicamente con dichas fitohormonas. De igual manera el nitrógeno fijado convertido a proteína celular está concentrándose en el tallo en vez de en las células apicales. Como el etileno actúa como ruta de señal a una infección, es posible que el endófito H-33 estrese demasiado a la planta de tal manera que exprese estos fenotipos, por la sobre producción de etileno.

CONCLUSIONES

Frente a la evidencia recaudada en este escrito confirmamos que los hongos endófitos que se utilizaron para este proyecto interactúan de manera intima con la regulación del crecimiento de Phaseolus Vulgaris, a través de diversas interacciones de simbiosis entre el hongo y la planta, como lo pudiera ser de la síntesis de algunas fitohormonas de origen fúngico como las giberelinas, haciendo referencia al caso del hongo H-32, el cual hizo que las plantas de este tratamiento expresaran una altura apical mayor a la de las demás plantas. Este punto se ve reforzado cuando analizamos el diámetro del tallo el cual no presentaba una gran diferencia respecto a la planta control, siendo que el engrosamiento del tallo se propone en este trabajo que fue regulado por la sinergia del etileno con las giberelinas y las auxinas, aunque H-32 también presento un descenso en su número de trifolios promedio. En el caso del tratamiento H-33, este hongo pudiera poseer una capacidad de colonización mayor a la de los demás, lo cual se ve reflejado en los fenotipos (Engrosamiento del tallo y bajo número de trifolios) que las plantas de este tratamiento presentaron, las cuales son resultado de una producción mayor a la normal de etileno el cual funge como hormona de respuesta ante infecciones y como se menciono es antagonista con las hormonas que regulan el crecimiento apical. Sin embargo, únicamente en el tratamiento H-111 se consiguió volver a aislar el hongo con el cual se inoculo la semilla en un principio, a partir de los trozos del tejido de la raíz. Este tratamiento junto con HMOV2 y H-3 a su vez presentaron una mayor altura apical y un grosor de tallo mayor al control, pero valores menores a los máximos establecidos por H-32 y H-33 en altura y grosor. Estos tratamientos presentaron un numero de trifolios igual a la planta control lo cual dice que, aunque hubo intervención en el desarrollo de la planta por la actividad del hongo las hormonas de crecimiento se mantuvieron en balance en las diferentes etapas del crecimiento de la planta.

BIBLIOGRAFÍA

[1]. I. Zabalgogeazcoa. (2008). “Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens” Spanish Journal of Agricultural Research, Vol. XI, [pp 138-146].

[2]. Latiffah Zakaria, Muhamad Izham, Muhamad Jamil. (2016). “Molecular Characterisation of Endophytic Fungi from Roots of Wild Banana” Tropical Life Sciences Research, Vol. XXVII, [pp. 153-162].

[3]. Venkatesan Sudha, Ramar Govindara, Kathirvelu Baska. (2016). “Biological properties of Endophytic Fungi” Braz. arch. biol. Technol, Vol. LIX, [pp. 1-7].

[4]. T.S.Suryanarayanana, N.Thirunavukkarasub, M.B.Govindarajulub. (2009). “Fungal endophytes and bioprospecting” Fungal Biology Reviews, Vol. XXIII, [pp. 9-19].

[5]. Muhammad Waqas, Abdul Latif Khan, Muhammad Kamran. (2012). “Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress” Molecules, Vol. XVII, [pp. 10754-10773].

[6]. Sally Wilkinson, Guzel R. Kudoyarova, Dmitry S. Veselov. (2012). “Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management” Journal of Experimental Botany, Vol. LXIII, [pp. 3499–3509].

[7]. Mariana Rivas-San Vicente, Javier Plasencia. (2011). “Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development” Journal of Experimental Botany, Vol. LXII, [pp. 3321-3338].

[8]. Huang Huang, Bei Liu, Liangyu Liu. (2017). “Jasmonate action in plant growth and development” Journal of Experimental Botany, Vol. LXVIII, [pp. 1349–1359].

[9]. William M. Gray. (2004). “Hormonal Regulation of Plant Growth and Development” Plos One Biology, Vol. II, [pp. 1270-1273].

[10]. Yu Hua Wang and Helen R. Irving. (2011). "Developing a model of plant hormone interactions" Plant Signaling & Behavior, Vol. VI, [pp. 494-500].
[11]. Asami Osugi, Hitoshi Sakakibara. (2015). "Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance?" BMC Biology, Vol. XIII, [pp.1-10].
[12]. Michael Sauer, Stéphanie Robert, Jürgen Kleine-Vehn. (2013). "Auxin: simply complicated" Journal of Experimental Botany, Vol. LXIV, [pp. 2565–2577].
[13]. Ellen H. Colebrook, Stephen G. Thomas, Andrew L. Phillips. (2014). "The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress" The Journal of Experimental Biology, Vol. CCXVII, [pp. 67-75].
[14]. Lamabam Peter Singh, Sarvajeet Singh Gill2, Narendra Tuteja. (2011). "Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance" Landes Bioscience, Vol. VI, [pp. 175-191].
[15]. Chao Yang, Wen Li, Jidong Cao. (2017). "Activation of ethylene signaling pathways enhances disease resistance by regulationg ROS and phytoalexin production in rice" The plant journal, Vol. XCVIII, [pp. 338-353].
[16]. David Giron, Enric Frago, Gaelle Glevarec. (2013). "Cytokinins as the key regulators in plantmicrobe-insect interactions: connecting plant growth and defence" Functional Ecology, Vol XXVII, [pp. 599-609].
[17]. Tomas Werner, Vaclav Motyka, Miroslav Strnad, Thomas Schmulling. (2001). "Regulation of plant growth by cytokinin" Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. XCVIII, [pp. 10487–10492].
[18]. Tian-Qiong Shia, Hui Penga, Si-Yu Zeng. (2017). "Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges" Bioengineered, Vol. VIII, [pp. 124–128].
[19]. Muhammad Hamayun, Anwar Hussain, Sumera A. Khan. (2017). "Gibberellins Producing Endophytic Fungus Porostereum spadiceum AGH786 Rescues Growth of Salt Affected Soybean" Frontiers in Microbiology, Vol. XIII, [pp. 1–13].
[20]. Saad Sulieman, Lam-Son Phan Tran. (2014). "Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Metabolism and Regulatory Mechanisms" Int. J. Mol. Sci., Vol. XV, [pp. 19389-19393].
[21]. R. Tischner. (2000). "Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants" Plant, Cell and Environment, Vol. XXIII, [pp. 1005-1024].
[22]. Akihiro Suzuki, Mitsumi Akune, Mari Kogiso. (2004). "Control of Nodule Number by the Phytohormone Abscisic Acid in the Roots of Two Leguminous Species" Plant Cell Physiol. Vol XLV, [pp. 914–922].
Camila P. Cunha, Guilherme G. Roberto, Renato Vicentini. (2017). "Ethylene-induced transcriptional and hormonal responses at the onset of sugarcane ripening" Scientific Reports, Vol. VII, [pp. 1-18].

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE Y QUESOS DE GANADO BOVINO Y CAPRINO, EN LA REGIÓN DEL ALTIPLANO OESTE DE SAN LUIS POTOSÍ

Rodríguez Rangel Felipe Asael[8] y Rendón Huerta Juan Antonio[9]

RESUMEN

La producción de leche es uno de los alimentos de origen animal altamente demandando en América Latina. Se tienen registros que la industria de productos lácteos utiliza leche de ganado bovino principalmente y, en menores cantidades la de caprino y ovino. El objetivo del presente trabajo fue analizar la calidad microbiológica de leche y quesos de ganado bovino y caprino que se producen en la región del altiplano potosino oeste. Se tomaron muestras de leche y queso en distintas comunidades de los municipios de Salinas, San Luis Potosí. Posteriormente se realizaron diluciones transfiriendo 1 mL de la dilución inicial a 9 mL de agua peptonada al 0.1% hasta una dilución de 10^{-10} de acuerdo a la escala de McFarland y siguiendo la técnica de análisis microbiológico de la NOM-243-SSA1-2010 para la detección de *Salmonella* spp, *Escheriquia. coli* y *Staphylococcus aureus* en alimentos lácteos. Se depositó la cantidad de 20 µL en agar Eosina y Azul de Metileno (EMB) para *E. coli*, agar Baird-Parker para *S. aureus* y agar Salmonella-Shigella para *Salmonella* spp. Se obtuvieron los estadísticos descriptivos. Los resultados obtenidos mostraron que las diferentes muestras de queso recolectadas cuentan con presencia de microorganismos patógenos de importancia sanitaria. En conclusión, se detectaron cargas microbianas de organismos patógenos, tanto en leche como en queso de vaca y cabra, de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* spp. superiores a la permitido por la NOM-243.

Palabras clave: Inocuo, queso, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Milk production is one of the high demanded food products in Latin America. There are records in the dairy industry mainly uses milk from cattle and, in smaller quantities, goat and sheep. The aim of this work was to analyze the microbiological quality of milk and the results of dairy and goat cattle that are produced in the region of the western Potosino highlands. Milk and cheese samples were taken in different communities in the municipalities of Salinas, San Luis Potosi. Subsequently dilutions were made transferring 1 ml of the initial dilution into 9 ml of sterile peptonated water until a dilution of 10^{-10} following the McFarland scale and following the microbiological analysis technique of the Official Mexican Standard NOM-243-SSA1-2010, for the detection of the genus. *Salmonella*, *Escheriquia coli* and *Staphylococcus aureus* in dairy foods. The amount of 20 µL from each dilution was deposited in Eosin Methylene Blue agar (EMB) for *E. coli*, Baird-Parker agar for *S. aureus and* Salmonella-Shigella agar for *Salmonella* spp. Descriptive statistics were obtained. The results obtained showed that the different samples of cheese collected have the presence of pathogenic microorganisms of sanitary importance. In conclusion, microbial loads of pathogenic organisms were detected in milk, as well as cow and goat cheese, *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* spp. higher than that allowed by NOM-243.

Key words: Innocuous, cheese, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCCION

La producción de leche es uno de los alimentos de origen animal altamente demandando en América Latina, (Mellado-Bosque, 2010). Se tienen registros en la industria de productos lácteos utiliza leche de ganado bovino en mayor proporción y, en menor cantidad de caprino y ovino (Meyer, 2014). México es un país productor de leche y derivados lácteos; la demanda de estos productos se tienen tanto de explotaciones intensivas, como en establos pequeños familiares con niveles de producción de leche muy baja, debido a la pobre infraestructura, bajo potencial genético de los animales, deficientes programas sanitarios y nutrición inadecuada en ciertas épocas del año (Cesín, 2007). La región del altiplano potosino oeste en los municipios de Salinas, Santo Domingo y Villa de Ramos, se

[8] [1]Coordinación Académica Región Altiplano Oeste, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), carretera Salinas-Santo Domingo # 200, Salinas, San Luis Potosí. C.P. 78600, asael_rdzcab@hotmail.com
[9] [1]Coordinación Académica Región Altiplano Oeste, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), carretera Salinas-Santo Domingo # 200, Salinas, San Luis Potosí. C.P. 78600, antonio.rendon@uaslp.mx

caracteriza por ser una región productora de leche en mayor cantidad de bovino y en menor cantidad de caprino, en el 2016 se registró una producción de leche de bovino de 143,030 miles de litros y de leche caprina 4,018 miles de litros (SIAP-SAGARPA 2016), en la que la mayoría de producción es destinada a la elaboración de queso fresco. Su característica está influenciada por la composición de la leche, especialmente el contenido de grasa, proteína, calcio y pH (Fox. 2017). El queso fresco generalmente presenta se caracteriza principalmente por su pasta blanda, no prensada, con una presentación en forma de cilíndrica de peso variable. Por otro lado, en la región del altiplano potosino, la producción de queso se realiza en establos pequeños rústicos con escaza tecnificación, generalmente en las cocinas de las casas donde habitan los productores, la leche no es pasteurizada y se comercializan en pequeños establecimientos en las cabeceras municipales, sin embargo, no existen registros de que estos productos lácteos se ajustan a las disposiciones y especificaciones sanitarias de la NOM 243-SSA1-2010: Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos Diario Oficial de la Federación (2010), que menciona que *Salmonella* spp debe estar ausente en 25 g o mL, para *Escherichia coli* un máximo permitido de 100 Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL), y para *Staphylococcus aureus* un máximo permitido de 1000 UFC/g, por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de leche y quesos que se producen en diferentes localidades de la Región de Salinas de Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron visitas de campo a seis establos productores de leche y queso en cuatro comunidades de la región de Salinas donde se producen quesos de vaca y/o cabra. Se tomaron muestras de leche y queso las cuales se sometieron a los procedimientos para la toma, manejo y transporte de acuerdo a la NOM-109-SSA1-1994, donde se usaron bolsas de plástico con cierre hermético (Ziploc) que fueron depositadas en una hielera limpia y desinfectada para evitar contaminación, una vez tomada la muestra, inmediatamente se trasladaron al laboratorio para su análisis microbiológico. Además, se realizó una encuesta para analizar las condiciones en las que se produce el alimento.

Preparación de muestras y diluciones.

El análisis microbiológico de las muestras se desarrolló siguiendo las recomendaciones de las Normas Oficiales Mexicanas, NOM-114-SSA1-1994 para *Salmonella*, que se basa en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/agua peptonada al 0.1% y utilizando agar Salmonella-Shigella (Bioxon, BD); NOM-115-SSA1-1994, el método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se basa en el análisis de 1.0 g o mL de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/agua peptonada al 0.1% sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker; NOM-112-SSA1-1994, determinación de bacterias coliformes, se basa en el análisis de 1.0 g o mL de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/agua peptonada al 0.1% sobre la superficie de las placas de agar Eosina y Azul de Metileno (EMB). A todas las muestras de leche y queso se les realizaron diluciones desde 1 x 10 hasta 1 x 10^{10} según la escala de McFarland (MacFaddin, 2005) y se sembraron 20 µL por triplicado en cajas de Petri con sus respectivos agares. Una vez sembradas las cajas, estas se colocaron en una incubadora (Yamato IN 804) a 35° C durante 48 horas.

Análisis estadístico

Los datos del conteo de colonias, se muestran como promedios y desviaciones estándar.

RESULTADOS

Los resultados del análisis microbiológico de las muestras de leche se pueden observar en la Tabla 1. De los seis productores, cinco de ellos producen leche y queso de vaca y sólo uno de cabra. Resulta evidente que aquellos productores que realizan un proceso térmico para evitar la descomposición de la leche, que consiste en hervir la leche, dejar enfriar e introducirla a un refrigerador (Pasteurización sin control), muestran las cargas microbianas más bajas. En comparación con los que no realizan pasteurización alguna. En cuanto a la carga de *Staphylococcus aureus*, la localidad de El Alegre y de Salinas mostraron los valores más altas y superiores a los permitidos por la NOM-243, de 9 x 10^3 y 98 x 10^7 UFC/mL, respectivamente. De igual manera, la mayor carga de *E. coli* se observó en la localidad de Salinas, con valor 40 x 10^4 UFC/mL. Finalmente, las cargas microbianas de *Salmonella* spp, se registraron en la localidad de Salinas, con valor 25 x 10^6 UFC/mL. Esto se debe a que la leche no es pasteurizada y además pudiera deberse al estado de salud de los animales, limpieza durante la ordeña y de los utensilios de ordeña y donde se almacena la leche. En otros trabajos donde se analizó la carga microbiana de leche orgánica, se detectó la

presencia de bacterias mesofílicas y coliformes en leche y productos lácteos, donde las cantidades de UFC/mL estaban por encima del límite permitido por la NOM-243-SSA1-2010 (*Salmonella* debe estar ausente en 25 g o mL, para *Escherichia coli*, un máximo permitido de 100 Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL), y para *Staphylococcus aureus* un máximo permitido de 1000 UFC/g) (Fuentes-Coto *et al*. (2013).

Tabla 1. Análisis microbiológico de muestras de leche en distintas localidades de Salinas, S.L.P.

Localidad	**Punteros**	**El Potro**	**El potro**	**El potro**	**El Alegre**	**Salinas**
***S. aureus* (UFC/ml)**	6×10^2 $\pm 13 \times 10^0$	-	5.8×10^2 $\pm 22 \times 10^1$	-	9×10^3 $\pm 7 \times 10^2$	98×10^7 $\pm 1 \times 10^3$
***E. Coli* (UFC/ml)**	1×10^1 $\pm 5 \times 10^0$	-	68×10^1 $\pm 7 \times 10^0$	-	-	40×10^4 $\pm 33 \times 10^2$
***Salmonella* spp. (UFC/ml)**	-	-	-	-	7×10^0 $\pm 1 \times 10^0$	25×10^6 $\pm 4 \times 10^2$
Pasteuriza la leche	No	Si	Si	Si	Si	No

Se muestran valores medios (Desviación estándar)

- Sin crecimiento de colonias

Los resultados del análisis microbiológico de muestras de queso se muestran en la Tabla 2. Se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos de cinco productores, en tres de ellos las cargas superaban el límite máximo permitido de 1000 UFC/g, el valor más alto observado fue de 30×10^5 UFC/g en un establo de Salinas. En el análisis de *E. coli* se observaron valores superiores a lo permitido de 100 UFC/g o mL por la NOM-243 en tres establos, donde en el establo de Salinas se detectó el valor más alto de 40×10^9 UFC/g. La determinación de *Salmonella* spp. se observó su presencia en las muestras de los seis establos, sin embargo, la NOM-243 menciona que este microorganismo debe estar ausente. A pesar de que el resultado microbiológico en la leche las cargas microbianas son bajas en algunos establos, en las muestras de queso se encontraron cargas microbianas en algunos casos superiores a lo permito por la NOM-243, la posible explicación al aumento en las cargas microbianas se puede deber a la forma en la que realizan la cuajada, ya que en tres de ellas se utiliza cuajo natural, en las entrevistas que se realizaron, los productores comentan que el uso de cuajo natural se debe a que este impregna sabores y aromas deseables por los consumidores de queso a los cuales les venden sus productos. En un estudio elaborado por González-Montiel y Franco Fernández (2015), determinaron la carga microbiana de quesos frescos de aro elaborados en Oaxaca y describen las muestras de queso contienen microorganismos alterantes, patógenos de importancia industrial, tales como; mesófilos aerobios, psicrófilos, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras, que no cumplen con la NOM-243-SSA1-2010.

Tabla 2. Análisis microbiológico de muestras de queso en distintas localidades de Salinas, S.L.P.

Localidad/ origen animal de la leche	**Punteros/ Bovino**	**El Potro/ Bovino**	**El potro/ Bovino**	**El potro/ Bovino**	**El Alegre/ Caprino**	**Salinas/ Bovino**
Tipo de cuajo	Artificial	Natural	Natural	Natural	Artificial	Artificial
***S. aureus* (UFC/ml)**	22×10^1 $\pm 6 \times 10^0$	11×10^5 $\pm 1 \times 10^3$	74×10^3 $\pm 1 \times 10^3$	39×10^2 $\pm 1.3 \times 10^2$	-	30×10^5 $\pm 4 \times 10^4$
***E. Coli* (UFC/ml)**	32×10^3 $\pm 15 \times 10^0$	40×10^3 $\pm 33 \times 10^1$	-	-	-	40×10^9 $\pm 2 \times 10^3$
***Salmonella* spp. (UFC/ml)**	9×10^3 $\pm 133 \times 10^1$	13×10^2 $\pm 54 \times 10^0$	30×10^4 $\pm 38 \times 10^1$	105×10^1 $\pm 13 \times 10$	7×10^1 $\pm 51 \times 10^0$	25×10^5 $\pm 23 \times 10^2$

- Sin crecimiento de colonias

CONCLUSIONES

Se detectaron cargas microbianas de organismos patógenos tanto en leche como en queso de vaca y cabra, los conteos de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* spp., son superiores a la permitido por la NOM-243-SSA1-2010 principalmente en quesos frescos que a pesar de que en ocasiones la leche este pasteurizada, la posible falta de

higiene en los utensilios y equipos en los que se elaboran los quesos, así como el uso de cuajo natural podrían ser la razón de la elevada carga microbiológica en estos productos. Por lo tanto, es posible que el consumo de estos quesos, puedan afectar la salud de consumidor, provocando principalmente enfermedades gastrointestinales.

Es necesario realizar más estudios en el proceso de elaboración de queso fresco, tal como, toma de muestras de utensilios, análisis del cuajo natural y realizar algún proceso de esterilización del cuajo natural por medios físicos. Así como realizar talleres a los productores de Buenas prácticas de elaboración de productos lácteos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al P/PFCE-2018-24MSU0011E-22 por el apoyo otorgado.

REFERENCIAS

Cesín, A., Aliphat, M., Ramírez, B., Herrera, J., Martínez, D. 2007. Ganadería lechera y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México. Técnica Pecuaria en México. 45(1):61-76.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee T.P. 2017. Fundamentals of Cheese Science, Springer New York.

Fuentes-Coto, G., Ruiz-Romero, R.A., Sánchez-Gómez, J.I., Ávila-Ramírez, D.N., Escutia-Sánchez, J. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. Agricultura, Sociedad Y Desarrollo. 10: 419-432.

González-Montiel L., Franco-Fernández, M.J. 2015. Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. Brazilian Journal of Food Technology. 18(3): 250-257.

Mellado-Bosque, M. 2010. Producción de leche en zonas templadas y tropicales. México. Trillas.

Meyer, R. M. 2014. Elaboración de productos lácteos. México. Trillas.

NOM 243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Tomado de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010. Consultado el 20 de octubre del 2017

NOM-109-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos. Tomado de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html

NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Tomado de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/115ssa14.html

NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Tomado de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html

Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. 2006. Dairy Science and technology. Broken Parkway NW. Taylor & Francis Group.

DETERMINACIÓN DE LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR CEPAS FÚNGICAS

Fernando Martínez Armenta[1], Oscar Guadalupe Castillo Martínez[1] y Varinia López Ramírez[2]

RESUMEN

Los metales pesados se consideran uno de los contaminantes más tóxicos en el ambiente y su persistencia requiere una adecuada remoción. Algunos sistemas microbianos presentan tolerancia a metales, así como potencial para su empleo en biorremediación. En este estudio se evaluó la capacidad de crecimiento en medio sólido y en medio con metales pesados a dos concentraciones 3 y 5 mM de una colección de 7 aislados fúngicos, de forma individual y en consorcio. Siete interacciones resultaron mutualistas y 14 antagonistas, dos interacciones se evaluaron en presencia de metales, la interacción M008-ORM18 mostro un mejor crecimiento en cromo a las dos concentraciones. El consorcio fúngico conformado por las cepas M008-ORM18 puede ser considerada para evaluar la remoción de cromo en medio líquido y su potencial uso en biorremediación.

ABSTRACT

Heavy metals are considered one of the most toxic pollutants in the environment and their persistence requires adequate remotion. Some microbial systems have tolerance to metals and the potential to be used in bioremediation. In this study, the growth capacity in solid medium and medium with heavy metals was evaluated at two concentrations 3 and 5 mM of a collection of 7 fungal isolates, in an individually form and in a consortium. Seven interactions were mutualistic and 14 antagonists, two interactions were evaluated in the presence of metals, the interaction M008-ORM18 showed a better growth in chromium at both concentrations. The fungal consortium with M008-ORM18 could be consider to evaluate the removal of chromium in liquid medium and its potencial use in bioremediation.

Palabras clave: Remoción, metales pesados, cromo, hongos, consorcio microbiano

INTRODUCCIÓN

Los problemas de contaminación por metales y metaloides son cada vez más comunes en todo el mundo. Los metales pesados se definen comúnmente como aquellos que tienen una densidad específica de más de 5 g/cm^3 (Järup, 2003). Se consideran uno de los contaminantes más tóxicos en el ambiente por tener efectos nocivos a todos los niveles de la cadena trófica (Beltrán & Gómez, 2016). La persistencia de metales pesados en el medio ambiente requiere un enfoque a largo plazo para minimizar la exposición humana a través de la gestión ambiental, la evaluación y la remediación adecuada en áreas contaminadas (Wijayawardena *et al.*, 2016). Algunos sistemas microbianos de tolerancia a metales tienen potencial para ser utilizados en procesos biotecnológicos, como la biorremediación de metales tóxicos (Cervantes *et al.*, 2006). En entornos naturales, el 99% de los microorganismos existen en forma de consorcios microbianos (Ding *et al.*, 2016). En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de forma individual y en consorcio, 7 aislados fúngicos de la colección del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del ITESI, en presencia de metales pesados (cobre, plomo, arsénico y cromo) a 3 y 5 mM.

MÉTODOS Y MATERIALES

I. Preparación de soluciones stock

Se prepararon soluciones de sales con cada metal usado, siendo dicromato de potasio, sulfato de cobre y arsenito de sodio a 0.5 M y acetato de plomo a 1 M, posteriormente se esterilizaron por filtración.

II. Evaluación del tipo de interacción entre aislados fúngicos y su tolerancia a metales pesados.

Las cepas de hongos evaluadas fueron: *Flavoparmelia sp.*, M007, M008, M9PG2, *Xanthoria sp.*, ORM18 y *Usnea florida*. Para evaluar la interacción, mutualista o antagónica. Se sembraron combinaciones de los aislados en Agar

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. fernando.martinez.aa@gmail.com

[2]Coordinación de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. valopez@itesi.edu.mx

Dextrosa Sabouraud con separación de 0.5 cm entre la pared de la caja Petri y el inóculo y con un ángulo de 180° entre ambos inóculos, el tamaño de los inóculos fue de 5 mm de diámetro.

III. Selección de interacciones mutualistas y su evaluación en metales pesados.

Las interacciones mutualistas se sembraron en Agar Dextrosa Sabouraud con los metales pesados: cobre, cromo, arsénico y plomo a concentraciones de 3 y 5 mM. La separación entre la pared de la caja Petri y el inóculo fue de 5 mm con un ángulo de 180° entre ambos inóculos, el tamaño de los inóculos fue de 5 mm de diámetro. Se inocularon los hongos implicados en las interacciones de manera individual y bajo las mismas condiciones.

i. Medio sólido

Se esterilizó el medio y se agregaron las soluciones de sales con metal a temperatura ambiente para evitar precipitación, se homogenizó el medio previo su vertido en placa. Una vez solidificado el medio, se sembró cada hongo, cuidando que el inóculo quedara en la posición correcta de la placa para facilitar el seguimiento y medición del crecimiento radial. Las cajas selladas se incubaron a temperatura ambiente.

RESULTADOS

La remoción de contaminantes en ambientes específicos requiere del aprovechamiento metabólico de las cepas. En nuestro caso, la selección de aislados que podrían ser empleados de forma conjunta fueron evaluados, con el fin de estimar el tipo de interacción entre ellos. Para ello se utilizaron 7 cepas fúngicas resultando 21 combinaciones, de las cuales 14 fueron antagonistas como se muestra en la Figura 1.

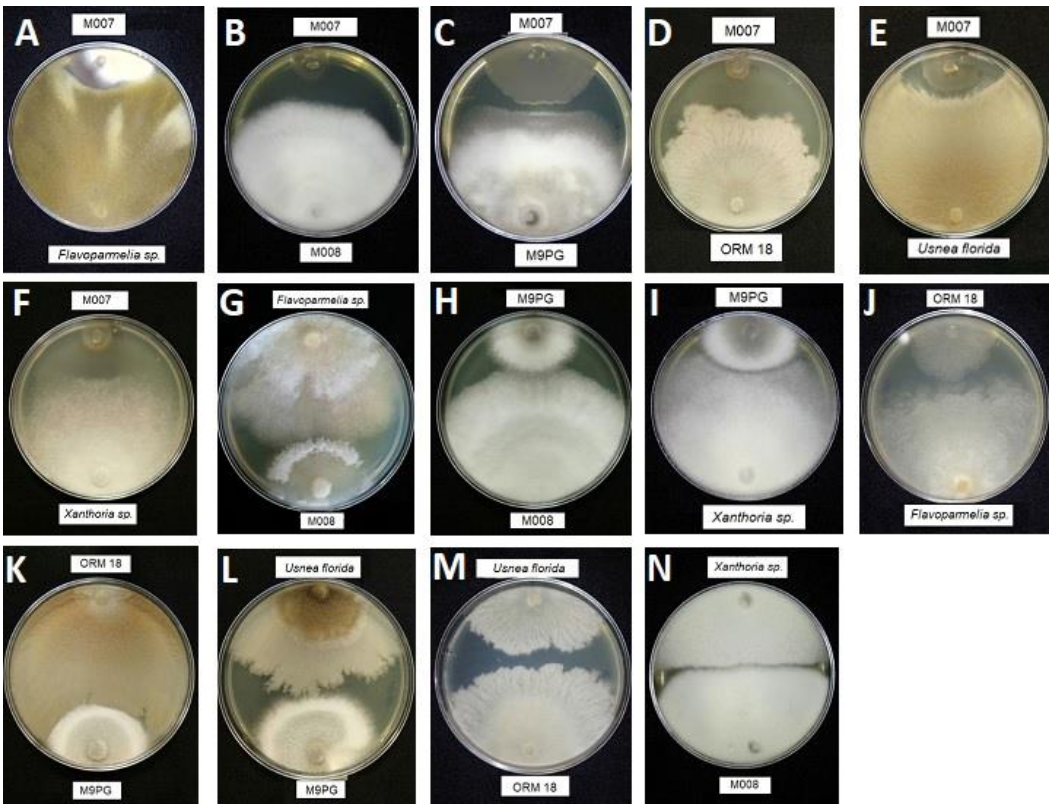


Figura 1. Interacciones antagonistas entre aislados fúngicos evaluados. A. M007–Flavoparmelia sp.; B. M007-M008; C. M007-M9PG; D. M007-ORM18; E. M007-Usnea florida; F. M007-Xanthoria sp.; G. Flavoparmelia sp.-M008; H. M9PG-M008; I. M9PG-Xanthoria sp.; J. ORM 18-Flavoparmelia sp.; K. ORM18-M9PG; L. Usnea florida-M9PG; M. Usnea florida-ORM 18; N. Xanthoria sp.-M008.

El principal criterio de selección como interacción antagonista fue que el micelio de ambos hongos no estuviera en contacto y/o mostrara una separación observable a simple vista. El aislado M007 mostró un halo de inhibición marcado sobre el resto de los aislados, como se muestra en la Figura 1A-1F, esto podría sugerir que el aislado M007 tiene propiedades antifúngicas frente a los hongos con los que fue confrontado, en las interacciones con el aislado

M9PG se muestran también un halo de inhibición, pero de menor tamaño. En el caso de la interacción *Xanthoria sp*. y M008, ambos aislados presentan un crecimiento micelar abundante y de apariencia algodonosa, no obstante, cuando se confrontan presentan una separación marcada entre sus micelios.
De las 21 interacciones resultantes, siete fueron interacciones mutualistas como se muestra en la Figura 2.

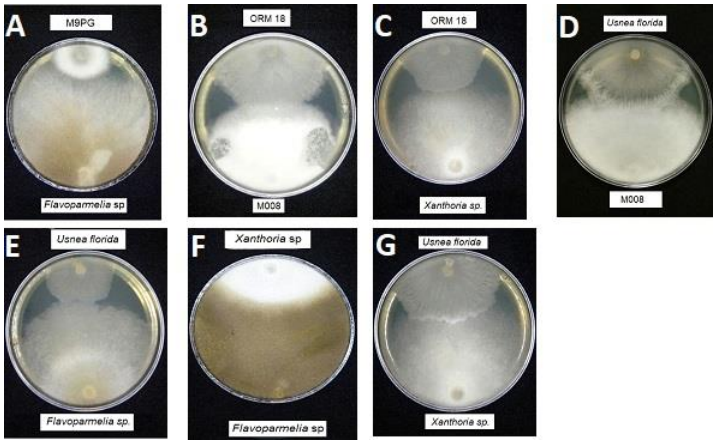


Figura 2. Interacciones mutualistas entre aislados fúngicos evaluados. A. M9PG–Flavoparmelia sp..; B. ORM18-M008; C. ORM18-Xanthoria sp.; D. Usnea florida-M008; E. Usnea florida-Flavoparmelia sp.; F. Xanthoria sp.-Flavoparmelia sp.; G. Usnea florida-Xanthoria sp.

El principal criterio de selección como interacción mutualista fue que el micelio de ambos hongos estuviera en contacto, esto se puede observar con mayor claridad en las interacciones con M008 mostradas en las Figuras 2B y 2D, y las interacciones con *Xanthoria sp*. mostradas en la Figuras 2C, 2F y 2G. Se seleccionaron las interacciones ORM18-M008 y *Xanthoria sp.-Flavoparmelia sp.*, mostradas en la Figura 2B y 2F respectivamente, para evaluar su tolerancia y crecimiento en metales pesados: cobre (Cu), plomo (Pb), arsénico (As) y cromo (Cr) a 3 y 5 mM. Los resultados mostrados en las Figuras (3-6), muestran el desarrollo miceliar a 144 horas de incubación.

En la Figura 3, se observa el crecimiento de las cepas *Flavoparmelia sp.* y *Xanthoria sp.* a 144 horas de incubación. El crecimiento de las cepas de manera individual y en consorcio se muestra en las Figuras 3 y 4, presentando un crecimiento micelar estándar.

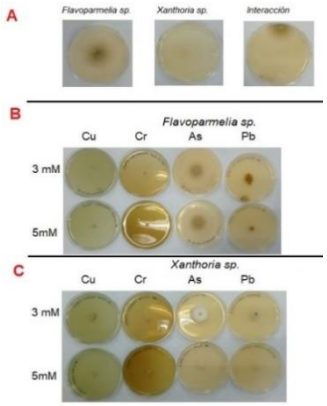


Figura 3. Controles para la interacción Flavoparmelia sp. y Xanthoria sp. A. Aislados individual y en consorcio en agar Dextrosa Sabouraud (ADS); B. Flavoparmelia sp. en ADS con metales pesados a concentraciones 3 y 5 mM; C. Xanthoria sp. en ADS con metales pesados a concentraciones 3 y 5 mM

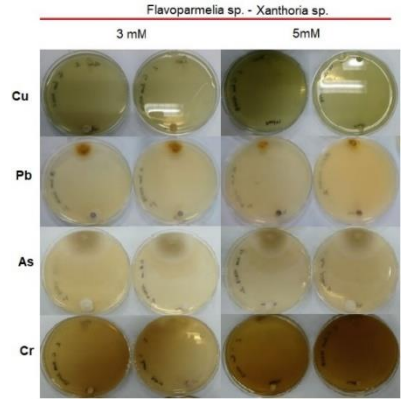


Figura 4. Interacción de Flavoparmelia sp. y Xanthoria sp. en Cu, Pb, As y Cr, a concentraciones 3 y 5 mM.

Flavoparmelia sp. solo mostró crecimiento en arsénico y en plomo, siendo mayor su desarrollo en As a ambas concentraciones, en cambio en presencia de Pb, además de presentar una morfología distinta (Figura 3B). Por su parte, *Xanthoria sp.* presentó un mejor crecimiento en cromo y arsénico a 3 mM, siendo el doble del crecimiento en plomo a 3 mM (Figura 3C). Por otra parte, en la confrontación de los dos aislados fúngicos en presencia de metales, se presentó un crecimiento similar para ambos, en consecuencia, el crecimiento fue mínimo y los micelios no entraron en contacto, por lo tanto, no se considera una interacción favorable (Figura 4).
En la Figura 5, se observa el crecimiento de los aislados M008 y ORM18 a 144 horas de incubación. El crecimiento de las cepas de manera individual y en consorcio se muestra en las Figuras 5 y 6.

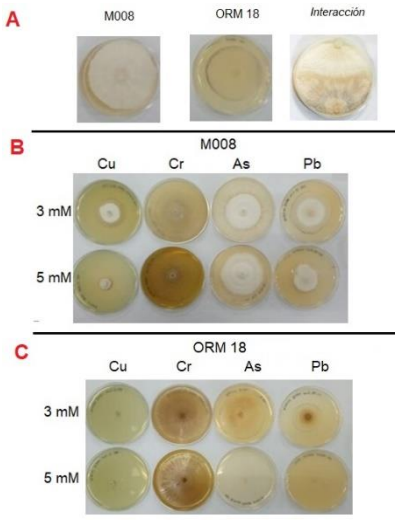


Figura 5. Controles para la interacción M008 y ORM 18: A. Aislados individual y en consorcio en agar Dextrosa Sabouraud (ADS); B. M008 en ADS con metales pesados a concentraciones 3 y 5 mM; C. ORM 18 en ADS con metales pesados a concentraciones 3 y 5 mM

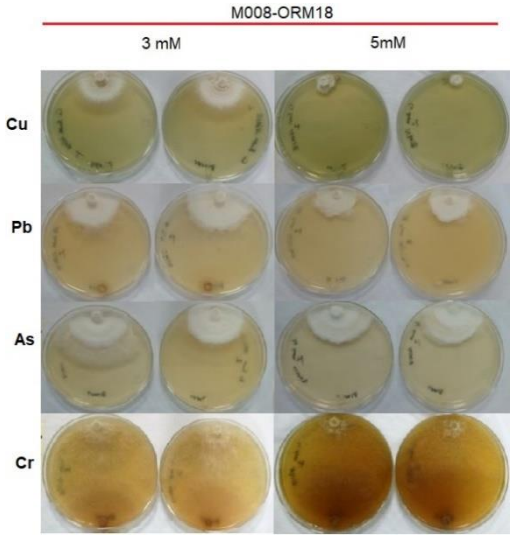


Figura 6. Interacción de M008 y ORM 18 en Cu, Pb, As y Cr, a concentraciones 3 y 5mM.

El crecimiento de manera individual y en consorcio se muestra en la Figura 5A, mostrando un crecimiento micelar estandar. En el caso de M008, éste mostró un buen crecimiento en presencia de todos los metales, con mayor desarrollo en As y Cr a ambas concentraciones evaluadas, además de mostrar morfologia distintiva en cromo (Figura 5B). ORM18 presentó un mejor crecimiento en cromo a ambas concentraciones en contraste con arsénico y plomo donde solo creció a concentración 3 mM (Figura 5C). Por otra parte, la confrontación de los dos aislados fúngicos en presencia de Cu, Pb y As presentó un crecimiento similar para ambos, donde el crecimiento fue mínimo y los micelios no interactuaban, en contraste con la interacción en presencia de Cr a ambas concentraciones, donde los micelios estaban en contacto y se desarrollaron en toda la placa (Figura 6). Este resultado es la pauta para evaluar la remoción de cromo en medio liquido por parte del aislado M008 en consorcio con otro hongo (ORM18).

DISCUSIÓN

Las relaciones antagónicas entre aislados fúngicos es un comportamiento reportado previamente y se sugiere que dicha inhibición está dada por la síntesis de metabolitos secundarios. Por ejemplo, Elósegui & Elizondo (2010), reportaron el antagonismo entre los hongos *Lecanicillium lecanii, Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae* en donde no se apreció proyección de las hifas de ninguna de las especies en el cultivo en la zona del halo que pudieran contactar las márgenes de la otra especie. Nuestros resultados indican que los aislados M007 y M9PG son metabólicamente más activos dada la inhibición que ejercieron frente al resto de los aislados (Figura 1). En contraste,

Mishra & Malik (2014) evaluaron microscópicamente la interacción entre cepas fúngicas *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus terreus* y *Rhizopus oryzae* empleando microscopía electrónica de barrido, resultando una interacción mutualista. Los tres hongos fueron capaces de desarrollarse de forma contigua entre ellos. Comparado con las interacciones mutualistas en este estudio (Figura 2), los aislados evaluados presentaron un crecimiento favorable y los micelios tuvieron contacto entre ellos, sin embargo, para confirmar dichas interacciones se propone realizar microcultivos y evaluar microscópicamente su interacción, de esta manera se confirmaría un entrecruzamiento entre hifas de los aislados confrontados. Por otro lado, Mishra & Malik (2014) evaluaron también la remoción de cromo con el consorcio y las cepas individuales y los resultados mostraron que el consorcio representaba la eliminación completa de Cr^{6+} en menor tiempo en comparación con las cepas individuales. En este trabajo se seleccionó un consorcio (M008-ORM18) tolerante a cromo para posteriormente evaluar la remoción en medio liquido tanto en consorcio como en forma individual.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que catorce interacciones fueron antagonistas y siete mutualistas, dos interacciones mutualistas fueron evaluadas en presencia de metales pesados, siendo la interacción M008 y ORM18 la que presento un mejor desarrollo en presencia de cromo. Estos resultados muestran que en consorcio las cepas son capaces de desarrollarse apropiadamente y esto da la pauta para su evaluación en medio liquido contaminado con cromo, así como evaluar en un futuro la remoción de este metal pesado en un sitio contaminado.

BIBLIOGRAFÍA

Beltrán M. y Gómez A. (2016). "Biorremediación de metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: una revisión, 1900-4699" en *Facultad de Ciencias Básicas*, Núm. 2, Vol. 12, [pp. 172-197]. DOI: 10.18359/rfcb.2027

Cervantes C., Espino A., Acevedo F., León I., Rivera M., Rodríguez M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez J., Rodríguez J., Moreno R. (2006). "Interacciones microbianas con metales pesados" en *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Núm. 2, Vol. 48, Abril - Junio. [pp. 203 – 210].

Ding, M., Song, H., Wang, E., Liu, Y., & Yuan, Y. (2016). "Design and construction of synthetic microbial consortia in China" en *Synthetic and Systems Biotechnology*, Núm. 4, Vol. 1, [pp.230–235].

Elósegui, O., & Elizondo, A. (2010). "Evaluación microbiológica *in vitro* de mezclas de especies de hongos entomopatógenos ingredientes activos de bioplaguicidas cubanos" en *Fitosanidad*, Núm. 2, Vol. 14, junio, [pp. 103-109].

Järup, L. (2003). "Hazards of Heavy Metal Contamination*"* en *British Medical Bulletin*, Vol. 68, [pp. 167-182]. https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032

Mishra, A., & Malik, A. (2014). "Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream" en *Bioresource Technology*, Núm. 1, Vol. 171, [pp. 217–226]. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.047

Wijayawardena, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). "Exposure, Toxicity, Health Impacts, and Bioavailability of Heavy Metal Mixtures" en *Advances in Agronomy* Vol. 138. Elsevier Inc. [pp. 176-234]. https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.03.002

AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE LA RAÍZ DE JITOMATE.

Contreras López Hermenegildo [1] y Ramírez Martínez Juan Francisco[2]

RESUMEN

El trabajo que se muestra a continuación tuvo como objetivo la disociación enzimática por choque térmico para la obtención de protoplastos a partir de raíz de jitomate, el cual es la segunda hortaliza más comúnmente cultivada en México, teniendo así suma importancia. Los protoplastos son células vegetales que carecen de pared celular, así que son ampliamente usados como modelos de estudio de la membrana plasmática. Este aislamiento se obtuvo con las enzimas celulasa y pectinasa, que son capaces de romper la pared celular de las plantas que se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectina así mismo la variación en la temperatura en un rango de 40-30°C. Lográndose obtener resultados sumamente favorables en la obtención de estos.

ABSTRACT

The work shown below was aimed at the enzymatic dissociation by thermal shock to obtain protoplasts from tomato root, which is the second most commonly cultivated vegetable in Mexico, with the utmost importance. Protoplasts are plant cells that lack cell wall, so they are widely used as plasma membrane study models. This isolation was obtained with the enzymes cellulase and Pectina, which are capable of breaking the cell wall of the plants that are composed mainly of cellulose, hemicellulose and pectin as well the variation in temperature in a range of 40-30 °c. Achieving obtain extremely favorable results in obtaining these.

Palabras clave: disociación. enzimas, protoplastos, pared celular, raíz.

INTRODUCCIÓN

El jitomate es la segunda hortaliza más comúnmente cultivada en el mundo. Solo la papa la supera. Además, el consumo del jitomate fresco por persona en el mundo va en aumento, al igual que el de productos procesados que lo contiene. (Lesur, 2006). En México se siembran alrededor de 80000 ha, con un rendimiento promedio de 28.7 ton/ha. a pesar de cultivarse en 27 estados de México, solo en 5 entidades (Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Jalisco y Nayarit), se concentra en promedio el 74.2% de la producción (SAGARPA, 2000).

Existen tres tipos de maneras de clasificar el tomate, según su forma, madurez y color. De acuerdo a su forma existen 5 tipos, del más pequeño al más grande: cherry, saladette, tipo pera, bola estándar y bola grande. Se clasifican por su grado de madurez es de acuerdo por el número de días entre que es plantado y su cosecha. De madurez temprana se cosechan a los 55-65 días. De mediana maduración se consideran de 66 a 80 días, y los de mayor maduración que requieren más de 80 días. De la misma manera, pueden clasificarse en función de su color; existen verde lima, amarillo, dorado, anaranjado y rojo. (Barraza, Fischer, & Cardona, 2004)

Protoplastos y uso de enzimas.

Un protoplasto es una célula vegetal a la cual se le ha removido completamente la pared celular, mediante métodos mecánicos o enzimáticos. Observándolos al microscopio los protoplastos presentan una forma esférica, con el citoplasma rodeado por una membrana plasmática; en el interior de las células se puede visualizar en núcleo. Para lograr éxito al aislar protoplastos se ha recomendado exponer el material de partida (en este caso la raíz) a una solución de enzimas (celulasa y pectinasa) con concentraciones adecuadas para que sean capaces de romper la pared celular de las células vegetales. Las paredes celulares de la mayoría de las plantas poseen características específicas que van de acuerdo al crecimiento y tiempo de vida de la planta.

La pared celular primaria es relativamente delgada y flexible, contiene, aproximadamente, cantidades iguales de celulosa, hemicelulosa y pectina. La pared secundaria, es más rígida, generalmente carece de pectina y contiene de un 50-80% de celulosa.

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica, Carretera Irapuato-Silao km 12.5 Colonia El Copal, C.P: 36820, Irapuato, Gto, hermecontre@outlook.com[2]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Carretera San Luis - Matehuala Km. 14., Ejido Palma de la Cruz, C.P.78321, Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. martinej@uaslp.mx

MÉTODO ELECTROFISIOLÓGICO EN PROTOPLASTOS.

Una vez obtenidos los protoplastos, el estudio de flujo de iones por canales o bombas puede realizarse gracias a una técnica electrofisiológica denominada *patch clamp*.
La técnica de patch clamp (desarrollada por Nher y Sakmann) usa una micropipeta de vidrio con un diámetro suave con una abertura de aproximadamente 1um. Esto contrasta con microelectrodos nítidos que se usan con frecuencia en otras técnicas electrofisiológicas. La pipeta se llena con una solución que depende del estudio específico o la técnica de patch clamp usada. Un electrodo de metal en contacto con esta solución conduce cambios eléctricos a un amplificador de voltaje. Este está presionado contra la membrana celular y se aplica succión para absorber la membrana dentro de la pipeta con el electrodo para formar un sello eléctricamente apretado de "giga-ohm". (Judith Ruiz Martínez, págs. 57-63)

METODOLOGÍA

Obtención de raíces

Todo el material que se utilizó durante el desarrollo del experimento fue previamente esterilizado dentro de una autoclave a 120 °C y 0.15 Psi, frascos de vidrio con tapa, cajas de Petri, puntas para micropipeta y solución osmótica, matraces, etc.
Para la obtención de las raíces de jitomate, se seleccionaron 5 plantas, a las cuales se les retiro todo el sustrato (tierra), posteriormente se limpiaron dejándolas libres de cualquier rastro de este y se les dio un pretratamiento de 3 minutos con una solución biocida compuesta principalmente (Amoxicilina, Captan, Rally 40W y Miconazol) con fungicidas y antibióticos, posteriormente pasaron a una solución de Hipoclorito de sodio al 10%.
Una vez concluido este pretratamiento se realizó la siembra, se colocaron las raíces dentro de un matraz Erlenmeyer de 250ml previamente esterilizado y se agregó medio MS hasta que cubriera completamente la raíz.
El medio MS (Murashige y Sloog) está compuesto por 5 soluciones (A, B, C, D, E), 1mL, 10mL, 5mL, 1mL y 10mL, respectivamente. Que aportan todos los nutrientes esenciales para el crecimiento óptimo de la planta (C, O, N, H, S, K, Ca, Fe, P, Mg, etc.), además se adiciono 1.9g de KNO_3 y 1.65g de NH_4NO_3.

Obtención de protoplastos

Para la obtención de protoplastos, una semana después de la siembra se tomó muestra de las raíces que presentaban un mayor grosor principalmente muestreando pequeños fragmentos de la raíz pivotante para obtener mayor producción de estos.
Se elaboro una solución de enzimas, la cual contenía 0.0396g de celulasa y 0.0534 ml de pectinasa disueltos en 6 ml de solución osmótica (manitol y $MgCl_2$), previamente esterilizada.
Las muestras de raíces se colocaron dentro de un frasco con tapa en contacto con la solución de enzimas y se metieron a baño María a 40ºC por 1 h favoreciendo la disociación, posteriormente se bajó la temperatura a 30ºC, manteniéndola así durante los dos días en donde se presenta la mayor eficiencia.

Conteo de protoplastos.

Transcurrido el primer día del experimento se realizó el conteo tomándose una alícuota de 50 μL la cual se colocó en una cámara de Neubauer, que es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido. La visualización se realizó con el objetivo de 40x en el microscopio considerando solo el conteo en 9 campos de los 25 cuadros que contiene el cuadrado secundario central. Y finalmente se repitió el conteo al primer y segundo día del inicio del aislamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las tablas y graficas que se muestran a continuación contienen la recopilación de datos de cada uno de los aislamientos de protoplastos realizados durante dicha investigación, en estas se muestran el promedio de células vegetales y protoplastos producidos al primer, segundo y tercer día de cada raíz, así como los obtenidos a través de una semilla comercial, germinada en el medio MS anteriormente ya mencionado.

Tabla 1. Promedio de Conteo de protoplastos (P) y células vivas (C.V). Primer aislamiento en la raíz 1.

Raíz 1. Aislamiento 1		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	3,7	2,1
2	4,8	1,7
3	8,8	5,3

Tabla 2. Promedio de Conteo de protoplastos (P) y células vivas (C.V). Primer aislamiento en la raíz 2.

Raíz 2. Aislamiento 1		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	22	10,4
2	161,4	51,1
3	11,3	4,8

Tabla 3. Promedio de Conteo de protoplastos (P) y células vivas (C.V). Primer aislamiento en germinada 2.

Germinada 2. Aislamiento 1		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	33,2	3,11
2	141,1	45,7
3	32,1	11

De acuerdo con las tablas, se elaboraron gráficas para observar el comportamiento en la producción de protoplastos que se mostraron en las raíces durante los 3 días para cada experimento (Figura 1, 2 y 3). Donde en el eje de las abscisas se gráfica el tiempo en días y en el eje de las ordenadas se grafica el número de protoplastos y células vegetales.

Con lo anterior, se puede observar en los gráficos que existe una buena formación de protoplastos a partir del primer día, teniéndose en el segundo la mayor productividad y eficacia de este monitoreo mientras que en una muy baja cantidad al llegar al tercero en donde decae la producción de manera significativa, esto puede atribuirse a la perdida de actividad de las enzimas y a la desnaturalización de estas.
Como se muestra en las gráficas siguientes:

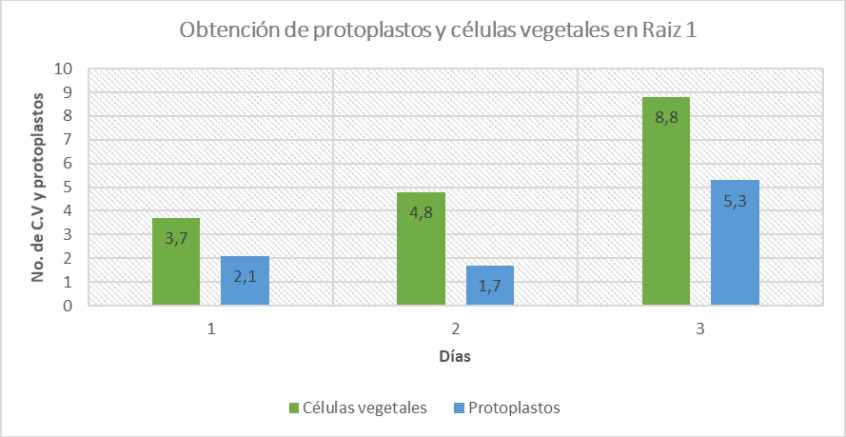


Figura 3. Gráfico que representa el promedio del comportamiento de protoplastos y células vivas, monitoreado durante 3 días. Utilizando celulasa a una concentración de [0.66 w/v] y pectinasa a [0.530 v/v]. Con una temperatura que oscila de 40-30°C. Datos correspondientes a la raíz 1.

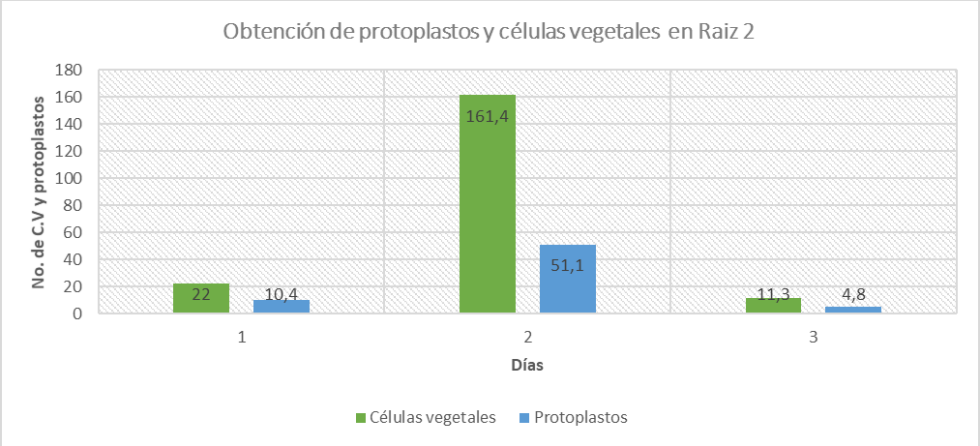


Figura 4. Gráfico que representa el promedio del comportamiento de protoplastos y células vivas, monitoreado durante 3 días. Utilizando celulasa a una concentración de [0.66 w/v] y pectinasa a [0.530 v/v]. Con una temperatura que oscila de 40-30°C. Datos correspondientes a la Raíz 2.

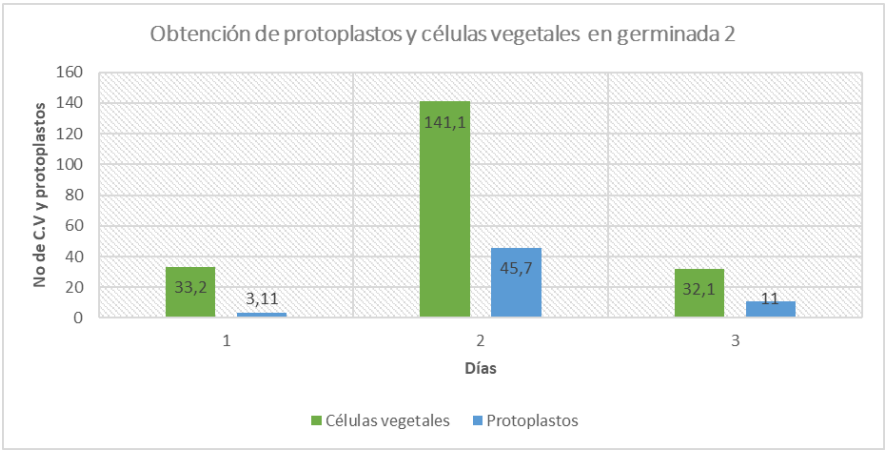


Figura 5. Gráfico que representa el promedio del comportamiento de protoplastos y células vivas, monitoreado durante 3 días. Utilizando celulasa a una concentración de [0.66 w/v] y pectinasa a [0.530 v/v]. Con una temperatura que oscila de 40-30°C. Datos correspondientes a la semilla germinada 2.

De acuerdo a esto, se dedujo que experimentalmente tanto la concentración de celulasa y pectinasa eran adecuadas ya que debido a la composición química de la pared celular estas cumplían con lo esperado obteniendo gran producción de protoplastos, la temperatura y la antigüedad de la raíz influyen de manera positiva y/o negativa, A mayor tiempo de antigüedad en la raíz presenta un mayor engrosamiento de la raíz pivotante lo que conlleva a una mejor toma de muestra y una eficaz producción.

Las condiciones a las cuales se obtuvieron mejores resultados fueron en un lapso de 48 horas, con una temperatura de 30°C y concentraciones mencionadas en las figuras (1, 2 y 3). Dicha temperatura se controló por medio de un baño maría dentro del cual se metieron los frascos con las soluciones y las muestras de raíz para su disociación.

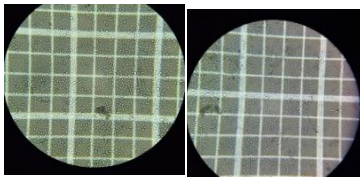


Figura 6. Fotografía de la presencia de protoplastos al segundo día en raíz de jitomate mediante la disociación enzimática.

En esta se imagen se distinguen células vegetales y protoplastos, en donde los protoplastos presentan una forma completamente esférica en comparación con las células que su estructura en mas desprolija.

CONCLUSIONES

Durante este proyecto de investigación se concluye:

- Las enzimas son el aspecto principal en el proyecto estas deben de tener especial atención ya que de utilizarse en una mayor concentración aumentarían y facilitarían la eficacia de la disociación
- El experimento debe llevarse a cabo hasta el segundo día, ya que se notó una disminución bastante considerable en el tercero, motivo por el cual deben correrse las pruebas de electrofisiología durante este día para que conlleve una mayor oportunidad de seleccionar protoplastos y aumentar la eficacia de estas.
- El manejo con las enzimas, así como la temperatura afecta directamente la producción ya que con cambios bruscos de esta pueden desnaturalizarse y perder actividad.
- El tiempo de vida de la planta y su tamaño, resulta ser un aspecto importante en el experimento obteniéndose mejores resultados en raíces más gruesas.
- La raíz pivotante (principal) tiene la mayor eficiencia en la producción de protoplastos proporcionado una mayor área de oportunidad.

BIBLIOGRAFÍA

Barraza, F. V., Fischer, G., & Cardona, C. E. (2004). Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en el Valle del Sinú medio, Colombia. Redalyc , 22-28.

CATIE, B. O. (1990). Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Turrialba, Costa Rica : CATIE.

Judith Ruiz Martínez, 1. A. (s.f.). Un tesoro perecedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. Investigacióny Ciencia .

Lesur, L. (2006). Manual del cultivo del tomate: Una guia paso a paso. Mexico: Trillas.

Poot-Poot, W. y. (2013). ¿Que son los protoplastos y para que sirven? Ciencia , 6.

SAGARPA. (Mayo de 2000). SAGARPA. Obtenido de SAGARPA.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión del Dr. Juan Francisco Ramírez Martínez y el Lic. Juan Carlos Morales Cervantes, a quien me gustaría mostrar mi más profundo agradecimiento, por el tiempo dedicado, la asesoría y por hacer posible la realización de esta investigación con gran valor académico. Además de agradecer su paciencia, comprensión y motivación para que el resultado final fuera exitoso.

Así como a los organizadores del 20° de verano de la ciencia, al personal docente, institucional, la facultad de Agronomía y Veterinaria, y a la UASLP, por haberme dado la oportunidad de tener la increíble experiencia y honor de participar en el “Verano de la Ciencia 2018.

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS PATÓGENAS AISLADAS DE PRODUCTOS LÁCTEOS EN EL ALTIPLANO POTOSINO.

Homero Camarillo Mata[10] y María Cruz del Rocío Terrones Gurrola[11]

RESUMEN

La generación de productos derivados de la leche es de las principales actividades en el país siendo el ganado caprino uno de los mayores productores, paralelo a esto, se aprecia una notable contaminación del producto, dicha situación representa un reto a nivel cadena de producción en comunidades. El queso es un excelente medio para el crecimiento y proliferación de microorganismos patógenos en el humano, y con los avances farmacológicos ante las enfermedades, e impulsado por un mal manejo y deficiente control de suministro de tratamientos, los patógenos han adquirido resistencia, esta investigación denota algunos de los patógenos más importantes aislados en quesos de comunidades del altiplano potosino que representan un reto ante los tratamientos clínicos evidenciando resistencia antimicrobiana *in vitro.*

ABSTRACT

The generation of milk products is one of the main activities in the country, with goats being one of the largest producers. In parallel with this, there is a notable contamination of the product, which represents a challenge at the production level in communities. Cheese is an excellent medium for the growth and proliferation of pathogenic microorganisms in humans, and with pharmacological advances in the face of diseases, and driven by poor management and poor control of the supply of treatments, pathogens have acquired resistance, this research indicates some of the most important pathogens isolated in cheeses from the highland communities of the altiplano potosino, which represent a challenge to clinical treatments, demonstrating *in vitro* antimicrobial resistance.

Palabras clave: Queso, Microorganismos patógenos, Resistencia antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y según el Codex Alimentarius, por producto lácteo se entiende un "producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración" (FAO, 2018). La producción de leche caprina en México, se caracteriza por ser un sistema de producción extensivo y la producción estabulada es escasa. En la mayoría de las explotaciones, se carece de adecuados esquemas de alimentación, se observan deficiencias en la salud e higiene de las cabras, fallas en las prácticas de manejo, falta de control de las enfermedades transmisibles al hombre, deficiente capacitación del personal del establo, etc (SAGARPA/SENASICA, 2011). En México, al concluir noviembre de 2017, la industria de quesos produjo 361 mil 20 toneladas con un valor en el mercado de 17 mil 902 millones de pesos (SAGARPA/SIAP, 2017). Por otra parte la leche de cabra en el estado de San Luis Potosí, se transforma mayoritariamente en quesos y dentro de estos pueden clasificarse en dos tipos comunes: los hay artesanales e industriales. (Gómez y González, Pinos Rodríguez, & Aguirre Rivera, 2009). De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, y las de concordancia con la misma, señalan la definición generalizada de queso y de igual forma señala las distintas variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (SSA, 2010)

La industria láctea debe salvaguardar la seguridad y calidad de la leche de consumo (G. Machado, y otros, 2017). En mayo de 2015, la 68.a Asamblea Mundial de la Salud adoptó un Plan de acción mundial sobre la resistencia a los

[10] Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Licenciatura en Enfermeria. Carretera Cedral kilómetro 5+600, Ejido San José de las Trojes. C.P. 78700, Matehuala, San Luis Potosí, camarillotvd@alumnos.uaslp.edu.mx

[11]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano, Licenciatura en Enfermeria. Carretera Cedral kilómetro 5+600, Ejido San José de las Trojes. C.P. 78700, Matehuala, San Luis Potosí, rocio.terrones@uaslp.mx

antimicrobianos, uniéndose a esta causa hacia 2015 las asambleas de la FAO y de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (WHO, 2017). Las acciones por parte de México se establecen en el Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario, Pesquero y Alimentario 2013-2018, se establece que el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) tiene a cargo el Programa de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria, como el instrumento de seguridad nacional para realizar las acciones de sanidad vegetal, salud animal e inocuidad (SAGARPA, 2017).

En el ámbito de salud y seguridad alimentaria una información precisa sobre la carga de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) puede orientar adecuadamente a los planificadores de políticas a la hora de asignar recursos al control de la inocuidad de los alimentos y a las intervenciones en este ámbito (WHO, 2015) , cosa que ya se ha implementado en el país (SAGARPA, 2017). Las estrategias de control deben comenzar en la granja y continuar en todo el proceso (G. Machado, y otros, 2017) . Sin embargo en México las ETA están relacionadas con el uso indiscriminado de antibióticos en el proceso de producción de alimentos (SSA, 2015). Los productos lácteos fermentados a menudo no son fabricados en condiciones estériles o con leche estéril (D.Hickey, J.Sheehan, G.Wilkinson, & E.Auty, 2015). Se han reportado más de 100 microorganismos (en los que se puede denotar *S aureus, E.coli, Salmonella spp*, etc.) como agentes causales de infecciones por ETA y muchos antimicrobianos utilizados en animales destinados a la producción de alimentos son idénticos o estrechamente relacionados con los utilizados en el ser humano (Villanueva T & Morales C, 2017). El uso de los antimicrobianos en animales destinados a la producción de alimentos puede llevar a la selección y propagación de bacterias resistentes, que después pueden transmitirse al ser humano por medio de alimentos u otras vías (WHO, 2017). En el país los medicamentos con fines curativos en animales tienen carácter residual, por lo que deben ser empleados en forma racional (SAGARPA/SENASICA, 2011).

La WHO ha nombrado la resistencia a los antibióticos como una de las tres amenazas más importantes para la salud pública del siglo XXI. Las bacterias tienen una notable plasticidad genética que les permite responder a las amenazas ambientales, incluida la presencia de moléculas de antibióticos (M. Munita & A. Arias, 2016). La resistencia antibiótica es un fenómeno progresivo caracterizado por una defensa total o parcial de los microorganismos al efecto del antibiótico; debido principalmente al uso indiscriminado e irracional de los antibióticos, así como la implementación de dosis incorrectas o aplicaciones con una duración inapropiada de las terapias (Villanueva T & Morales C, 2017). El problema de la resistencia antimicrobiana es igualmente importante y frecuente en animales; a pesar de que enfatizado en menor medida ya que los agentes antimicrobianos son empleados para la producción animal de alimentos como terapéuticos, metafiláctico, profiláctico o como promotor del crecimiento (Sharma, y otros, 2018).

El uso veterinario de antibióticos en animales, es objeto de críticas y presiones legales, ya que los alimentos procedentes de animales tratados con agentes antimicrobianos pueden contener tazas de éstos que se incorporan al organismo humano a través de la cadena alimentaria, fomentando la aparición de microorganismos resistentes en el hombre (Cancho Grande, García Falcón, & Simal Gándara, 2000). La amenaza incluye la propagación de bacterias multirresistentes, y las infecciones sin opciones terapéuticas. La resistencia antimicrobiana tiene *per se* un mayor impacto social y económico (Sharma, y otros, 2018), y aquellos que son resistentes a múltiples drogas representan una creciente amenaza para la salud pública (Chang, y otros, 2015). El uso de agentes antimicrobianos es quizás la principal fuerza motriz en el desarrollo y difusión de la resistencia y requiere una estrategia de tratamiento y prevención barata y efectiva para el público (Sharma, y otros, 2018). Considerando la importancia y el impacto sobre la población en una región característica de producción láctea de ganado caprino es imperativo un proyecto enfocado al análisis de resistencia a antibióticos de cepas de queso producido en la región del altiplano potosino.

METODOLOGIA

1. Se generó un estudio de tipo descriptivo; cuantitativo realizado a partir de tomas de muestras de Queso de municipios del Altiplano Potosino.
2. Ejecución de análisis microbiológico por medio de los estándares de procedimiento emitidos por la NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba, y la NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Que va desde la toma de muestras hasta el informe de resultados.

3. Desarrollo de antibiograma por el método de Kirby-Bauer para la obtención de la susceptibilidad y resistencia del microorganismo aislado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro análisis de muestras de queso recolectadas de la región poco menos del 40% se asocia presuntivamente a contaminación, en particular de *Salmonella spp*, un patógeno importante que se ha encontrado en quesos frescos de leche cruda y pasteurizados, llega a éstos por diversos medios y constituye un problema serio en la calidad de este producto. De un total de 7 muestras analizadas de las cuales 4 pertenecen a comunidades del municipio de Charcas; 2 del municipio de Vanegas y 1 muestra del municipio de Cedral. Se encontró una prevalencia relativa de 36.5% de colonias sospechosas a *Salmonella spp* aisladas a partir de muestra obtenida de queso de cabra en la región lo que destaca una cercanía del 30% reportado por el estudio de tipo transversal efectuado por Addis, y *cols* en el 2011 sobre la prevalencia y resistencia antimicrobiana de Salmonella aislada de vacas lecheras y en contacto con los humanos en las granjas lecheras de Addis Ababa, donde se encontró una prevalencia de contaminación del microorganismo con un total de 28.8% de positivos en leche. Cepas de *Salmonella spp* son conocidas como contaminantes microbiológicos selectivos en alimentos en América Latina y de acuerdo a lo reportado por Quesada, Gabriel A, Ayelen, Lisandro D, & María Soledad en humanos la contaminación de microorganismos resistentes pueden no solo producir la estancia hospitalaria sino también alargarla, esta es una de las muchas consecuencias asociadas produciendo aumento en el gasto de los sistemas de salud como sucede en la región del Altiplano potosino.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) y Longo (2013) citado por Rivera de la Cruz, Miranda Romero, & García Cué, en el 2017 sobre su estudio de identificación de bacterias acidolácticas antagónicas de *Salmonella* enterica var. *Typhimurium* aisladas de queso artesanal, coinciden en que la salmonelosis, así como la mayoría de las enfermedades gastrointestinales, es una de las principales afecciones por las que las personas requieren atención médica, no sólo en México. concordando con dichos resultados, Gould, Mungai, & Behravesh en el 2014 estudiaron los brotes atribuidos al queso: diferencias entre los brotes causados por los productos lácteos no pasteurizados y pasteurizados, Estados Unidos, 1998-2011, señalan a *Salmonella* como el principal causante (34%), de lo cual, se encuentra coincidencia de contaminación con nuestro estudio con una diferencia no tan remarcada cercana al 3%.

En acuerdo con Kyoung-Hee , Heeyoung , Soomin , Sejeong, & Yohan en el 2016 sobre las evaluaciones de riesgo microbiano que indican que la leche del queso pasteurizado y blando podría estar contaminado con L. monocitogenes por contaminación poscosecha. Además de que el riesgo de contaminación se hace evidente por *E. coli, Salmonella spp., S. aureus* y *L. monocytogenes* de queso de leche cruda. De ahí que algunas de esas bacterias sean considerados como indicadores de una higiene deficiente según un estudio del impacto en la salud humana de patógenos presentes en productos fermentados señalado por Fernández, Hudson, Korpela, & de los Reyes-Gavilán hacia 2015, en el que se puede apreciar existencia de contaminación de especies patógenas que incluyen *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae,* y las anteriormente señaladas, y que, en efecto, en nuestro estudio, se encontro presencia de dichos patógenos de los que se logró aislar exitosamente cepas de *E.coli, Klebsiella* y *Salmonella spp,* lo que representó un total para 3 municipios evaluados (42.8%), (dos muestras por localidad lo que representa un total de 6 muestras: 37.5%), de los cuales el 50% de los resultados correspondían a *E.coli* y 33.3% para *Klebsiella* respectivamente. Lo siguiente muestra los resultados obtenidos a partir de las 6 muestras evaluadas.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de resistencia y susceptibilidad a los agentes antibióticos por parte de microorganismos aislados a partir de muestras de queso de las comunidades evaluadas por medio de antibiograma.

MUNICIPIO	LOCALIDAD	*M.O	*GM	*SAM	*VA	*CRO	*CE	*KP	*CC
VANEGAS	TEPETATE	*E.coli*	S	R	R	S	R	R	R
		Klebsiella	I	S	R	S	R	I	R
	HUERTECILLAS	*E.coli*	S	S	R	S	R	I	R
		Klebsiella	S	S	R	S	R	I	R
CEDRAL	CUAREJO	*E.coli*	S	R	R	R	R	R	R
		Salmonella	-	S	R	S	R	S	R

*Microrganismo (M.O); Gentamicina (GM); Ampicilina (SAM); Vancomicina (VA); Ceftriaxona (CRO); Eritromicina (E); Cefalotina (KP); Clindamicina (CC); Susceptible (S), Intermedio (I); Resistente (R)

Nota: Comparativos evaluados de resistencia ante Tabla de interpretación de los resultados método de difusión en agar (Normas CLSI 2015).

En cuanto a la susceptibilidad y resistencia que presentaron los resultados de las pruebas de antibiograma, se logró captar una susceptibilidad del 83.3% de las muestras para el agente Ceftriaxona, mientras que fue de 66.6% para la Gentamicina, donde solo *Klebsiella* mostro resistencia intermedia. Seguido de los agentes Ampicilina y Cefalotina en el que *E.coli* tiene una resistencia relativa de 33.3% para ambos fármacos y donde *Klebsiella* comparte lugar porcentual al ser resistente intermedio solo ante Cefalotina. Mientras que se evidenció una resistencia total a los agentes Vancomicina y Clindamicina (multirresistencia) sin cambios aparentes sobre el halo de inhibición de crecimiento microbiano, lo anterior concuerda con lo señalado por Chang y otros en el 2015, sobre su estudio del origen y proliferación de la resistencia a fármacos por parte de bacterias patógenas, en el que se destaca la resistencia bacteriana a agentes antibióticos como Ampicilina, específicamente de los géneros *Enterobacteriaceae*. Las pruebas de susceptibilidad de la cepa de *Salmonella* fue evidentemente positiva para Gentamicina y Ceftriaxona con un halo de inhibición mayor a los demás, los que catalogaría como los fármacos de elección ya que represento resistencia a los demás antibióticos, lo anterior va en concordancia con lo señalado por Mebrat, Legesse, Zabishwork, & Walelgn hacia 2016, en un artículo sobre la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Salmonella* aislada en alimentos de origen animal en Gondar, Ethiopia, donde además se concuerda la resistencia de dicho patógeno a dos o más de los antibióticos empleados sobre las muestras.

CONCLUSIONES

A pesar de la importancia del conocimiento de la resistencia antimicrobiana de patógenos hacia el humano, es relativamente poca la información que se tiene acerca de este problema ya que incluso dichos patógenos pueden resistirse al tratamiento clínico tomando en cuenta nuestros resultados se debe considerar la investigación de dicho aspecto. Ahora, si bien se denotan fallas de producción alimentaria particularmente del queso al ser expuesta ya sea a contaminación por fallas en la cadena de valor del mismo, es de considerar que los microorganismos que se lograron aislar e identificar representan un riesgo constante para la salud a nivel de comunidades, esto aunado a los resultados que muestran sobre la resistencia hacia los agentes antibióticos, dichos fármacos muchas veces empleados en el ámbito clínico representan un reto para mejorar desde una primera línea de producción la calidad de los alimentos y por consiguiente evitar el consumo de alimentos que representen un riesgo latente para la población, lo anterior no solo plantea estrategias de mejora hacia la generación de alimentos, sino una segunda línea de acción hacia el campo clínico planteando estrategias de intervención más eficaces y seguras en caso de tratamientos en humanos.

BIBLIOGRAFIA

1. Addis, Z., Kebede, N., Worku, Z., Gezahegn, H., Yirsaw, A., & Kassa, T. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. BMC Infectious Diseases, 7.
2. Brizuela-Lab. (2015). Tabla de Interpretación de los Resultados Método de Difusión en Agar (Normas CLSI 2015) (Para antimicrobianos contenidos en Discos Múltiples y Monodiscos de Brizuela-Lab.). Obtenido de Brizuela-Lab.: http://www.brizuela-lab.com.ar/manuales/Tablan.pdf
3. Cancho Grande, B., García Falcón, M. S., & Simal Gándara, J. (2000). THE USE OF ANTIBIOTICS IN ANIMAL FEEDS: AN ACTUAL PERSPECTIVE. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 39-47.
4. Chang, H.-H., Cohen, T., H. Grad, Y., P. Hanage, W., F. O'Brien, T., & Lipsitch, M. (March of 2015). Origin and Proliferation of Multiple-Drug Resistance in Bacterial Pathogens. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79(01), 101-116.
5. D.Hickey, C., J.Sheehan, J., G.Wilkinson, M., & E.Auty, M. (February de 2015). Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. frontiers in Microbiology, 6(99), 1-8.
6. FAO. (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el Lunes 11 de Junio de 2018, de Food and Agriculture Organization of the United Nations: http://www.fao.org/dairy-production-products/products/es/
7. Fernández, M., Hudson, J. A., Korpela, R., & de los Reyes-Gavilán, C. (2015). Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. BioMed Research International, 13.
8. G. Machado, S., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., C. D. Vanetti, M., & De Block, J. (March de 2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. frontiers in Microbiology, 8(302), 1-22.
9. Gómez y González, Pinos Rodríguez, J. M., & Aguirre Rivera, J. R. (2009). MANUAL DE PRODUCCIÓN CAPRINA. San Luis Potosí, México.: Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

10. Gould, L., Mungai, E., & Behravesh, C. (2014). Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. Foodborne Pathog Dis, 545–551.
11. Kyoung-Hee , C., Heeyoung , L., Soomin , L., Sejeong, K., & Yohan , Y. (2016). Cheese Microbial Risk Assessments — A Review. Asian Australas, 307-314.
12. M. Munita, J., & A. Arias, C. (April de 2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. HHS Public Access, 4(2), 1-37.
13. Mebrat , E., Legesse , G., Zabishwork, A., & Walelgn , W. (2016). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Salmonella Isolated from Animal-Origin Food Items in Gondar, Ethiopia. BioMed Research International, 8.
14. Quesada, A., Gabriel A, R., Ayelen, R., Lisandro D, C., & María Soledad, B. (2016). RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE Salmonella spp AISLADA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL PARA CONSUMO HUMANO. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 32-44.
15. Rivera de la Cruz, J., Miranda Romero, L., & García Cué, J. (2017). Identification of antagonistic acidolactic bacteria of Salmonella enterica var. Typhimurium isolated from artisanal cheese. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 785-797.
16. SAGARPA. (01 de Septiembre de 2017). 5° INFORME DE LABORES 2016-2017. Recuperado el Jueves 14 de Junio de 2018, de gob.mx: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255710/5TO_INFORME_2017_web.pdf
17. SAGARPA/SENASICA. (16 de Agosto de 2011). Manual de Buenas Prácticas en Producción de Leche Caprina. Recuperado el Lunes 11 de Junio de 2018, de gob.mx: http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20de%20Buenas%20Prcticas/Attachments/3/manual_cabra.pdf
18. SAGARPA/SIAP. (2017). Panorama de la Leche en México. Cuidad de México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
19. Sharma, C., Rokana, N., Chandra , M., Pal Singh, B., Devidas Gulhane, R., Singh Gill, J. P., . . . Panwar, H. (January de 2018). Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. frontiers in Veterinary Science, 4(237), 1-27.
20. SSA. (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. México, D.F.: Secretaria de Salud.
21. SSA. (Septiembre de 2015). ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA). Recuperado el Lunes 11 de Junio de 2018, de gob.mx: file:///C:/Users/usuario/Documents/Downloads/4.2VIGILANCIADEENFERMEDADESTRANSMITIDASPORALIMENTOS(1).pdf
22. SSA. (2015). NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. México, D.F.: Secretaria de Salud.
23. Villanueva T , G., & Morales C, S. (Diciembre de 2017). Antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from clinical mastitis in intensive bovine breeding. Revista electrónica de Veterinaria, 18(12), 1-12.
24. WHO. (03 de Diciembre de 2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Recuperado el Lunes 11 de Junio de 2018, de who.int: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1
25. WHO. (07 de Noviembre de 2017). WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Recuperado el Lunes 11 de Junio de 2018, de who.int: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258970/9789241550130-eng.pdf;jsessionid=95B13B18065366B77B3EBADACEA26A5F?sequence=1

ACTIVIDAD ANTI-OXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE FRUTOS DE GARAMBULLO *(Myrtillocactus geometrizans)* Y ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium spp*)

Segovia García Itzel Anahí[1] y Torres Rodríguez María Lucina [2]

RESUMEN

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) es una cactácea columnar endémica de México, la cual al igual que el Arándano Azul (*Vaccinium spp*) son conocidos por su potencial funcional y nutraceútico. En el presente trabajo se realizaron diversos extractos variando el tipo de solvente, la proporción fruto fresco / solvente y el pH. Se realizó la determinación cualitativa de flavonoides mediante cromatografía en capa fina y la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se evaluó mediante el ensayo de DPPH. Los flavonoides fueron positivos en los extractos metanólicos y etanólicos de garambullo y arándano, en el extracto metanólico ácido de arándano y en el jugo de garambullo. La concentración de compuestos fenólicos totales fue desde 4.710 hasta 2976.271 g AG / kg de pulpa fresca. La actividad antioxidante tuvo un rango de 0.0364 a 22.1790 mMol equivalente de Trolox /g de pulpa fresca.

ABSTRACT

The garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) is a columnar endemic cactus of Mexico, which, like Blueberry (*Vaccinium spp*), are known for their functional and nutraceutical potential. In the present work various extracts were made varying the type of solvent, the proportion of fresh fruit/solvent and pH. The qualitative determination of flavonoids was carried out by means of thin layer chromatography and the quantification of total phenols was made by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH assay. The flavonoids were positive in the methanolic and ethanolic extracts of garambullo and blueberry, in the acid methanol extract of blueberry and in the garambullo juice. The concentration of total phenolic compounds was from 4.710 to 2976.271 gAG/kg of fresh pulp. The antioxidant activity ranged from 0.0364 to 22.1790 mMol equivalent of Trolox / g of fresh pulp.

Palabras clave: Actividad antioxidante, Compuestos polifenólicos, flavonoides, *Myrtillocactus geometrizans*, *Vaccinium spp*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen una gran cantidad de fitoquímicos que les confiere valor funcional elevado y actividad terapéutica importante. Estos compuestos son resultado del metabolismo secundario de los vegetales y se clasifican con base a su ruta de biosíntesis, función y características estructurales (Aponte *et al*., 2008). Los compuestos polifenólicos (CPF) son un grupo de metabolitos secundarios que contienen en su molécula al menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza en frutas, verduras y plantas medicinales (Mercado *et al*., 2013).

Evidencia reciente sugiere que la ingesta elevada de CPF se asocia con la reducción en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como enfermedad cardiovascular (ECV), procesos inflamatorios, diabetes y cáncer (Martínez *et al*., 2011). El efecto funcional de los CPF se fundamenta en su capacidad para secuestrar radicales libres y neutralizar especies reactivas de oxigeno (ERO) responsables del daño celular y tisular. Las ERO se generan a partir del metabolismo oxidativo normal de la célula, además de la exposición externa a diversos factores como rayos ultravioleta, contaminación ambiental, consumo de tabaco, entre otros. Sin embargo, una sobreproducción y acumulación de ERO como resultado de la incapacidad de la respuesta antioxidante endógena, provoca un desequilibrio entre sustancias pro-oxidantes y antioxidantes en las células, desencadenando de esta manera estrés oxidativo y daño (Leos *et al*., 2016).

[1]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luís Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, C.P. 78260, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO, itzela.segovia@hotmail.com
[2]Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Venustiano Carranza 2405, Col. Los Filtros, C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P., MÉXICO; lucina.torres@uaslp.mx

En este contexto, resulta de gran interés incorporar en la dieta alimentos funcionales ricos en compuestos bioactivos que posean capacidad antioxidante elevada, con la finalidad de evitar, disminuir o retrasar los daños oxidativos asociados a enfermedades no transmisibles.

Los frutos rojos, conocidos también como frutillas del bosque, se consideran de gran valía y de alto potencial nutraceútico, ya que contienen CPF y pigmentos naturales (antocianinas, betalaínas o carotenos) que les confieren poder antioxidante elevado.

Myrtillocactus geometrizans es una especie de cactácea columnar endémica de México ampliamente distribuida como vegetación silvestre en las tierras altas de la República Mexicana, principalmente en los estados de Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí. El fruto se conoce popularmente como "garambullo", es de forma globular con una cascara fina y pulpa de color morado obscuro cuando se encuentra maduro, tiene en promedio de 10 a 15 mm de diámetro y es rico en CPF y pigmentos del tipo betalaínas (Herrera *et al*., 2011). Generalmente el garambullo es consumido de manera natural o procesado en helados, licores o mermeladas, y tradicionalmente se cree que su consumo es importante en el control y prevención de gastritis y otros padecimientos digestivos (Guzmán *et al.*, 2010).

Por su parte, el arándano azul es una especie nativa de Norteamérica, que pertenece a la familia *Ericaceae* y al género *Vaccinium*. El fruto es una baya de sabor agridulce de forma casi esférica de 7 a 15 mm de diámetro, de color azul claro a obscuro, con pequeñas semillas (Massaro *et al*., 2010). Los frutos poseen contenido elevado de antocianinas, CPF y otros micronutrientes como vitamina C, potasio, hierro y calcio, que les confieren potencial nutracéutico importante (Jiménez et al., 2012).

Con base en lo anterior, resulta importante el estudio y validación del potencial antioxidante de metabolitos secundarios presentes en frutos silvestres, con la finalidad de que sean considerados en la industria alimentaria como alimentos funcionales o nutracéuticos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y determinar el contenido de flavonoides y compuestos polifenólicos totales, así como validar la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidracilo) en los extractos metanólico y etanólico de los frutos *Myrtillocactus geometrizans* (garambullo*)* y *Vaccinium spp.* (Arándano azul).

MÉTODOS Y MATERIALES

Material biológico. La recolección de frutos silvestres de garambullo se realizó en el mes de junio del 2018 en el municipio de Santa María del Río del estado de San Luis Potosí, México. Por su parte el arándano azul se compró en el mes de mayo del 2018 en la central de abastos de San Luis Potosí. Las muestras se transportaron en una caja térmica a 4°C y se mantuvieron en refrigeración hasta su proceso. Los frutos previamente lavados, se molieron en una licuadora (Oster), el bagazo obtenido se congeló a -70°C hasta su uso.

Preparación de extractos. La extracción de las sustancias polares se hizo a una proporción 1:4, peso fresco/volumen. Se pesaron 10 gramos de pulpa fresca (garambullo "G" o arándano azul "A") en una balanza analítica (OHAUS Explorer GA200) y se colocaron en frascos ámbar con 30 mL de etanol (E) o metanol (M). Se agitaron cada día y se mantuvieron a temperatura ambiente al abrigo de la luz durante 7 días. Los extractos crudos (GE, GM, AE y AM) se filtraron a través de papel filtro Whatman con poro 10 µm y se dejó a temperatura ambiente para la eliminación del solvente.

La preparación de los extractos ácidos se realizó en una proporción 1:20, peso fresco/volumen. Se pesaron 9 gramos de pulpa fresca (G o A) en una balanza analítica (OHAUS Explorer GA200) y se colocaron en frascos ámbar con 137 mL de metanol acidificado (MA) con HCl al 0.5%. Se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidos de la luz, durante 20 días. Los extractos crudos (GMA y AMA) se filtraron a través de papel filtro Whatman con poro de 10 µm y se dejo a temperatura ambiente para la eliminación del solvente.

El rendimiento de los extractos secos resultantes (g de extracto seco/100 g de pulpa fresca) se obtuvo mediante la ecuación 1).

$$Rendimiento\ (\%) = peso\ extracto\ seco * 100 / peso\ fruto\ fresco \quad (1)$$

Preparación de extractos acuosos. Infusiones (I). Se realizó una preparación a una proporción 1:40. Se peso 1 g de pulpa fresca (G o A) y se dejó reposar en agua destilada a punto de ebullición durante 20 minutos. Las soluciones finales (GI y AI) se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz hasta su valoración.

Determinación cualitativa de flavonoides. La determinación cualitativa de flavonoides presentes en las muestras se realizó mediante cromatografía en capa fina, empleando cromatofolios con dimensión de 2.5 cm x 2.5cm y un sistema de elución de Acetonitrilo:Etanol (2:1). La placa se revelo con $AlCl_3$ al 2% y se observo en luz UV en onda larga. La presencia de flavonoides se manifestó con el aumento de fluorescencia en las muestras.

Cuantificación de compuestos polifenólicos totales. Los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos se cuantificaron por el método de Folin Ciocalteu, y se expresaron como g de ácido gálico (AG)/ kg de pulpa fresca. Para la realización de la curva estándar se utilizaron concentraciones comprendidas entre 0 a 60 µg/mL de ácido gálico. Para la evaluación de las muestras se colocó en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano (Costar ®) 20 µL de muestra y se añadió 100 µL del reactivo de Folin-Cioicalteu, se agito la microplaca durante 1 minuto y se dejó reaccionar durante 4 minutos al abrigo de la luz. Posteriormente se agrego 75 µL de Na_2CO_3 y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. La lectura de absorbancia se realizo a 750 nm utilizando espectrofotómetro para microplaca UV-Vis (Epoch TM- Bio teK). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante (DPPH). Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó el método de 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en microplaca. Brevemente, en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano (Costar ®), se colocaron 100µL de muestra y se añadieron 100 µL de DPPH 0.4mM, se incubo durante 30 minutos a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, utilizando espectrofotómetro para microplaca UV-Vis (Epoch TM- Bio teK). La curva estándar se realizó en un rango de concentraciones entre 0 y 20 µg/mL de Trolox. Cada determinación se realizó por triplicado y se consideró un control normal (100µL de muestra, 100µL de etanol). Los resultados se expresaron como mMol equivalente de trolox/g de pulpa fresca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento. La tabla 1 muestra los porcentajes de rendimiento para los diferentes extractos de garambullo y arándano. En general, el mayor rendimiento de extracción se obtuvo con el sistema de Metanol-HCl 0.5 % y en una proporción peso fresco/solvente 1:20 para ambos frutos. En el caso de la extracción en proporción 1:4 con metanol y etanol sin modificación de pH, el garambullo presentó un mayor rendimiento en el extracto etanólico, a diferencia del arándano donde el de mayor rendimiento fue en el extracto metanólico.

Tabla 1. Porcentajes de rendimiento para los extractos etanólico (E), Metanólico (M) y metanólico ácido (MA) de los frutos de Garambullo y Arándano.

	Rendimiento (%)		
Fruto	**E**	**M**	**MA**
Garambullo	6.987	6.789	9.695
Arándano	6.068	5.844	22.900

Determinación cualitativa de flavonoides. Los resultados obtenidos para la determinación cualitativa de *flavonoides* en las diferentes muestras se reportan en la tabla 2. La identificación de flavonoides se realizó en las 10 muestras las cuales incluyen los extractos metanólicos, etanólicos y metanol-ácido, la extracción acuosa (infusiones) y los jugos sin tratamiento previo de ambos frutos. Se observo mayor fluorescencia en los extractos garambullo-metanólico (GM), garambullo-etanólico (GE) y en el jugo de garambullo (GJ). En los extractos arándano-metanólico (AM), arándano-etanólico (AE) y arándano-metanol ácido (AMA) también se observó fluorescencia, aunque en menor intensidad, con lo cual se infiere que los extractos de garambullo son capaces de extraer una mayor de flavonoides que estos últimos. Las infusiones, así como el extracto garambullo-metanólico ácido y el jugo de arándano no mostraron fluorescencia lo cual indica que un extracto en estas condiciones no es capaz de extraer flavoniodes. Además de que la determinación cualitativa puede verse afectada por la concentración de las muestras, así como el sistema de elución en el cual se llevo a cabo la cromatografía en capa fina.

Tabla 2. Resultado de la determinación cualitativa de flavonoides para los extractos etanólico (E), Metanólico (M), metanólico ácido (MA), extractos acuosos (I) y jugos (J) de los frutos de Garambullo y Arándano.

	Extracto									
	GM	GE	GMA	GI	GJ	AM	AE	AMA	AI	AJ
Flavonoides	++	++	-	-	++	+	+	+	-	-

*Presencia de flavonoides (++, +)
*Ausencia de flavonoides (-)

Cuantificación de compuestos fenólicos totales. El contenido de fenoles totales presentes en las muestras de los diferentes extractos para garambullo comprendió un rango de 6.460 g AG/kg de pulpa fresca correspondiente a la GI, hasta 2967.271 g AG/kg de pulpa fresca del GJ. La cantidad de fenoles totales presentes en el GJ es notablemente superior a los demás extractos, ya que en éstos el rango fue de entre 6.460 g AG/kg de pulpa fresca correspondiente a la GI, hasta 15.753 g AG/kg de pulpa fresca de GMA, valores que fueron similares a los reportados por Guzmán *et al*. en 2010. En el caso del arándano la tendencia fue similar, en el AJ la concentración de compuestos fenólicos totales fue de 829.379 g AG/kg de pulpa fresca y fue seguido por la concentración de 113.856 g AG/kg de pulpa fresca en AMA, los extractos restantes presentaron concentraciones de compuestos fenólicos totales en un rango de 4.710 g AG/kg de pulpa fresca a 8.938 g AG/kg de pulpa fresca.

Tabla 3. Compuestos fenólicos totales de los extractos para los extractos etanólico (E), Metanólico (M), metanólico ácido (MA), extractos acuosos (I) y jugos (J) de los frutos de Garambullo (G) y Arándano (A).

	Extracto									
	GM	**GE**	**GMA**	**GI**	**GJ**	**AM**	**AE**	**AMA**	**AI**	**AJ**
Fenoles totales (g/kg)	13.299 ± .012	10.953 ± .012	15.753 ± .032	6.460 ± .012	2976.271 ± .005	7.157 ± .012	4.710 ± .009	113.856 ± .204	8.938 ± .020	829.379 ± .005

Actividad antioxidante (DPPH). La actividad antioxidante correspondiente a los extractos de Garambullo a excepción del jugo, resulto en un rango de 0.0364mMol equivalente de Trolox/g de pulpa fresca en la GI a 0.112 mMol equivalente de Trolox/g de pulpa fresca en el extracto GMA. Para los diferentes extractos de Arándano a excepción del jugo, el rango de actividad antioxidante fue de 0.0386 mMol equivalente de Trolox,/g de pulpa fresca en la AI a 0.0577mMol equivalente de Trolox/g de pulpa fresca correspondiente al extracto AMA, como se muestra en la Figura 1. Los valores obtenidos para los jugos de ambos frutos son superiores al resto de las muestras, el GJ tiene una actividad antioxidante de 22.1790 mMol equivalente de Trolox/g de pulpa fresca y el AJ tiene una actividad de 19.7533 mMol equivalente de Trolox/g de pulpa fresca (Figura 2). De acuerdo a las concentraciones obtenidas los jugos son las muestras que presentan una mayor actividad antioxidante y con ello una mayor capacidad de captación de radicales libres.

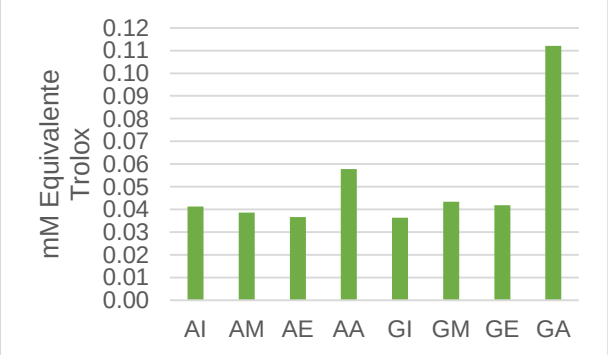


Figura 1. Actividad antioxidante de los extractos Etanólico (E), Metanólico (M), Metanólico ácido (AA y GA) y extractos acuosos (I) de los frutos de Arándano (A) y Garambullo (G).

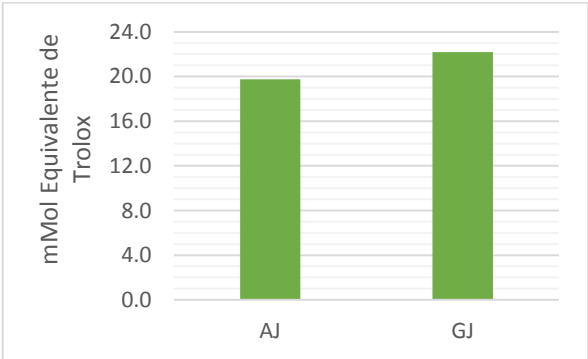


Figura 2. Actividad antioxidante del jugo (J) de los frutos Garambullo y Arándano.

Las diferencias de rendimiento, presencia de flavonoides, cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante entre los diferentes extractos se deben a la afinidad entre metabólitos secundarios presentes en los frutos y los solventes utilizados, así como la proporción de solvente-fruto fresco y pH del medio.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo el mejor método de extracción fue cuando la proporción de peso fresco/solvente fue mayor y el pH del medio ácido (Metanol-HCl 0.5%) ya que resulto en un % de rendimiento mayor para ambos frutos.
Además, fue posible determinar de manera cualitativa la presencia de flavonoides y cuantificar compuestos fenólicos totales, así como la actividad antioxidante en diferentes extractos de garambullo y arándano. Los resultados obtenidos sugieren que el garambullo contiene compuestos fenólicos con un mayor potencial reductor, lo que le confiere mayor capacidad para atrapar radicales libres y por tanto un mayor poder antioxidante en comparación con el arándano.
Finalmente, los frutos de garambullo y arándano presentaron actividad antioxidante importante, lo cual puede asociarse al contenido de CPF presentes en los mismos. Estos hallazgos pueden contribuir para posicionar a estas especies como una opción para la elaboración de productos de tipo funcional y nutracéutico.

BIBLIOGRAFIA

APONTE, M., CALDERÓN, M., DELGADO, A., HERRERA, I., JIMÉNEZ, Y., RAMÍREZ, Z., ROJAS, J. & TORO, Y. (2008). Fitoquímicos. *Instituto Nacional de Nutrición*, 1-3. Consultado en https://www.inn.gob.ve/pdf/docinves/fitoquimicores.pdf (20-06-2018).

GUZMÁN, MALDONADO, S. H., HERRERA, HERNÁNDEZ, G., HÉRNANDEZ, LÓPEZ, D., REYNOSO, CAMACHO, R., GUZMÁN, TOVAR, A., VAILLANT, F. & BRAT, P. (2010). Physicochemical, nutritional characteristic of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) pruduced in central Mexico en *Food Chemistry*, 121, [pp. 381-386].

HERRERA, HERNÁNDEZ, M. G., GUEVARA, LARA, F., REYNOSO CAMACHO, R. & GUZMÁN, MALDONADO, S. H. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus Berry (Myrtillocactus geometrizans) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties en *Food Chemistry*, 129, [pp. 1744-1755].

JIMÉNEZ, BONILLA, V. &ABDELNOUR, ESQUIVEL, A. (2012). Identificación y valor nutricional de algunos materiales nativos de arándano (*Vaccinium spp*) en *Tecnología en Marcha*, 26 (2), [pp. 3-8].

LEOS, RIVAS, C., RIVAS, MORALEZ, C., & GARCÍA, HERNANDEZ, D. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *Barcelona, España: OmniaScience*, 41-76.

MASSARO, C. (2010). Características generales del arándano (*Vaccinum spp*). *CHILE POTENCIA ALIMENTARIA Y FORESTAL*, pp. 1-2. Consultada en https://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2390.pdf (20-06-2018).

MARTÍNEZ, CRUZ, N. S., ARÉVALO, NIÑO, K., VERDE, STAR, M. J., RIVAS, MORALES, C., ORANDAY, CARDENAS, A., NÚÑEZ, GONZALEZ, M. A. & MORALES, RUBIO, M. E. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora) en *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, diciembre, [pp. 66-70].

MERCADO, MERCADO, G., DE LA ROSA, CARRILLO, L., WALL, MEDRANO, A., LÓPEZ, DÍAZ, J. A, & ÁLVAREZ, PARRILLA, E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México en Nutrición Hospitalaria, 28 (1), [pp. 36-46].

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICORRIZAS ASOCIADAS A ESPECIES DE AGAVES DE GUANAJUATO

Jesús Alejandro Andrade Sandoval[1], Juan Gualberto Colli Mull[1].

RESUMEN

El presente estudio se realizó para determinar el estado micotrofico de los hongos micorrizicos asociados a la rizosfera de las especies silvestres de Agave en el estado de Guanajuato ya que se conoce que los hongos micorrizicos establecen simbiosis con aproximadamente el 80% de las especies vegetales. Se realizaron muestreos en dos sitios del estado (San José Iturbide, Sierra de lobos) .Los resultados muestran un porcentaje de colonización del 66%, en 100 g de suelo en *Agave applanata* con una abundancia de 750 esporas y ocho morfotipos de micorrizas pertenecientes a los generos Glomus, Acaulospora y Scutelospora. En *Agave filifera* se registró un porcentaje de colonización del 58 % con una abundancia de 445 esporas y 11 morfotipos de micorrizas pertenecientes a los generos Glomus, Gigaspora, y Archaeospora.

ABSTRACT

The present study was carried out to determine the mycotic state of the mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of the wild species of Agave in the state of Guanajuato, since it is known that mycorrhizal fungi establish symbiosis with approximately 80% of the plant species. Samples were taken in two sites of the state (San José Iturbide, Sierra de lobos). The results show a percentage of colonization of 66% in 100 g of soil in *Agave applanata* with an abundance of 750 spores and eight mycorrhiza morphotypes belonging to the genera Glomus, Acaulospora and Scutelospora. In *Agave filifera* a percentage of colonization of 58% was registered with an abundance of 445 spores and 11 mycorrhiza morphotypes belonging to the genera Glomus, Gigaspora, and Archaeospora.

Palabras clave: Morfotipo, Micorrizas, Simbiosis, Colonización.

INTRODUCCION

El género Agave L. Es uno de los nueve generos que constituyen a la familia Agavaceae con un total de 166 especies de las cuales el 75 % se encuentran en México, con un 55% de endemismo siendo México el centro de mayor diversificación (Garcia, 2012). En Guanajuato se han reportado aproximadamente 22 especies de agaves de los cuales el 25 % se encuentran de manera silvestre como *Agave applanata* Lem. ex Jacobi, 1864, *Agave filifera* (Salm-Dyck) Baker, 1834, *Agave lechuguilla* Torr., 1859 (Hernández et al., 2012).Las especies de agave tienen importancia socioeconómica y agroecológica ya que son empleados en la obtención de pulque, mezcal y tequila su producción se encuentra íntimamente ligada a la identidad cultural de cada región en donde se produce, son de gran importancia en los ecosistemas ya que son ideales en el control de erosión de suelos (Garcia, 2012). Debido a que son habitantes naturales de zonas áridas y semiáridas donde los suelos son pobres en nutrimentos y agua, los agaves establecen asociaciones simbióticas con microorganismos como los hongos micorrizicos pertenecientes al Phylum Glomeromycota las cuales son asociaciones simbióticas o mutualistas no patógenas entre las raíces secundarias de las plantas y los micelios, mejorando así la absorción de agua y nutrimentos a través de una red de micelio, permitiendo un libre flujo de estos hacia la planta y entre las raíces de plantas interconectadas, lo que propone que la micorriza forma una gran unión bajo el suelo entre plantas que a simple vista podrían parecer lejanas. De esta forma, la micorriza ofrece a la planta hospedera y al ecosistema diversos beneficios en términos de sobrevivencia y funcionamiento, la planta le confiere al hongo una fuente de carbono como azucares y un lugar u hogar para habitar al ser estos simbiontes obligados, lo que significa que necesitan un organismo hospedero para

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Departamento de Biología. Laboratorio de "ecología molecular y bioprospección". Carretera Irapuato-Silao km. 12.5. Col. El Copal, C.P. 36821. Irapuato Guanajuato. je_ale_sandoval@outlook.com, jcolli@itesi.edu.mx

completar su ciclo de vida, a cambio de ello el hongo le facilita la absorción de agua y nutrimentos de baja movilidad como el Nitrógeno y Fosforo entre otros beneficios crean barreras protectoras que no permiten la entrada a microorganismos patógenos (Finlay, 2008).Por lo cual es importante conocer las asociaciones micotróficas que establecen las especies de Agave silvestres en el estado de Guanajuato, con microorganismos asociados a su rizosfera como los hongos micorrizicos.

METODOLOGIA

Sitio de muestreo. El muestreo se realizó en el municipio de san José Iturbide Guanajuato en la comunidad "el zapote" 20°58'14''N, 100°16'26''W y la área natural protegida "Sierra de lobos" 21º24'02.4''N, 101º39'36.6''W ubicada en el municipio de león Guanajuato. Las colectas de suelo se realizaron siguiendo la norma mexicana NMX-AA132-SCFI-2006. Las muestras de suelo y raíces fueron colectadas con ayuda de una pala de mano recta, entre y para cada muestreo se lavó con agua destilada y se desinfectó con etanol al 90% para evitar la contaminación.

Análisis del suelo. Se midieron nitratos, fosforo, potasio, calcio, magnesio con ayuda del fotómetro multiparametrico H183225-01 Hanna pro. De acuerdo a la NOM-021-RECNAT (2000).

Tinción. Se realizó de acuerdo al método descrito por los autores Phillips y Hayman (1970) el cual describe las siguientes etapas: 1. Lavado de raíces, 2. Clareo con KOH al 10%, 3. Acidificación con HCl al 0.1 %, 4. Agregación del colorante azul de tripano al 0.05 %, cada etapa antes del agregado del colorante se repite tres veces y se colocan en olla durante 10 minutos por 15 libras de presión.

Determinación del porcentaje de colonización. Se realizó en base a Salgado *et al*., 2014. Se montaron en portaobjetos 12 segmentos de raíz de aproximadamente 1 cm tomando en cuenta la presencia de estructuras como las hifas, vesículas, arbusculos y se toma un valor de =1 en el caso de localizar las estructuras y un valor de =0 en ausencia de las mismas calculando el porcentaje de colonización con la siguiente formula

Aislamiento e identificación de morfotipos. Se llevó a cabo por el método de tamizado húmedo y decantación

$$\% \text{ de colonización } \frac{\text{Número de segmentos colonizados}}{\text{Número total de segmentos analizados}} \text{ X } 100$$

(Sieverding, 1991). El cual describe los siguientes pasos: 1. Tamizado de muestras, 2. Centrifugación con gradiente de sacarosa al 70 %, 3. Recuperación del sobrenadante, 4. Lavado, 5. Cuantificación. La identificación de morfotipos se realiza en base a características como el diámetro, color, número de paredes, hifa de conexión, ornamentaciones y reacción de las paredes con el reactivo de Melzer finalmente se compararon con las descripciones del international Vesicular Arbuscular Culture Collection (www.invam.caf.wvu.edu/), y Taxonomy of Arbuscular Fungi (http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/). Las esporas se fotografiaron con ayuda de una cámara digital Nikon D 3300.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fertilidad de suelos Los análisis físico-químicos de los suelos colectados de la rizosfera de *Agave applanata* y *Agave filifera* en los sitios San José Iturbide comunidad el zapote y Área Natural Protegida Sierra de lobos incluyeron las determinaciones de: Nitratos, Fosforo, Potasio, Calcio y magnesio (tabla 1). Los suelos que destacan en el municipio de san José Iturbide son feozems al norte, noroeste y oeste, y xerosoles, vertisoles y planosoles al centro, sur, este y oeste (Anónimo, 1998). La comunidad el zapote muestra tener un suelo tipo Vertisol siendo suelos de alta fertilidad y pH neutro, mientras que los tipos de suelo en la Área Natural Protegida Sierra de lobos son el tipo Feozem el cual resulta ser bueno debido a las cantidades de materia orgánica y nutrientes que contiene este tipo de suelo.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de ambos sitios representadas en mg/L en fotómetro con lectura de rango medio.

Sitio	NO_3	P	K	Ca	Mg
Sierra de lobos.	1.0	0.6	14.0	70	20
San José Iturbide.	8.0	0.5	17.0	82	19

EI nitrógeno en el suelo se encuentra en forma orgánica y química. En forma química aparece en nitratos, nitritos y amoniaco en este caso se hizo la prueba en forma de nitratos en ambos suelos obteniendo valores bajos , la cantidad de fosforo en ambos tipos de suelo mostrado en la tabla es relativamente bajo ya que debe encontrarse en cantidades de (<20 a > 40) para determinar si es alto o bajo, la cantidad de calcio es alta ya que va en cantidades de (<1 a >10.1) para determinarse si es alto o medio, al igual las cantidades de magnesio fueron altas ya que va de (>3 a >20) para considerarse cantidades altas o bajas.

Porcentaje de colonización. La observación de estructuras propias de hongos como vesículas e hifas en células radicales y en células del córtex de la raíz corroboro que la especie de *Agave applanata* Lem. ex . Jacobi, 1864 (San José Iturbide comunidad el Zapote) y *Agave filifera* Salm- Dyck, 1834 (Área Natural Protegida Sierra de lobos), establecen colonización con hongos micorrízicos. El porcentaje de colonización para las especies de Agave fue de 66 % en *Agave applanata* y 58 % en *Agave filifera* (Figura 2.).

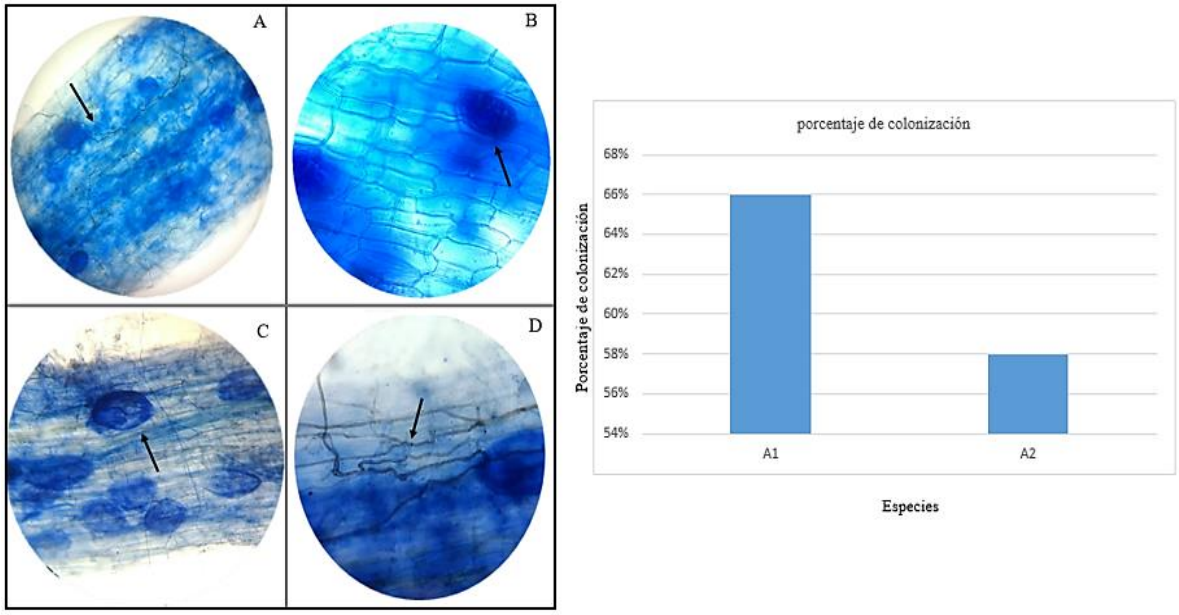
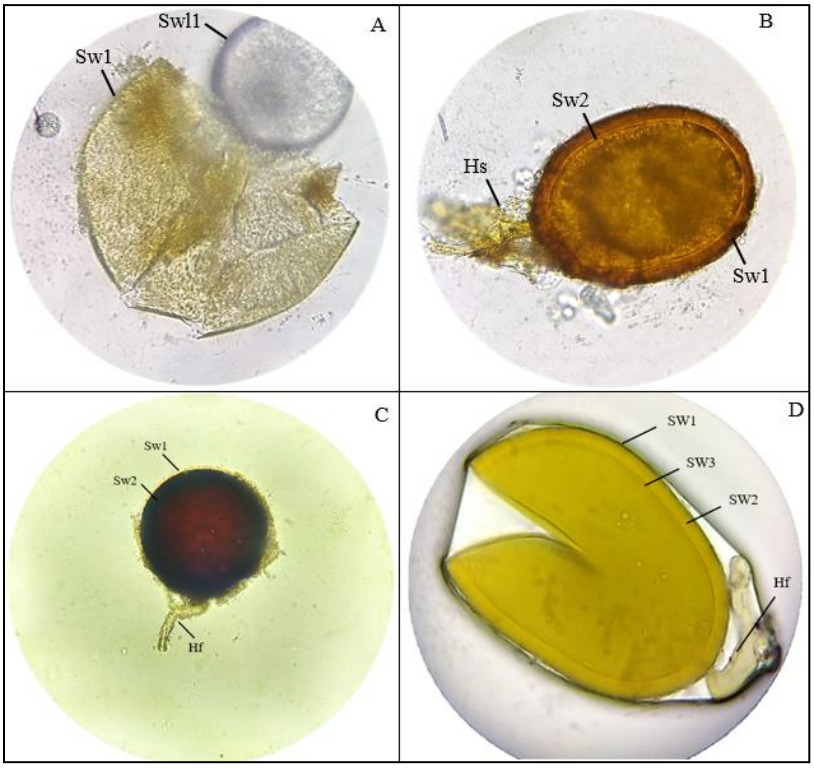


Figura 2. Secciones de raíz de *Agave applanata* colonizadas por hongos micorrizicos donde se observan redes de micelio en células radicales y vesículas interconectadas (A), vesícula elipsoide producto de la dilatación de las hifas que almacenan fosfolípidos (B). Secciones de raíz de *Agave filifera* observándose vesículas elipsoides en células radicales (C), red de micelio ramificado y vesícula en células de la raíz (D). Grafica de los porcentajes de colonización en *Agave applanata* especie representadas con la numeración (A1) y *agave filifera* representada con la numeración (A2).

Morfotipos asociados a la rizosfera de *Agave applanata* Lem. ex Jacobi, 1864. Se encontraron un total de 750 esporas en 100 g de suelo con aproximadamente 8 morfotipos que corresponden a los generos *Glomus* Tul. & C. Tul. Emend C. Walker & A. Schüßer , Scutellospora Walker & Sanders y *Acaulospora* Gerd. & Trappe emend. Berch. Correspondientes a las familias Glomeraceae Piroz. & Dalpé emend C. Walker & Schüßer, Gigasporaceae Morton & Benny y Acaulosporaceae Gerd. & Trappe respectivamente mostrándose a continuación dos morfotipos de los generos encontrados (Figura 3 A, B).

Morfotipos asociados a la rizosfera de *Agave filifera* (Salm-Dyck) Baker, 1834. Se encontraron un total de 445 esporas en 100 g de suelo con aproximadamente 11 morfotipos que corresponden a los generos *Glomus* Tul. & C. Tul. Emend C. Walker & A. Schüßer, *Gigaspora* Morton & Benny y *Archaeospora* JB Morton & Redecker. Correspondientes a las familias Glomeraceae Piroz. & Dalpé emend C. Walker & Schüßer, Gigasporaceae Morton & Benny y Archaeosporaceae JB Morton & Redecker respectivamente mostrándose a continuación dos morfotipos de



los generos encontrados (Figura 3 C, D).

Figura 3. Morfotipos de hongos micorrizicos asociados a la rizosfera de *Agave applanata* (A, B) y *Agave filifera* (C, D)

Descripciones
Morfotipo A Genero Acaulospora. Espora globosa a subglobosa de 150-210 µm de diámetro marrón amarillento con una pared formada por una capa (Sw1). Y una pared germinal interna con una capa (Swl). Sw1: Delgada lisa laminada concolora a la pared de germinación de la espora. No reaccionante al Melzer. Swl1: hialina grisácea desprendida por la ruptura de la espora. Paredes germinales internas características de los generos Acaulospora, Gigaspora y Archaeospora.
Morfotipo B Genero Glomus. Espora oblonga de coloración marrón claro parcialmente cubierta por mucilago de 100-140 µm de diámetro con una pared formada por dos capas (Sw1, Sw2). Sw1: Gruesa hialina claramente diferenciada de la segunda capa, Sw2: Delgada laminada lisa amarillenta las dos capas ligeramente reaccionables al reactivo de melzer, y una hifa de sostén amarillenta (Hs)

característica del genero Glomus con un pedicelo
Morfotipo C. Genero Glomus. Espora globosa de 60-140 µm de diámetro rodeada superficialmente por mucilago formada por una pared que consta de dos capas (Sw1, Sw2).Sw1: Evanescente amarilla hialina en esporas envejecidas, esta capa casi siempre falta. Sw2: laminada de color marrón anaranjado, que es continua con la capa interna de la hifa subyacente. En el reactivo de Melzer, esta capa produce una reacción dextrinoide (que aparece de color rojizo oscuro). Hifa de sostén curvada formada por una capa hialina amarillenta (Hf).
Morfotipo D. Genero Glomus. Espora oblonga a subglobosa de color amarillo dorado de 130 a 260 µm de diámetro formada por una pared que consta de tres capas (Sw1, Sw2). Sw1: Delgada hialina formando la superficie de la espora Sw2: Lisa claramente diferenciada de la segunda pared reaccionante al melzer aumentando de tamaño. Sw3: delgada laminada lisa amarillenta. Espora con una hifa de sostén (Hf), curvada en la base de la espora hifa formada por una capa hialina.

Los porcentajes de colonización encontrados para las dos especies de Agave silvestre fue de 66 % en *Agave applanata* y 58% en *Agave filifera* valores y generos de micorrizas que coinciden de acuerdo con autores como Carballar et al., 2013 quien reporta un porcentaje de 30 a 78% en especies de agave como *Agave potatorum* zucc. y los generos Glomus, Acaulospora y Gigaspora. Observandose en este estudio que las especies de agave tienen la capacidad de establecer colonización con más de un género de micorrizas encontrándose los generos Glomus, Gigaspora Archaeospora , Acaulospora y Scutellospora.

CONCLUSIONES

En este estudio se observó un mayor porcentaje de colonización con un 66% en la especie *Agave applanata* y un 58% de colonización en *Agave filifera*. Sin embargo el mayor número de morfotipos fue encontrado en esta especie. El género encontrado en ambas especies fue el género Glomus.

BIBLIOGRAFIA

Anónimo, (1998). Uso del Suelo y Vegetación. Esc. 1:1 000 000. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México, D.F., México

Carballar, S., Palma, F., Hernández, L. & Robles, C. (2013). Arbuscular mycorrhizal potential and mycorrhizal fungi diversity associated with Agave potatorum Zucc. in Oaxaca, Mexico. Ecological Research, 28pp. 217-226.

Finlay, R. (2008). Integrated nutrient cycles in forest ecosystems, the role of ectomycorrhizal fungi. In: Gadd GM (ed) Fungi in biogeochemical cycles. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 28-50.

García-Mendoza, A. (2012). México, país de magueyes. La Jornada del Campo. Núm. 53. Suplemento. La jornada. México.

Hernández-Sandoval, L. G., Y. Pantoja-Hernández y M. Martínez. (2012). Plantas útiles y distribución potencial de las forrajeras, medicinales y de uso múltiple. En: La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado vol. I. México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE), pp. 274-289.

INVAM. (2018). International culture collection of West Virginia University (vesículas) arbuscular micorrhizal fungi. West Virginia University. http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions.html

Phillips, J., y Hayman, S. (1970). Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Mycological Society, 55, pp.158-161.

Salgado, G., Castelán, M., Jiménez, R., Gómez, J. & Osornio, M. (2014). Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares en suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Chontalpa, Tabasco. , Revista mexicana de micología, 40, pp. 7-16.Sieverding, E., (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems., GTZ Eschborn, Germany.p.37

Taxonomy of Arbuscular Fungi. http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/Taxonomy.html

ANÁLISIS BROMATOLOGICO DE CINCO HIBRIDOS COMERCIALES DE MAIZ EN SURCOS CONVENCIONALES Y ESTRECHOS

Jesús Venancio Ojeda Serrano[12] y Oralia Antuna Grijalva[13]

RESUMEN

Durante el verano del 2018 se llevó a cabo el presente proyecto con el objetivo de evaluar la calidad bromatológica y el efecto del distanciamiento de surco (0.75 m, 0.60 m y 0.40 m) de cinco híbridos comerciales de maíz. El diseño experimental fue un diseño factorial de 5x3 con arreglo en franjas divididas, para el factor A se colocaron los cinco híbridos de maíz y el factor B fueron los tres distanciamientos entre surcos. Se cosecharon las plantas cuando el grano de las mazorcas presento un tercio de leche. Se pesaron las plantas de la parcela cosechada y se molieron las muestras, se tomó una muestra representativa de forraje (500 g), se dejaron secar al ambiente para eliminar el exceso de agua y posteriormente se llevaron a una estufa de aire forzada para finalmente dejarlas en peso constante. Las muestras ya secas se molieron nuevamente para realizar los análisis de fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y proteína cruda.

ABSTRACT

During the summer of 2018 was carried out this project with the objective of evaluating bromatological quality and the effect of the distancing of Groove (0.75 mm, 0.60 m and 0.40 m) of five commercial hybrids of corn. The experimental design was a design factor of 5 x 3 with arrangement of split strips for A factor were placed five maize hybrids and the B factor were the three distances between rows. The plants were harvested when grain of cobs present a third milk. The plot harvested plants were weighed and samples were ground, took a representative sample of forage (500 g), they were left to dry in the environment to eliminate excess water and subsequently took a forced air stove for finally let them in constant weight. The already dry samples were ground again for the analysis of fiber, acid detergent fiber, neutral detergent and crude protein.

Palabras Clave: maíz, análisis bromatológico, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y proteína cruda.

INTRODUCCION

En diferentes regiones productoras de maíz en el mundo, como en los Estados Unidos de Norteamérica y Argentina, la competencia entre las plantas cuando están cada vez más juntas al aumentar la densidad de población en el surcado convencional de 70 a 80 centímetros, se ha tratado de reducir mediante el uso de un surcado más angosto, como el de 50 centímetros y otras modalidades, con lo cual las plantas por hectárea quedan distribuidas en forma más dispersa a través del surco, teniendo así una menor competencia entre ellas, lo cual permite un mejor aprovechamiento de la luz, una mejor distribución de las raíces y la obtención de mayor rendimiento (Barberi, 2002).
Por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad bromatológica de maíz en surcos convencionales y estrechos.

METODOLOGIA

Ubicación geográfica de la zona de estudio. El estudio se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna la cual se encuentra localizada en la porción suroeste del estado de Coahuila y al Noroeste del estado de Durango, entre los paralelos 26º51'00" y 24º22'48" de latitud norte y los meridianos 101º51'36" y 104º48'36" al oeste de Greenwich. Abarca cinco municipios en el estado de Coahuila y

[12] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Fitomejoramiento. Colonia Fidel Velásquez #112, C.P. 27059, Torreón Coahuila de Zaragoza. jesusvojeda16@gmail.com
[13] Departamento de fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez S/N. Torreón, Coahuila, México. C. P. 27054. oantuna_77@hotmail.com

diez en el estado de Durango. El clima es muy seco con deficiencias de lluvia en todas las estaciones del año y presenta temperaturas semicálidas con inviernos benignos (Santamaría *et al.*, 2004).

Material genético: Se utilizaron cinco híbridos comerciales provenientes de la empresa MONSANTO los cuales se describen a continuación.

Cuadro 1.Características agronómicas de cinco híbridos comerciales de maíz.

HIBRIDO	CICLO VEGATIVO	ALTURAS (cm)		DIAS A FLORACIÓN
		PLANTA	MAZORCA	
Alicante	Intermedio precoz	260-295	140-150	70-75
Canguro	Intermedio	250-280	120-130	71-74
Cimarrón	Intermedio	245-290	140-160	75
Garañón	Intermedio	230-280	140-150	75-77
Guepardo	Intermedio precoz	250-320	150-180	67

Siembra del lote experimental. La siembra se realizó el 22 de abril del 2018, en seco, se llevó a cabo en forma manual, depositando dos semillas por punto de siembra.

Diseño y parcela experimental. El diseño experimental fue un diseño factorial de 5 x 3 con arreglo en franjas divididas para el factor A se colocaron los cinco híbridos de maíz descritos en el Cuadro 1 y el factor B fueron los tres distanciamientos entre surcos, la parcela experimental consistió en 2 surcos de 5 m de longitud a una distancia de 0.75 m, 0.60 m y 0.40 m entre surco y surco, para así obtener una densidad de 100, 000 plantas por ha con un distanciamiento entre planta y planta de 13.2, 16,6 y 25 cm respectivamente para cada distanciamiento entre surco.

Manejo agronómico del lote experimental. Consistió en la realización de un barbecho, rastra, nivelación, y trazos de surcos. Para los surcos estrechos se realizaron manualmente con la ayuda de un azadón.

Variables de calidad bromatológica

Secado de muestras de forraje verde. Para determinar la calidad bromatológica del forraje, se colocaron las muestras de forraje en un horno marca FELISA modelo 2484 durante un aproximado de 48 a 72 horas dependiendo de la humedad del material.

Procesamiento de muestras para calidad de forraje. Después de secarse se molieron las muestras en un molino marca CYCLONE SAMPLE MILL modelo 3010-030 hasta obtener muestras pequeñas para la realización del análisis. Las muestras se almacenaran en bolsas de plástico en un ambiente seco para continuar con el proceso.

Análisis de fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD). El análisis bromatológico se determinara bajo el principio de (Van Soest, 1967) utilizando un analizador de fibras ANKOM 220. El ensayo consistirá en tomar 0.500 g (±0.01 g) de la muestra molida de materia seca de las plantas que se cosecharon, las cuales se colocaran en una bolsa de papel filtro ANKOM F57. En seguida las muestras se pasaran al analizador de fibras, agregándose 2 L de solución en el vaso de digestión, para el análisis de FDA y para la obtención de FDN, a la solución se le agregaran 20.0 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y 4 mL de alfa amilasa. Posteriormente las muestras para FDA y FDN serán digeridas en el analizador de fibras por un tiempo de 60 minutos, a una temperatura de 100 °C (±1 °C).Cuando el tiempo de digestión sea alcanzado, se lavaran con agua destilada caliente a una temperatura aproximada de 100°C, realizándose este proceso tres veces para cada uno de las fibras. Para el análisis de FDN se agregaran 4.0 mL de alfa amilasa a cada uno de los dos primeros enjuagues, posteriormente se retiraran las bolsas de papel filtro con las muestras y se colocaran en un vaso de precipitado de 500 mL y se agregaran 200 mL de acetona dejándose por 3 minutos en la solución, con la finalidad de eliminar probables residuos de las soluciones utilizadas.
A continuación se dejaran las muestras expuestas al medio ambiente por un lapso de 45 min, esto para permitir la evaporación de la acetona, en seguida las muestras se sometieran a secado en estufa a una temperatura de 65 °C (±1°C) por 24 horas y posteriormente se procedera a pesar las muestras y así determinar el porcentaje de FAD y FND con la siguiente fórmula:

$$\%FAD \text{ ó } FND = \frac{(W3-(W1*C1))}{W2} x\ 100$$

$$c1 = \frac{peso\ de\ bolsa\ en\ blanco\ después\ del\ proceso}{peso\ de\ bolsa\ en\ blanco\ antes\ del\ proceso}$$

donde: FAD= Fibra Ácido Detergente; FND = Fibra Neutro Detergente; W1= peso de bolsa, W2 = peso de muestra, W3 = peso de bolsa con muestra después del proceso y C1 = peso de bolsa en blanco después de proceso/ peso de bolsa en blanco antes del proceso.

Manejo y presentación de datos. Los datos obtenidos se concentraron en una base, registrando las el peso de la muestra, peso de la bolsa antes del análisis, y peso de la muestra después del análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se cosecharon alrededor de 27 parcelas durante el verano. Se cosecho el forraje verde y también se determinó el peso total de la parcela. Los híbridos con mayor acumulación de materia verde fueron: Garañón, Canguro y el Alicante con 60.77 t ha^{-1}, 56.09 t ha^{-1} y 53.09 t ha^{-}1. Los híbridos se expresaron mejor en el distanciamiento de 0.40 m con una media de 75.0 t ha^{-1}, para los demás distanciamientos se obtuvieron las siguientes medias 40,6 t ha^{-1} y 39.07 (Figura 1).

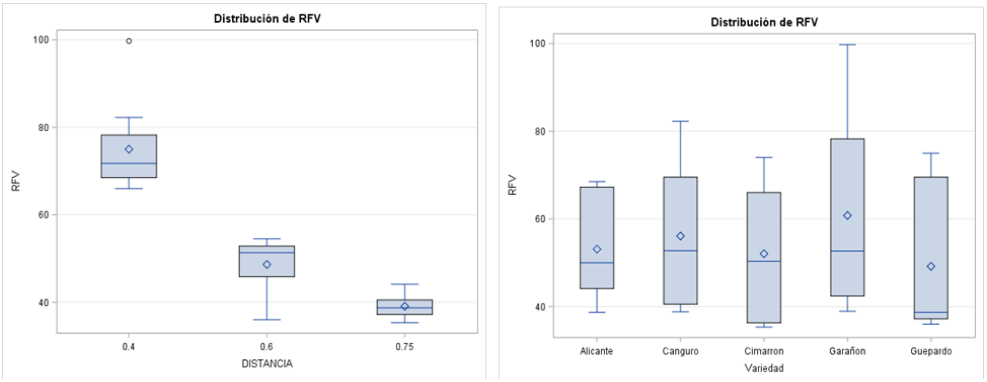


Figura 1. Rendimiento de forraje verde de cinco híbridos comerciales de maíz

CONCLUSIONES

Con las muestras ya procesadas para el análisis bromatológico se realizaran la determinación de fibra neutro detergente y fibra ácido detergente y a partir de estas variables medidas se pretende calcular la energía neta de lactancia (ENL), digestibilidad (Digest) , energía metabolizable (EM), consumo de materia seca (CMS) y el valor relativo de forraje (VRF).

Los híbridos obtuvieron una buena respuesta en el distanciamiento de 0.40 m reflejándolo en la mayor acumulación de materia verde.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbieri P A, H R Sainz Rozas, F H Andrade, Hecheverría (2000) Roe spacing effects at different levels of nitrogen availability in maize. Agron J. 92:283-288
2. Santamaría-César J. Figueroa-Viramontes R. Medina-Morales M. (2004) Productividad de la alfalfa en condiciones de salinidad en el distrito de riego 017, Comarca Lagunera. Terra Latinoamericana 22:343.349.
3. Van Soest, P. J.1996. Enviromental and forage quality. Proc Cornell Nutrition Conferences for Feed Manufacturers. Bufalo. NY. 1-6.

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MESTIZOS DE MAÍZ GENERADOS CON DOS PROBADORES CONTRASTANTES-III

Johanán Cortés Gómez[1] y Armando Espinoza Banda[2]

RESUMEN

Uno de los objetivos del fitomejoramiento es encontrar líneas que tengan una mejor aptitud combinatoria, por lo que en el verano de 2018 se hicieron evaluaciones en el Campo Experimental de la UAAAN-UL con 21 mestizos, una línea utilizada como probador (**TL-244**) y dos testigos comerciales. Llevándose a cabo la siembra el 14 de abril de 2018, con un diseño de bloques al azar con 3 repeticiones, cada una de ella con 2 parcelas experimentales de tres metros de largo y una distancia de 0.75 metros entre cada surco. Las variables analizadas en el reporte son Emergencia (EME), Floración Masculina (FM) y Floración Femenina (FF). En la emergencia se observan diferencias altamente significativas, lo mismo sucede en la Floración Masculinas, mientras que en Floración Femenina no existe diferencia entre los bloques. Los testigos presentan diferencias altamente significativas en Floración Masculina y Femenina con el mestizo TL-244 x EN-06-7, siendo este último el más precoz con una floración masculina de 56.33 y 59.67 en Floración Femenina.

ABSTRACT

One of the objectives of the plant breeding is to find lines that have a better combinatorial aptitude, so in the summer of 2018 evaluations were made in the Experimental Field of the UAAAN-UL with 21 mestizos, a line used as a tester (TL-244) and two commercial witnesses. The sowing took place on April 14, 2018, with a random block design with 3 repetitions, each with 2 experimental plots of three meters long and a distance of 0.75 meters between each furrow. The variables analyzed in the report are Emergency (EME), Male Flowering (FM) and Female Flowering (FF). In the emergency, highly significant differences are observed, the same happens in Male Flowering, while in Female Flowering there is no difference between the blocks. The witnesses present highly significant differences in Male and Female Flowering with the mestizo TL-244 x EN-06-7, the latter being the most precocious with a male flowering of 56.33 and 59.67 in Female Flowering.

PALABRAS CLAVES

Probador, ACG, Mestizos

INTRODUCCIÓN

Dentro de un programa de mejoramiento genético por hibridación de maíz (*Zea mays* L.) es importante disponer de un probador confiable y eficiente de la aptitud combinatoria general (ACG). El desarrollo de metodologías simples, rápidas y adecuadas para evaluar nuevas líneas ha sido un problema en la generación de híbridos con alto potencial productivo (Lobato *et al*, 2010).

El uso de la ACG y ACE como herramientas en el mejoramiento genético es muy común no solo para rendimiento de grano sino para otros caracteres, como tolerancia a salinidad (Welcker *et al*., 2005), producción de etanol (Lorenz *et al.*, 2009), tolerancia al frío (Rodríguez *et al*., 2007), digestibilidad en maíz forrajero (Argillier *et al.*, 2000), cantidad y calidad de proteína (Bhatnagar *et al.*, 2004), así como contenido de los antioxidantes carotenoides y tocoferoles (Egesel *et al.*, 2003).

Sin embargo, en una población, la aptitud combinatoria debe determinarse en varios individuos con el objeto de seleccionar progenitores con aceptable aptitud combinatoria. Adicionalmente, es importante definir que la aptitud combinatoria general (ACG) explica la proporción de la varianza genotípica debida a los efectos aditivos de los genes, mientras que la aptitud combinatoria específica (ACE) explica la proporción de la varianza genotípica que se debe a las desviaciones de dominancia (Gutiérrez et al., 2002).

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Fitomejoramiento. Saltillo 400 # 462 colonia Valle Verde, C.P. 27054, Torreón Coahuila de Zaragoza.
[2] Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez S/N. Torreón, Coahuila, México. C. P. 27054. aebanda7@yahoo.com.mx

De 1920 a 1930, el procedimiento clásico para evaluar la ACG de líneas auto fecundadas de maíz incluía la prueba de las **n(n-1)/2** cruzas posibles de un grupo de líneas, procedimiento impráctico cuando ***n*** es grande.

Esta dificultad condujo a la introducción y adopción generalizada de la prueba de mestizos, propuesta por Davis (1927), en la cual se evalúan las cruzas de las líneas endogámicas con una variedad de polinización abierta como probador de la ACG.

La probabilidad de que el mejor probador sea una variedad de polinización libre de bajo rendimiento, una línea homocigótica recesiva o en general una población con baja frecuencia de loci importantes, ha recibido importancia práctica y teórica desde su proposición por Davis (1934) y Hull (1945) (Lobato *et al*, 2010).

METODOLOGÍA

Actividad de investigación en el periodo del verano de la ciencia: Datos de cruzas recíprocas Líneas x Probador

Localización del proyecto: Campo experimental UAAAN U.L en Torreón, Coahuila., con una localización geográfica entre los paralelos 24° 30´ y 27´ LN y los meridianos 102° y 104° 40´ LO y una altitud de 1150 msnm; de clima seco.
El proyecto de investigación constó de dos etapas:

Etapa 1: En el ciclo Primavera-Verano del 2017, se realizaron las cruzas entre el probador con 24 líneas de tipo braquítico, de la cual se obtuvieron 21 mestizos. El probador utilizado fue una línea derivada de una selección de una población F2 de un mestizo de polinización libre con germoplasma de la línea 244 de CIMMYT. Esta línea se usó como probador femenino contrario al uso tradicional.

Etapa 2: Durante la Primavera-Verano del 2018**, s**e sembraron en campo los 21 mestizos, la Línea 244 y dos testigos comerciales. Con parcelas experimentales de 3 m, a una distancia de 0.75 m entre surcos y 0.15 m entre plantas, teniendo como resultado un total de 88, 888 plantas ha^{-1}. Se utilizó un diseño de bloques al azar, con tres repeticiones y cada repetición con 2 surcos.

Siembra: La siembra se realizó el día 14 de Abril. A los 25 días se llevó a cabo el aclareo de plantas, dejando un total de 21 plantas por cada parcela experimental.

Control de maleza: Se aplicó un herbicida pre-emergente Harness (Acetotclor: 2-cloro-N-etoximetil-6´etilacet-o-toluidida) a los 5 días.

Fertilización: Se llevó a cabo con la dosis 200-100-00 kg de Nitrógeno, Fosforo y Potasio, respectivamente. El riego fue por goteo, agregando la fertilización por medio de un Venturi.

Riego: Se utilizó cintilla. El riego total fue de una lámina de 59.74 cm, con una presión de 7 libras.

Control de plagas: Las plagas que se presentaron en el cultivo fueron gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), araña roja (*Tetranychus urticae*). Para un buen control de estas, se aplicaron los productos Clorpirifos, Coragen, y Abamectina, respectivamente.

Variables evaluadas: Los datos evaluados fueron días a la emergencia, floración masculina y femenina.
El análisis de las variables se realizó con el programa InfoStat.

Estimación de la Aptitud Combinatoria General (ACG). Se estimó como la desviación del valor promedio de la línea respecto a la media general, (Jenkins y Brunson, 1932).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para emergencia, floración masculina y femenina, se concentran en las tablas 1 y 2, respectivamente.

En la emergencia se observaron diferencias altamente significativas entre tratamientos y diferencias significativas entre bloques. En la variable de Floración masculina se obtuvieron diferencias altamente significativas entre tratamientos, siendo el mismo resultado entre bloques. En cuanto a Floración femenina hay diferencias altamente significativas entre tratamientos, mientras que entre bloques no existe diferencias.
El mestizo TLACG-244 x EN-07-7 fue el que emergió más rápido, con un promedio de 6.33 días, mientras que el más tardío fue TL-244 x EN-05-15, con un promedio de 8 días.

Para floración masculina el mestizo con más precocidad fue TL-244 x EN-06-7, con 56.33 días, mientras que el más tardío fue TL-244 x EN-05-10, presentando la floración a los 66 días. Mientras que los testigos Guepardo, RX-8520 y el probador TL-244 presentaron la floración a los 61.3, 63 y 67 días, respectivamente. Teniendo diferencia altamente significativa entre el mestizo más precoz y los testigos.

Tabla 1. Significancia de cuadrados medios de tres variables cuantificadas en 21 mestizos y tres testigos en el campo experimental de la UAAAN UL, 2018

Fuente	GL	Emergencia	Floración Masculina	Floración Femenina
Tratamiento	23	0.43 **	18.01 **	20.66 **
Bloque	2	0.72 *	8.18 **	7.39 ns
Error	46	0.19	1.53	2.85
Total	71			
Media		7.1	62.8	65.1

**: Altamente significativo al 5% de probabilidad, *: significativo, ns: no significativo

Tabla 2. Valores medios y Aptitud Combinatoria General (ACG) de emergencia, floración masculina y femenina de 21 mestizos de maíz, evaluados en el campo experimental de la UAAAN UL, 2018.

	Medias			ACG		
Tratamiento	**EME**	**FM**	**FF**	**EME**	**FM**	**FF**
Guepardo	7.33 ab*	61.33 bc	62.67 abcd			
RX-8520	7.67 ab	63.00 bcde	66.00 bcde			
TL-244	7.00 ab	67.00 f	67.67 def			
TL-244 x EN-07-8	7.00 ab	62.67 bcde	66.00 bcde	-0.1	-0.13	0.9
TL-244 x EN-07-7	6.33 a	62.33 bcde	64.33 abcde	**-0.77**	-0.47	-0.77
TL-244 x EN-03-13	6.67 ab	60.67 bc	62.67 abcd	**-0.43**	-2.13	-2.43
TL-244 x EN-08-12	6.67 ab	62.67 bcde	64.00 abcde	**-0.43**	-0.13	-1.1
TL-244 x EN-07-5	7.33 ab	61.67 bcd	63.33 abcde	0.23	-1.13	-1.77
TL-244 x EN-06-7	7.33 ab	56.33 a	59.67 a	0.23	**-6.47**	-

						5.43
TL-244 x EN-06-13	7.33 ab	62.33 bcde	64.33 abcde	0.23	-0.47	-0.77
TL-244 x EN-07-12	7.33 ab	60.33 bc	62.00 ab	0.23	-2.47	-3.1
TL-244 x EN-02-4	7.00 ab	63.67 cdef	67.00 bcde	-0.1	0.87	1.9
TL-244 x EN-08-1	7.00 ab	65.00 def	67.67 def	-0.1	2.2	2.57
TL-244 x EN-08-6	7.33 ab	61.67 bcd	65.00 bcde	0.23	-1.13	-0.1
TL-244 x EN-02-16	6.67 ab	62.33 bcde	64.33 abcde	**-0.43**	-0.47	-0.77
TL-244 x EN-06-12	6.67 ab	60.33 bc	62.67 abcd	**-0.43**	-2.47	-2.43
TL-244 x EN-05-10	7.00 ab	66.00 ef	68.00 ef	-0.1	**3.2**	**2.9**
TL-244 x EN-05-8	7.00 ab	64.67 def	66.33 bcde	-0.1	1.87	1.23
TL-244 x EN-02-7	6.67 ab	65.00 def	67.67 def	**-0.43**	2.2	2.57
TL-244 x EN-05-15	8.00 b	67.00 f	72.00 f	**0.9**	**4.2**	**6.9**
TL-244 x EN-04-4	7.33 ab	59.67 ab	62.33 abc	0.23	-3.13	-2.77
TL.244 x EN-03-9	6.67 ab	63.00 bcde	64.67 abcde	**-0.43**	0.2	-0.43
TL-244 x EN-05-12	7.00 ab	65.00 def	67.33 cdef	-0.1	2.2	2.23
TL-244 x EN-03-3	7.00 ab	62.67 bcde	65.00 bcde	-0.1	-0.13	-0.1

***Tratamientos con la misma letra, son estadísticamente iguales, (Tukey 0.05).** EME= Emergencia, FM= Floración

Masculina, FF= Floración Femenina.

El mestizo más tardío es **TL-244 x EN-05-15** en Emergencia, Floración La variable de floración femenina tuvo diferencias altamente significativas entre los tratamientos, contrario a lo que se observa entre bloques, donde no existe diferencia alguna. Los mestizos que presentan mayor precocidad son TL-244 x EN-06-7 y TL-244 x EN-07-12, presentándose a los 59.67 y 62 días, respectivamente. Los más tardíos son los mestizos TL-244 x EN-05-10 y TL-244 x EN-05-15, quiénes presentaron la floración a los 68 y 72 días.

Masculina y Femenina, con 8, 67 y 72 días, respectivamente. Mientras que el mestizo **TL-244 x EN-06-7** se presentó como el más precoz. Los valores de ACG mas sobresalientes se observan en FM y FF. El mestizo TL-244 x EN-06-7 muestra los valores mas altos y negativos para ambas variables (FM, FF), lo que indica que la línea condiciona a su descendencia a una mayor precocidad, en tanto que el mestizo TL-244 x EN-05-10, aporta a su descendencia mas días para alcanzar esa etapa fenológica, al igual que TL-244 x EN-05-15.

CONCLUSIÓN

Después de analizar los resultados se concluye con lo siguiente:

Entre tratamientos existen diferencias altamente significativas para emergencia, floración masculina y femenina. Mientras que dentro de los bloques existe diferencia significativa en emergencia, diferencia altamente significativa para floración masculina, y en floración femenina no hay significancia.

Los mestizos más precoces para la emergencia son **TL-244 x EN-07-7** con 6.33 días, **TL-244 x EN-03-13**, **TL-244 x EN-08-12**, **TL-244 x EN-02-16**, **TL-244 x EN-06-12**, **TL-244 x EN-02-7**, **TL-244 x EN-03-9** con una germinación a los 6.67 días, siendo el más tardío **TL-244 x EN-05-15** con 8 días. La línea EN-06-7 en el mestizo **TL-244** x **EN-06-7** contribuye con mayor precocidad, en tanto que las líneas EN-05-10 y EN-05-15 aportan mayores días a FM y FF.

BIBLIOGRAFÍA

Argillier, O., V. Méchin, and y Barrière. 2000. Inbred line evaluation and breeding for digestibility–related traits in forage maize. Crop Sci. 40: 1596–1600.

Bhatnagar, S., F. J. Betrán, and L. W. Rooney. 2004. Combining abilities of quality protein maize inbreds. Crop Sci. 44: 1997–2005.

Egesel, C. O., J. C. Wong, R. J. Lambert, and T. R. Rocheford. 2003. Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. Crop Sci. 43: 818–823.

Gutiérrez, R. E.; Palomo, G. A.; Espinoza, B. A. y De la Cruz, L. E. 2002. Aptitud combinatoria y heterosis para rendimiento de líneas de maíz en la Comarca Lagunera, México. Rev. Fitotec. Mex. 25(3):271-277.

Jenkins, M. T. y Brunson A. M. 1932. Methods of testing inbred lines of maize in cross-breed combination. Am. Soc. Agron. 24:523-530.

Lobato-Ortiz, Ricardo; Molina-Galán, José D; López-Reynoso, José de J; Mejía-Contreras, José A; Reyes-López, Delfino. criterios para elegir el mejor probador de la aptitud combinatoria general para el rendimiento de grano de líneas autofecunddas de maíz. Agrociencia, vol. 44. Núm. 1, enero-febrero, 2010, pp 17-30. Colegio de postgraduados. Texcoco, México.

Lorenz, A. J., J. G. Coors, N. de Leon, E. J. Wolfrum, B. R. Hames, A. D. Sluiter, and P. J. Weimer. 2009. Characterization, genetic variation, and combining ability of maize traits relevant to the production of cellulosic ethanol. Crop Sci. 49: 85–98.

Rodríguez, V.M., A. Butrón, G. Sandoya, A. Ordás, and P. Revilla. 2007. Combining maize base germplasm for cold tolerance breeding. Crop Sci. 47: 1467–1474.

Welcker, C, C. The, B. Andreau, C. De Leon, S, N. Parentoni, J. Bernal, J. Felicite, C. Zonkeng, F. Salazar, L. Narro, A. Charcosset, and W. J.Horst. 2005. Heterosis and combining ability for maize adaptation to tropical acid soils: implications for future breeding strategies. Crop Sci. 45: 2405- 2413.

DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. EN FRESAS DE IMPORTACIÓN PROVENIENTES DE ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA HACIA MÉXICO.

Jorge Luis Sánchez García[1] y Dr. Gerardo Manuel Nava Morales[2]

RESUMEN

Actualmente la fresa se cultiva en gran medida alrededor del mundo en una gran variedad de climas, sin embargo el poco tratamiento post cosecha que se aplica a las cosechas frescas han dado lugar a una serie de brotes por patógenos, entre los cuales destacan las bacterias del género *Salmonella.* Debido a la gran cantidad de fresa que se importa hacia nuestro país proveniente de EU, sumado al hecho de la falta de controles de inocuidad aplicados para garantizar su seguridad, es necesario iniciar estudios para tener un control calidad. El objetivo del presente trabajo fue el evaluar la presencia de Salmonella en fresas comerciales provenientes de EU, para esto se obtuvieron 40 muestras de 200 gramos de 10 centros comerciales de la ciudad de Queretaro en presentación tipo Clamshell. Se colocaron en medio de pre-enriquecimiento de BWP para posteriormente pasarlos a los medios de enriquecimiento Tetrationato de sodio y Rappaport-Vasilliadis. Por último se incubaron en los medios selectivos XLD y Hektoen para su identificación de acuerdo a la morfología característica. De las 40 muestras solo 2 resultaron positivas en el análisis morfológico para *Salmonella*, dando una prevalencia de 5%. Sin embargo, a pesar de la aparente poca prevalencia, hacen falta estudios moleculares posteriores para poder determinar de forma definitiva la prevalencia, así como del serotipo implicado.

ABSTRACT

Currently the strawberry is cultivated to a great extent around the world in a great variety of climates, however the little post-harvest treatment that is applied to fresh harvests has given rise to a series of outbreaks by pathogens, among which the bacteria of the *Salmonella* genus. Due to the large amount of strawberry that is imported into our country from the US, added to the fact of the lack of safety controls applied to ensure their safety, it is necessary to start studies to have a quality control. The objective of this work was to evaluate the presence of Salmonella in commercial strawberries from the US, for this we obtained 40 samples of 200 grams from 10 shopping centers in the city of Queretaro in Clamshell type presentation. They were placed in BWP pre-enrichment medium and then transferred to enrichment media Tetrathionate sodium and Rappaport-Vasilliadis. Finally, they were incubated in XLD and Hektoen selective media for their identification according to the characteristic morphology. Of the 40 samples, only 2 were positive in the morphological analysis for Salmonella, giving a prevalence of 5%. However, despite the apparent low prevalence, subsequent molecular studies are needed to determine definitively the prevalence, as well as the serotype involved.

Palabras clave: Fresas, Contaminación, Importación, *Salmonella spp.*

INTRODUCCIÓN

Salmonella se multiplica bien en medios ordinarios. Las colonias crecen al cabo de 16-24 horas y su temperatura óptima de crecimiento es de unos 32-37ºC pero es capaz de desarrollarse dentro de un amplio rango de 6-46ºC, puede crecer en pH bajos y poca actividad de agua, los valores se resumen en la tabla 1. Los CDC estiman que *Salmonella* causa alrededor de 1,2 millones de enfermedades, 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes en los Estados Unidos cada año. La comida es la fuente de aproximadamente 1 millón de estas enfermedades. La mayoría de las personas infectadas con *Salmonella* desarrollan diarrea, fiebre y calambres abdominales de 12 a 72 horas después de la infección. La enfermedad generalmente dura de 4 a 7 días, y la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento (CDC, 2018).

La fresa cultivada pertenece al género Fragaria en la familia de las Rosáceas, y es un híbrido de dos especies nativas, *F. chiloensis y F. virginiana.* Las fresas comerciales se cultivan en una amplia gama de climas, incluyendo

1 Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas, Centro Universitario, C.P:76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, joroluis10@gmail.com

2 Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas, Centro Universitario, C.P:76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, gerardomnava@gmail.com

templado, pastizal, mediterráneo, taiga y subtropical. Las fresas han sido el culpable de los brotes de *Salmonella*, Hepatitis A, Norovirus y E. *coli* O157: H7 transmitidos por los alimentos. Es esencial que se utilicen buenas prácticas de seguridad alimentaria desde el campo hasta la horquilla. (Hancock, 1999).

Las fresas son una de las frutas más producidas y consumidas a nivel mundial, mucha de esta producción se lleva a cabo de manera orgánica, en la cuál el mejoramiento del suelo se consigue al utilizar material de composta, restos de gusanos, abono vegetal y abono digerido de origen animal. Hoy en día se encuentra bien documentado que este tipo de prácticas promueve la contaminación de la cosecha por patógenos entericos, los cuales tienen la capacidad de sobrevivir durante largos periodos sobre las frutas y vegetales (Kurtboke y col, 2016). Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son conocidos por actuar tanto como patógenos primarios como oportunistas al ser consumidos junto con la fruta fresca (Berger y col, 2010).

En 2005, la Comisión de fresas de California publicó recomendaciones de seguridad alimentaria específicas para los cultivadores de fresas basadas en buenas prácticas agrícolas (BPA). Este informe recomienda que los productores eviten la contaminación del campo al no recoger las fresas en áreas con contaminación fecal evidente. La salmonela puede contaminar las frutas y verduras a través de suelos contaminados, el uso de agua contaminada en el riego o la contaminación cruzada de los trabajadores o manipuladores de alimentos. El suelo y el agua se contaminan a través de las heces de varias especies animales, particularmente aves (FSP, 2005).

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de Salmonella.

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (ºC)	5.2	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
Actividad de agua	0.93	0.99	>0.99

Uno de los problemas en la producción de fresas y derivados, son los pocos tratamientos y procesos que llevan para evitar su contaminación con patógenos debido a que pueden perder su textura o sabor. Las fresas pueden estar sujetas a un procesamiento mínimo, como limpieza, corte, maceración y lavado como así como congelación. Las fresas frescas y congeladas destinadas a la venta normalmente no están sujetas a intervenciones que eliminarán o reducirán sustancialmente la aparición de Salmonella y Norovirus. (EFSA, 2014).

La importación de frutas y vegetales desde el extranjero hacia los Estados Unidos se encuentra regulada por tres agencias gubernamentales:

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés).

Oficina de Aduanas y Protección Fronteriza de EE. UU. (CBP, por sus siglas en inglés)

Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés).

Siendo esta última la encargada de garantizar que los productos de importación sean inocuos, seguros y que se encuentren debidamente etiquetados de acuerdo a las disposiciones de la Ley federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de EE.UU.

En este estudio se evaluó la prevalencia de *Salmonella spp.* En fresas comerciales, presentación tipo Clamshell provenientes de EU para determinar el nivel de inocuidad de estos alimentos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Recolección de fresas. Se visitaron 10 tiendas comerciales del Estado de Querétaro, de las cuales por tienda se seleccionaron 2 muestras tipo Clamshell, todas de importadas de EUU. Se almacenaron y transportaron hasta el laboratorio el mismo día de la compra bajo condiciones de asepsia y refrigeración.

Aislamiento de *Salmonella.* Se pesaron 200± 2 gr de fresas enteras por duplicado de cada tienda y se depositaron en bolsas estériles. Se vertieron 200 ml de un medio de pre-enriquecimiento, agua peptonado bufferada (BWP), se homogeneizó completamente la muestra, además se retiraron la mayor cantidad sólidos y se incubó a 37 °C por un periodo de 18-24 h. Posteriormente de BWP se tomaron 1 y 0.1 ml para inocular en Tetrationato con Novobiocina (TT) y Rappaport-Vassiliadis con Novobiocina (RP) respectivamente, los cuales se tomaron como medios de enriquecimiento. Para el medio Tetrationato se incubó a 42± 2 °C, mientras que para Rappaport se hizo a 37± 2 °C, ambos por un lapso de 18-24 h. Como medios selectivos se utilizaron agar XLD y Hektoen, en los cuales se cultivó e incubaron las muestras que dieron positivo con los medios de enriquecimiento. La temperatura de incubación fue de 37 °C por 18 h. Después, se observó e identificaron las colonias presentes en placa, se resembraron aquellas que

tuvieran la morfología típica de *Salmonella* hasta lograr su aislamiento. Las colonias se transfirieron a Caldo Soya Tripticaseina y se incubaron a 35±2°C por 24 horas. Finalmente, los aislamientos se almacenaron en glicerol para posteriores análisis moleculares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo la metodología planteada, se logró identificar 2 muestras positivas para *Salmonella* de las 40 muestras totales. Fue posible identificar las colonias de *Salmonella* gracias a la morfología que presenta en agar XLD, algunas presentaron una coloración rosa-rojo, ligeramente transparentes, pero las que se tomaron como positivo presentaron el típico color negro en el centro, que gracias al tiosulfato y las sales de hierro que están en el medio permiten la precipitación del ácido sulfhídrico (H_2S) dando esa coloración característica. Se intentó adicionalmente obtener aislados completos de las colonias para posteriores análisis genéticos, sin embargo, no fue posible conseguirlo, ya que como se aprecia en la fig. 1 y 2, hubo desarrollo de otras entero bacterias alrededor de *Salmonella*. Un problema adicional es la identificación morfológica de *Salmonella*, las colonias típicas mantienen un color rojo intenso y en el centro color negro, pero hay serotipos poco comunes que no presentan la precipitación de H_2S y sólo mantienen un color rojo intenso, por lo que podrían significar más muestras positivas que no podemos identificar visualmente, *Proteus mirabilis*, por otra parte, sucede una situación contraria, bajo el medio XLD, este microorganismo puede presentar las mismas características típicas de *Salmonella*, causando interferencias en la interpretación, es decir, sólo pruebas más específicas como las moleculares podrían determinar la prevalencia exacta de este patógeno y el nivel de riesgo.

La prevalencia en estos alimentos parece ser baja para el consumidor, pero los factores de riesgo son considerables, los principales que se asocian en la producción primaria de productos frescos son el agua, el uso de estiércol, suelo u otros sustratos de crecimiento, el acceso de la vida silvestre a los campos, el ganado en la proximidad de campos y fuentes de agua (EFSA, 2013). Esto nos lleva a pensar que la prevalencia puede incrementarse, aun cuando se tratan de exportación, la FDA en una encuesta realizada en 2001 detectó salmonella en 143 muestras de fresas de exportación (FDA, 2001).

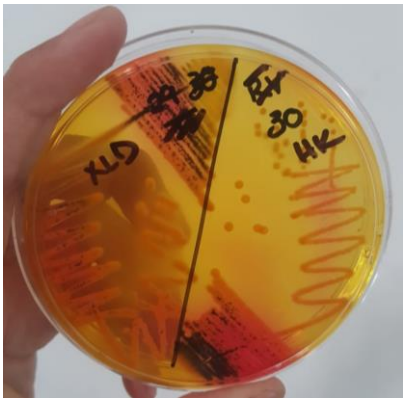


Fig.1 Primera siembra de Salmonella sobre agar XLD, se observa la típica precipitación de ácido sulfhídrico (manchas negras) de Salmonella.

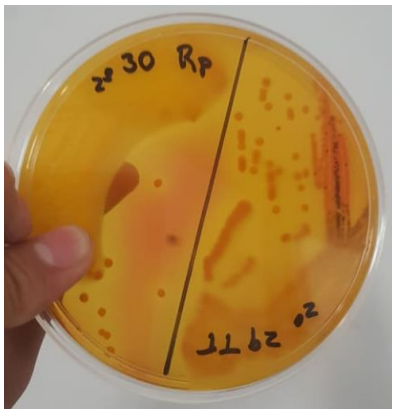


Fig. 2 Segunda recuperación de Salmonella sobre XLD, la sección derecha de la placa se observa colonias típicas de Salmonella, sin embargo, no es claro el aislamiento.

Los resultados arrojaron una prevalencia del 5% de *Salmonella* en los productos. Sin embargo, esto no confirma la ausencia de *Salmonella* en este tipo de frutos frescos. Los rangos de temperatura y pH en el que se desarrolla este microorganismo son amplio, mostrando crecimiento a temperaturas bajas de hasta de 6 °C y pH ácido de hasta 3.8, con una actividad de agua de 0.93 (EFSA, 2009). Un estudio realizado por Dawn et al. Demostró que salmonella aún a temperaturas bajas (10 °C) logró estar presente después de una semana, manteniendo latente su crecimiento. (Dawn et al. 2001).

CONCLUSIONES

En este estudio se observó que bajo condiciones poco favorables para el desarrollo de *Salmonella* fue posible identificar muestras positivas, la prevalencia fue baja, pero no contundente para descartar la presencia de este patógeno en estos alimentos, los medios utilizados para su aislamiento son apropiados para este tipo de microorganismos, pero debido a las condiciones de almacenamiento, bajas temperaturas y pocos nutrientes, dificultan recuperar y crecer a Salmonella, haciendo que sólo detectemos pocas muestras como positivas, la importancia radicará en seguir buscando alternativas para detectar la presencia de estos microorganismos aun cuando no se puedan recuperar de la manera clásica, análisis moleculares podrían ser los mejores aliados para descartar o confirmar la presencia de los mismos incluso directamente de las muestras, ahorrando costos y tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador del 20° Verano Regional de la Ciencia Región Centro por la oportunidad de participar en este espacio dedicado a la investigación, a la Universidad Autónoma de Querétaro por el espacio y materiales, así como al Dr. Gerardo Manuel Nava Morales por aceptarnos en su área de investigación, por el tiempo y la atención brindada durante mi estancia. Finalmente agradezco a Lupita y Fernanda por su paciencia para enseñarme y ayudarme en los trabajos de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Panel de la EFSA sobre peligros biológicos (BIOHAZ) Dictamen científico sobre el riesgo que representan los patógenos en los alimentos de origen no animal. Parte 1 (análisis de datos de brotes y clasificación de riesgos de combinaciones de alimentos / patógenos) [(consultado el 12 de julio de 2018)]; EFSA J. 2013 11 doi: 10.2903 / j.efsa.2013.3025. Disponible en línea: www.efsa.europa.eu/efsajournal.

FDA de EEUU. Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos Encuesta de la FDA sobre productos frescos importados FY 1999 Field Assignment. [(consultado el 12 de julio de 2018)]; 2001 30 de enero; Disponible en línea: http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/produceplantproducts/ucm118892.htm.

DAWN M. KNUDSEN, SHERYL A. YAMAMOTO, and LINDA J. HARRIS (2001) Survival of Salmonella spp. and Escherichia coli O157:H7 on Fresh and Frozen Strawberries. Journal of Food Protection: October 2001, Vol. 64, No. 10, pp. 1483-1488.

EFSA- European Union Summary Reports on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on Salmonella, Campylobacter, verotoxigenic Escherichia coli, Listeria monocytogenes and food borne out breaks http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2726.pdf.

Johannessen, G.S., Eckner, K.F., Heiberg, N., Monshaugen, M., Begum, M., Økland, M., & Høgåsen, H. R. (2015). Occurrence of *Escherichia coli*, *Campylobcter*, *Salmonella* and Shiga-Toxin Producing *E. coli* in Norwegian Primary Strawberry Production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(6), 6919–6932. http://doi.org/10.3390/ijerph120606919.

Hancock JF. Strawberries [Internet]. First edition. Oxon, UK ; New York, NY, USA: CABI; 1999. 237 p. Available from: http://col.st/1l1eI5C.

California Strawberry Commission Food Safety Program (FSP) [Internet]. California Strawberry Commission; 2005. Available from: http://col.st/1l1iKLc.

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). 2014. Opinión científica sobre el riesgo que representan los patógenos en alimentos de origen no animal. Parte 2 (Salmonella y Norovirus en bayas) . EFSA J 12 : 3706. doi: 10.2903 / j.efsa.2014.3706.

Kurtböke, D.I., Palk, A., Marker, A. et al. Appl Microbiol Biotechnol (2016) 100: 8593. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7651-0
Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D. , Hand, P. and Frankel, G. (2010), Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environmental Microbiology, 12: 2385-2397. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x

DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES, FENOLES Y TANINOS EN HONGOS DE LA VARIEDAD *PLEUROTUS OSTREATUS*

José Antonio Trejo Trejo[1] y Ana Angélica Feregrino Pérez[2]

RESUMEN

Se determinaron la cantidad de flavonoides, fenoles y taninos en 12 diferentes muestras de hongos *Pleurotus Ostreatus* en los laboratorios de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Aeropuerto. Los hongos fueron cultivados y cosechados por la misma universidad, pero en el campus Amazcala. Las pruebas se desarrollaron con los métodos de obtención respectivos y analizados con el Multiskan. Los resultados demostraron que la mejor muestra fue la número 10 con mayor cantidad de fenoles(8260), la muestra 4 para flavonoides (2082.5) y la muestra 5 para taninos (19.486) en diferentes sustratos.

ABSTRACT

The amount of flavonoids, phenols and tannins were determined in 12 different fungal Pleurotus Ostreatus samples in the laboratories of the Autonomous University of Querétaro, Airport campus. The mushrooms were cultivated and harvested by the same university but on the Amazcala campus. The tests were developed with the respective obtaining methods and analyzed with the Multiskan. The results showed that the best sample was number 10 with the highest amount of phenols (8260), sample 4 for flavonoids (2082.5) and sample 5 for tannins (19,486) in different substrates.

INTRODUCCIÓN

El *Pleurotus Ostreatus* es un hongo comestible muy solicitado por la gastronomía actual con una gran cantidad de micronutrientes y antioxidantes para el hombre. forma parte de los hongos con sombrero que son el cuerpo fructífero. El sombrero del hongo puede llegar a medir entre 5 cm y 15 cm con una gran variedad de colores.

Los flavonoides son compuestos fenólicos con efectos antioxidantes, los fenoles son compuestos de olores alquitranados y los taninos son compuestos con gran interacción con proteínas.

El presente trabajo explica un método y los resultados de los compuestos anteriormente mencionados con el fin de determinar si existen en el hongo de forma abundante en cada muestra de los diferentes sustratos de 100% agave, 25% cebada 75% agave, 50% cebada 50% agave, 75% cebada 25% agave y 100% cebada de los que fue cultivado para identificar cual cumple con mejores propiedades y el sustrato más eficiente.

MARCO TEÓRICO

El *Pleurotus Ostreatus* forma parte de los hongos con "sombrero" de cuerpo fructífero donde el micelio primario está distribuido por todo el sustrato de forma subterránea y el micelio secundario es la parte comestible. En la parte inferior del sombrero del hongo se observan las laminillas responsables del desarrollo de esporas para su reproducción asexual formando un nuevo hongo al momento de caer en el sustrato favorable, con alta cantidad de lignina y celulosa como pueden ser pajas hojas, subproductos de café, algodón por mencionar algunos.

Esta seta es una fuente de selenio y de micronutrientes importantes para el metabolismo del hombre, también posee antioxidantes y protección contra algunos tipos de cáncer. Destaca su gran cantidad de polisacáridos beneficiosos para el sistema inmunológico. Por último, cabe destacar su consumo en la gastronomía ya que es muy preciado. (Elhuertourbano.net, 2018)

[1] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Carretera Chichimequillas. s/n km 1, El Marques. CP: 76265, El Marqués, Querétaro, jatre_95@hotmail.com
[2] Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Carretera a Chichimequillas S/N, Ejido Bolaños, 76140 Santiago de Querétaro, Querétaro, feregrino.angge@hotmail.com

Tabla 1: Taxonomía

División	Basidiomycota
Subdivisión	Basidiomycotina
Clase	Homobasidiomycetes
Subclase	Agaricomycetidae
Orden	Tricholomatales
Familia	Pleurotaceae

(Pérez, 2018)

Las características del hongo principalmente son el sombrero de tamaño variable entre 5 cm y 15 cm con forma de ostra, con variedades de colores como rosa, blanco, gris por mencionar algunos. Las láminas bajo el sombrero usualmente del mismo color, el pie corto y lateral, en algunos individuos es poco perceptible por estar muy unido al sustrato. (Pérez, 2018)

Los flavonoides son compuestos fenólicos presentes en vegetales, semillas y frutas, se han identificado un poco más de 5000 donde se les atribuye su acción venotónica, efectos antioxidantes y la capacidad para inhibir diversos procesos enzimáticos relacionados con el sistema vehicular, una persona consume alrededor de 23 mg/día. (Kuklinsi, 2000)

No pertenece al grupo funcional de alcoholes ya que es R-OH,y en el l fenol es Ph-OH. El fenol evapora más despacio que el agua y en cantidad mínima puede formar una solución con agua. Tiene un olor dulce y alquitranado (Ecured.cu. 2018)

Los taninos son un grupo de polifenoles con gran interacción con proteínas, forma parte de los compuestos fenólicos y producen astringencia. Tienen capacidad antioxidante protegiendo las células a radicales libres y reduce el riesgo de contraer enfermedades degenerativas. (Gottau, 2018)

MÉTODOS Y MATERIALES

Extracción de compuestos fenólicos

1. Pesar 1 g de muestra fresca y adicionar a un matraz de 50 ml.
2. Adicionar 10 ml de metanol.
3. Cubrir la muestra con papel aluminio, sellar perfectamente y agitar durante 24 hr.
4. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4°C.

Determinación de fenoles totales en muestra

1. Tomar 40 µl de extracto metanólico y poner en los tubos.
2. Adicionar 460 µl de H_2O destilada.
3. Adicionar 250 µl de folin.
4. Adicionar 1250 µl de Na_2CO_3.
5. Cerrar el tubo y agitar en el vortex.
6. Dejar reposar 2 hr en la obscuridad.
7. Transcurrido el tiempo colocar 200 µl en cada pozo y leer en el Multiskan a 760 nm.

Determinación de taninos en la muestra

1. Tomar 50 µl de extracto metanólico y colocar en los pozos.
2. Adicionar 200 µl de solución 1:1 de HCl 8% : Vainillina 1%. Debe adicionarse de 50 µl en 50 µl a cada uno de los pozos hasta completar volumen de 200 µl de la solución 1:1.
3. Se prepara un blanco al cual se le adicionan 50 µl de extracto metanólico y se le añaden 200 µl de HCl al 4%.
4. Leer en el Multiskan a 492 nm.

Determinación de flavonoides totales en la muestra

1. Tomar 50 µl de extracto metanólico de la muestra.
2. Adicionar 180 µl de H_2O destilada o metanol.
3. Adicionar 20 µl de solución 2 - aminoetildifenil borato al 1%.
4. El blanco se hace con 50 µl del extracto metanólico, se le adicionan 200 µl de H_2O destilada o metanol.
5. Leer en Multiskan a 404 nm.

RESULTADOS

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Color	blanco											rosa
Sustrato	100% agave		25% cebada 75% agave		50% cebada 50% agave	75% cebada 25% agave			100% cebada			
Fenoles	3996.1904	4746.6666	4620.9524	5858.0952	4721.9047	4866.666	4620.9523	5682.857	4296.1904	8260	5113.333	3552.381
Taninos	7.466	7.829	14.44	9.546	19.486	5.21	6.28	6.78	12.69	9.02	9.40	7.15
Flavonoides	344.1	1092.5	1489.166	2226.666	1957.777	1668 5.18	1321.666	1504.166	682.5	2082.5	597.5	882.5

CONCLUSIONES

La muestra número 10, con sustrato 100% de cebada, fue la que dio mejores resultados para fenoles con 8260, para flavonoides con 2226.666 fue en la muestra 4 con un sustrato de 25% cebada y 75% agave , por otro lado en taninos la muestra 5, con sustrato 50% cebada y 50% agave, fue la que arrojó mejor resultado con 19.486.

BIBLIOGRAFÍA

Pérez, J. (2018). Pleurotus ostreatus. [online] Fungipedia. Consultada en: https://www.fungipedia.org/hongos/pleurotus-ostreatus.html [6 Aug. 2018].

Kuklinsi C. Farmacognosia. Barcelona: Omega, 2000.

Ecured.cu. (2018). Fenol - EcuRed. [online] Available at: https://www.ecured.cu/Fenol [Accessed 7 Aug. 2018].

Gottau, G. (2018). ¿Qué son y qué propiedades tienen los taninos?. [online] Vitonica.com. Available at: https://www.vitonica.com/alimentos/que-son-y-que-propiedades-tienen-los-taninos [Accessed 7 Aug. 2018].

Elhuertourbano.net. (2018). Pleurotus ostreatus | El huerto urbano :: El huerto en casa. [online] Available at: https://www.elhuertourbano.net/setas/pleurotus-ostreatus/ [Accessed 15 Aug. 2018].

CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS DETOXIFICATIVAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA DE INSECTICIDAS EN PULGÓN AMARILLO DEL SORGO *Melanaphis sacchari* (Zehntner) EN LA ZONA SUROESTE DEL ESTADO DE GUANAJUATO

José Isaac Navarro Cuellar[14], Enrique Garcia Burgos[2], Luis Patricio Guevara Acevedo[3] y Ernesto Cerna Chávez[15]

RESUMEN

La aplicación constante de insecticidas en el control del pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehntner) en sorgo en el estado de Guanajuato a provocado la resistencia a diferentes grupos toxicológicos, por tal motivo se realizó la investigación con el objetivo de cuantificar las enzimas detoxificativas, α y β-esterasas (α-est y β-est), glutatión S-transferasas (GST), acetilcolinestera (ACE) y oxidaxas (Oxi) asociadas a dicha resistencia en la zona sueroeste del estado de Guanajuato, para ello se realizaron colectas del insecto en 5 localidades de los municipios de Acámbaro, Apaseo el Alto, Cortázar, Tarandacuao y Tarimoro . El material biológico se trasladó al laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Donde se realizó la identificación de *M. saccahari*. El material biológico se etiqueto y se mantuvo a una temperatura de -2°C. Hasta obtener la cuantificación de enzimas detoxificativas. Para la cuantificación de proteínas para determinar la cantidad de insectos a emplearse utilizó la metodología descrita por Brogdon (1984), Una vez calculada la cantidad de insectos a emplear, se determinaron los niveles de α-est, β-est, Ox, ACE y GST utilizando las metodologías descritas por Brogdon, (1988), Brogdon y Barber (1990) y Brogdon *et al*. (1997). Los resultados muestran que las poblaciones de Apaseo el Alto presentaron los mayores valores para α-esterasas y oxidasas, Acámbaro para β-esterasas, Tarimoro para acetilcolinesterasa y para glutatión S-trasferasas no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas.

Palabras Clave: *Melanaphis sacchari , sorgo, enzimas detoxificativas, α y β-esterasas, glutatión S-transferasas*

ABSTRACT

The constant application of insecticides in the control of the yellow aphid *Melanaphis sacchari* (Zehntner) in sorghum in the state of Guanajuato caused the resistance to different toxicological groups, for this reason the investigation was carried out with the objective of quantifying the detoxifying enzymes, α and β-esterases (α-est and β-est), glutathione S-transferases (GST), acetylcholinestera (ACE) and oxidaxes (Oxi) associated with this resistance in the serum zone of the state of Guanajuato, for this purpose insect collections were carried out in 5 localities of the municipalities of Acámbaro, Apaseo el Alto, Cortázar, Tarandacuao and Tarimoro. The biological material was transferred to the Toxicology laboratory of the Department of Parasitology of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Where was the identification of *M. saccahari*. The biological material was labeled and kept at a temperature of -2 ° C. Until obtaining the quantification of detoxifying enzymes. For the quantification of proteins to determine the amount of insects to be used, he used the methodology described by Brogdon (1984). Once the amount of insects to be used was calculated, the levels of α-est, β-est, Ox, ACE and GST using the methodologies described by Brogdon, (1988), Brogdon and Barber (1990) and Brogdon et al. (1997). The results show that the populations of Apaseo el Alto presented the highest values for α-esterases and oxidases, Acámbaro for β-esterases, Tarimoro for acetylcholinesterase and for glutathione S-transferases there were no significant differences between the populations studied.

Keywords: *Melanaphis sacchari, sorghum, detoxificating enzymes, α and β-esterases, glutathione S-transferases*

[14]Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Saltillo. Calzada Antonio Narro #1923, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. C. P. 25315. jabaly1@yahoo.com
[3]Instituto Tecnologico de Roque. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C.P. 38110, Celaya; Gto.

[15] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Fitomejoramiento. Quintas del Nazas TRN #237 A, C.P. 27054, Torreón Coahuila de Zaragoza. joshep_gonzalez@hotmail.com.

INTRODUCCION

El pulgón amarillo del sorgo *M. sacchari*, es una plaga invasora que hasta 2013 se consideraba presente en México solamente en algunas áreas sembradas con cultivos hospederos y que rápidamente se extendió por casi todo el territorio nacional, especialmente en los estados con alta producción de sorgo (SENASICA, 2014). Debido a la rápida distribución y al grave daño causado a la planta de sorgo, ya sea por la pérdida de savia (Singh *et al*., 2004), por la posible transmisión de enfermedades virales (Rott *et al*., 2008), y el cúmulo de mielecilla sobre las hojas (Singh *et al*., 2004), De acuerdo al CESAVEG el estado de Guanajuato reporto una incidencia de pulgón amarillo (*Melanaphis sacchari)* en el ciclo de primavera-verano 2015, en base a un muestreo que consistió de 2440 ha. muestreadas, reportando una incidencia para el mes de junio de 9.02 % equivalente a 220.08 ha. para el mes de junio. Posteriormente para el mes de Julio se estaba reportando el 39.73 % que equivalen a 969.41 ha con presencia de pulgón amarillo y ya para el mes de Agosto se tenían reportes del 42.09 % de presencia, equivalentes a 1027 ha del total de muestreo realizado (CESAVEG, 2015). En la actualidad el método más utilizado para el control del pulgón amarillo es la aplicación de productos químicos, que en ocasiones son ineficientes, pero peor aún, que aniquilan a la basta variedad de enemigos naturales (Rodríguez y Terán, 2015). INIFAP (2015), determinó cinco insecticidas con una efectividad superior al 90% para el control de *M. sacchari,* los cuales fueron: Imidacloprid, Sulfoxaflor, Spirotetramat, Thiametoxan y Metamidofos, los cuales reducen un 90 % el daño provocado por el pulgón amarillo, estos insecticidas aplicados de manera inteligente son una alternativa para el manejo, debido a que las recomendaciones incluyen realizar una nueva aplicación cada 20 días, es innegable creer que se desarrollen mecanismo de resistencia hacia los productos químicos. El uso irracional y elevado en el número de aplicaciones genera la selección de múltiples mecanismos de resistencia (Lagunes y Villanueva, 1994). Está demostrado que la resistencia de los insectos a los insecticidas es frecuentemente el incremento de la actividad metabólica de la plaga. Estos mecanismos de resistencia metabólica no están ligados a ningún punto de acción específico y por tanto, pueden conferir resistencia a insecticidas de más de un grupo de diferente modo de acción (IRAC, 2015). Las principales enzimas que se encuentran realizando estos mecanismos son: esterasas, mono-oxigenasas, citocromo P450, y glutatión s-transferasas. Los insectos resistentes pueden tener elevados niveles de una enzima en particular o formas alteradas de la enzima que metaboliza al plaguicida a un nivel más rápido que la forma no alterada (FAO, 2012).

METODOLOGIA

Colecta de material biológico en campo. Para la obtención de material biológico, se buscaron parcelas con sorgo en los municipios de Acámbaro, Apaseo el Alto, Cortázar, Tarandacuao y Tarimoro pertenecientes al estado de Guanajuato, con problemas de pulgón amarillo. De cada municipio se obtuvieron 5 muestras de localidades diferentes y cada muestreo consistió en llenar un tubo eppendorf de pulgón y una vez lleno el tubo se prosiguió a etiquetar para después colocarlas en una hielera.

Localización del experimento. Ya reunido todo el material biológico se trasladó al laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Donde se realizó la identificación de *Melanaphis saccahari*. El material biológico se mantuvo a una temperatura de -2°C. Hasta obtener la cuantificación de enzimas detoxificativas.

Pruebas bioquímicas. Determinación de proteína de *Melanaphis sacchari*

Se empleó la metodología descrita por Brogdon en 1984 utilizando albumina sérica, como proteína de referencia, se colocaron 3 insectos en tubos eppendorf, se agregaron 100µL de buffer KPO_4 a 0.05 molar y 7.2 de pH, se trituraron y se aforo a 1ml posteriormente se realizaron diferentes diluciones (1,5,10,15,20 y 30 pulgones de cuarto instar) para su evaluación, en cada cavidad de la microplaca de 96 pozos se colocaron 20µL de homogenato y se agregaron 80µL de boffer KPO_4 y 200µL de colorante diluido, esto se realizó por triplicado para cada repetición, las lecturas de absorbancia se tomaron utilizando un filtro de 630nm y se calcularon los valores de microlitros por mililitro por proteína comprendidos en el rango de 80 a 120µ.

Una vez calculada la cantidad de insectos a emplear, se determinaron los niveles de α-est, β-est, Oxi, ACE y GST utilizando las metodologías descritas por Brogdon, (1988), Brogdon y Barber (1990) y Brogdon *et al*. (1997).

Niveles enzimáticos

Para la determinación de alfa (α) y beta (β) Esterasas en cada pozo de una microplaca, se colocaron 100µL de homogenato, se agregaron 100µL de acetato de alfa o beta-naftil, se dejó incubar por 10 min, y se agregaron 100µL de fast-blue, se volvió a incubar durante 2 minutos y se leyeron en el lector de placas usando un filtro de 540nm. En cuanto a las Ox se colocaron 100µL de homogenato, se agregaron 200µL de TMZ (Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride), agregando una gota de (25µL) de agua oxigenada (H_2O_2), se dejó incubar 5 minutos, y se leyeron con un filtro de 620nm; Para las GST se colocaron 100 µL del homogenato, se agregaron 100 µL de Reduced

glutation, y 100 µL de CDNB (1 – cloro- 2,4 dinitrobenceno), se leyó inmediatamente que fue tiempo cero (T_0) usando un filtro de 340 nm, se volvió a leer transcurridos 5 minutos (T_5). Para el análisis de resultados se saco la diferencia entre ambos tiempos (T_5-T_0) y los resultados negativos se consideraron como 0 y por ultimo para ACE se colocaron 100 µL de homogenato, se agregaron 100 µL de acetilcolina-yodisada y 100 µL de DNTB (Acido- Ditio-Bis-Nitrobenozoico), se leyeron en tiempo cero (T_0) usando un filtro de 414nm, transcurridos 10 minutos (T_{10}) se volvió a leer. Para el análisis de resultados se obtuvo la diferencia entre ambos tiempos (T_{10}-T_0) y los resultados negativos se consideraron como 0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se observa que los valores para α y β-est en poblaciones de pulgón amarillo de 5 municipios de la zona suoreste del estado de Guanajuato, para la enzima α-est el mayor valor se observó en Apaseo el Ato con 1.2827 que de acuerdo a la clasificación de Montella (2007), se encuentra en la escala en el número 5 "Muy Alta". Los siguientes municipios fueron Cortázar y Acámbaro con 0.9177 y 0.7780 respectivamente encontrándose en la escala de resistencia en el número 3 que es "Moderada", y por ultimo Tarimoro y Tarandacuao con 0.7337 y 0.6776 respectivamente que corresponde al 2 que es "Ligera". Para las β-est, el valor más alto se observó en Acámbaro con 1.0880, encontrándose en la escala de resistencia en el número 4 que corresponde a "Alta". Posteriormente se observó Tarimoro y Apaseo el Alto con 1.0305 y 0.9759 respectivamente, con el 3 en la clasificación que es "Moderada". Enseguida se observó Cortázar con 0.8999 encontrándose en la escala número 2 que es "Ligera" y por ultimo Tarandacuao con 0.8058 encontrándose en la escala 1 que es "Nula". Tanto α como β-est fueron las enzimas que se expresaron en mayor cantidad para todas las poblaciones estos valores concuerdan con un estudio realizado por Cao *et al.*, (2008) en afidos del algodón, *Aphis gossypii* en el cual se reportó que las α y β-est se expresan mediante un gen asociado a la sobreproducción de carboxilisterasas asociadas a la resistencia por insecticidas organofosforados.

Tabla 1. Comparación de medias del contenido de α y β-est de Melanaphis sacchari y escala de clasificación de resistencia de los municipios estudiados en el estado de Guanajuato.

No	Municipio	α-est				β-est			
		Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación	Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación
1	Acámbaro	0.778 ± 0.1121	cd	3	Moderada	1.0880 ± 0.0931	a	4	Alta
2	Apaseo el Alto	1.2827 ± 0.1365	a	5	Muy Alta	0.9759 ± 0.1384	b	3	Moderada
3	Cortázar	0.9177 ± 0.1202	b	3	Moderada	0.8999 ± 0.0860	c	2	Ligera
4	Tarandacuao	0.6776 ± 0.1063	cd	2	Ligera	0.8058 ± 0.1108	d	1	Nula
5	Tarimoro	0.7337 ± 0.1112	d	2	Ligera	1.0305 ± 0.1756	ab	3	Moderada

Para el caso de la enzima GST y ACE se muestra en la Tabla 2, en donde se muestra que para GST no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones de los municipios muestreados, solamente en los valores de la escala de clasificación de la resistencia. Los municipios de Tarimoro, Acámbaro y Tarandacuao presentaron en la escala de clasificación número 3 que corresponde a "Moderada", seguidos de Apaseo el Alto y Cortázar en la escala 2 que es "Ligera. Para la enzima GST se observa que este este mecanismo no es significativo en áfidos, ya que se han reportado en diferentes investigaciones que estos presentan cambios en la actividad de enzimas detoxificativas, asociadas en el metabolismo de glutatión en el áfido de la avena *Rhopalosiphum padi,* los migrantes alados de hospederos alternos, cuando comenzaron alimentarse de los cereales la actividad de GST aumentó, mientras que Glutation Reductasa disminuyó (Laskowska *et al*., 1999). Por otra parte, se observa que para la enzima ACE el municipio que reporto el valor más alto fue Tarimoro con 0.0282 encontrándose en la escala en la 4 que es "Alta". Seguido de Cortázar y Apaseo el Alto con 0.0129 y 0.0092 respectivamente, con resistencia 2 que corresponde a "Ligera" y por ultimo Tarandacuao y Acámbaro con 0.0048 y 0.0023 respectivamente, con un valor 1 en la escala de clasificación de resistencia que es "Nula". Al respecto Bisset (2002) menciona que este mecanismo produce un amplio espectro de resistencia a la de los organofosforados y en mayor medida a los carbamatos.

Tabla 2. Comparación de medias del contenido de GST y ACE de Melanaphis sacchari y escala de clasificación de resistencia de los municipios estudiados en el estado de Guanajuato.

No	Municipio	GST				ACE			
		Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación	Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación
1	Acámbaro	0.0228 ± 0.0091	a	3	Moderada	0.0023 ± 0.0034	d	1	Nula
2	Apaseo el Alto	0.0201 ± 0.0135	a	2	Ligera	0.0092 ± 0.0099	bc	2	Ligera
3	Cortázar	0.0199 ± 0.0056	a	2	Ligera	0.0129 ± 0.0117	b	2	Ligera
4	Tarandacuao	0.0218 ± 0.0108	a	3	Moderada	0.0048 ± 0.0100	cd	1	Nula
5	Tarimoro	0.0249 ± 0.0141	a	3	Moderada	0.0282 ± 0.0194	a	4	Alta

Para las Oxi (Tabla 3), el municipio con el valor más alto fue Apaseo el Alto con 0.3787 para la escala de resistencia se encuentra en el número 4 que es "Alta, seguido de Tarandacuao y Cortázar con 0.2861 y 0.2836 respectivamente, encontrándose en la clasificación de resistencia 2 que es "Ligera" y por último se observaron los municipios de Tarimoro y Acámbaro con 0.2298 y en la resistencia se encuentra en la 1 que corresponde a "Nula". Pimentel *et al.*, (2008) mencionan que las oxidasas juegan un papel fundamental en la detoxificación de diversos plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados; según Clark *et al*., (1994), las enzimas oxidativas son el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina.

Tabla 3. Comparación de medias del contenido de Oxi de Melanaphis sacchari y escala de clasificación de resistencia de los municipios estudiados en el estado de Guanajuato.

No	Municipio	Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación
1	Acámbaro	0.0221 ± 0.0413	d	1	Nula
2	Apaseo el Alto	0.3787 ± 0.0742	a	4	Alta
3	Cortázar	0.2836 ± 0.0540	b	2	Ligera
4	Tarandacuao	0.2861 ± 0.0463	b	2	Ligera
5	Tarimoro	0.2299 ± 0.0269	c	1	Nula

CONCLUSIONES

La resistencia del pulgón amarillo a insecticidas en relación al contenido de enzimas detoxificativas se observó en el municipio de Apaseo el Alto para α-Esterasas y Oxidasas, mientras que para β-esterasas el municipio de Acámbaro presentó el mayor valor, en Tarimoro para acetilcolinestrasa, no observando diferencias significativas para glutatión S-transferasas.

BIBLIOGRAFIA

1. Bisset, A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana Medicina Tropical 54 (3).
2. Brogdon, W. G. 1984. Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of singlemosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 79: 457-459.
3. Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 90: 145-150. Brogdon, W. G. (1984). Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of singlemosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 79: 457-459.

4. Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 90: 145-150.
5. Brogdon, W. G.; Mcallister, J. C; Vulule, J. 1997. Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. Journal of the American Mosquito Control Association, 13: 233-237.
6. Cao, C.W., Zhang, J, Gao, X.W., Liang, P. y Guo, H.L. (2008). Overexpression of carboxylesterase gene associated with organophosphorous insecticide resistance in cotton aphids, *Aphis gossypii* (Glover). Pesticide Biochemistry and Physiology 90:175– 180.
7. CESAVEG.2015. Reporte de actividades de la campaña. Contra pulgón amarillo del sorgo. Agosto, 2015. p. 9.
8. Clark, J. M., Scott, J. G.; Campos, F.; Bloomquist, J. R., 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. Annual Review Entomology, 40: 1-30. http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.40.010195.00 024.
9. FAO, 2012. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia de los Plaguicidas.
10. INIFAP. 2015. Control químico del pulgón Amarillo del sorgo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Programa de Investigación: Sanidad Forestal y Agrícolas. Informe de proyecto. Proyecto No. 1025432562.2 p.
11. IRAC, 2015. Comité de Acción para la Resistencia a los Insecticidas. Versión actualizada, octubre 2015.
12. Laskowska I., Leszczynski B., y Markowski J. 1999. Activity of glutathione transferase and reductase in tissues of bird cherry-oat aphid during its host-plant alternation. Exp Toxic Pathol. 51: 357-359.
13. Montella, I. R.; Martins, A. J.; Fernández, V.; Pereira, L. B.; Braga, I. A.; Valle, D. 2007. Insecticide resistance mechanism of Brazilian Aedes aegyti populations from 2001-2004. The American Journal of Tropical Medical and Hygiene, 77: 467-477.
14. Pimentel M. A. G., Antonino F. L. R., Duarte B. M., Humberto S., 2008. Resistance of storedproduct insects to phosphine. Pesq. Agropec. Bras. 43: 1671-1676. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_ arttext&pid=S0100- 204X2008001200005.
15. Rodríguez del B., L. A. and A. P. Terán. 2015. *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae): A new sorghum insect pest in Mexico. Southwestern Entomologist, 40: 433−434.
16. Rott P, Mirkov TE, Schenck S, Girard JC, 2008. Recent advances in research on sugarcane yellow leaf virus, the causal agent of sugarcane yellow leaf. Sugar Cane International 26: 18-27.
17. SENASICA, 2014. Pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehnter). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica, no 43, 15p.
18. Singh BU, Padmaja PG, Seetharama N, 2004. Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in sorghum: a review. Crop Protection 23: 739-755.

PRODUCCION DE GRANO DE MAIZ EN SURCOS CONVENCIONALES Y ESTRECHOS

José Juan González Chávez[16] y Oralia Antuna Grijalva[17]

RESUMEN

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna durante el verano del año 2018. Se evaluaron cinco híbridos comerciales con diferentes distancias entre surco y surco (0.75 m, 0.60 m y 0.40 m), para así poder determinar la relación de surcos estrechos y el rendimiento de grano. El diseño experimental fue un diseño factorial de 5x3 con arreglo en franjas divididas, para el factor A se colocaron los cinco híbridos de maíz y el factor B fueron los tres distanciamientos entre surcos. Los surcos de 0.40 m presentaron el mejor rendimiento de grano con respecto a los demás los híbridos, sobresaliendo Garañón, Alicante y el Canguro con un promedio de 9.027 t ha^{-1}, 7.248 t ha^{-1}y 6.955 t ha-1, respectivamente.

ABSTRACT

The research work was conducted in the field experimental Autonomous Agrarian University "Antonio Narro" Unit Laguna during the summer of the year 2018. Five commercial hybrids with different distances between Groove and Groove were evaluated (0. 75 m, 0.60 m and 0.40 m), to determine the relation ship between narrow rows and grain yield. The experimental design was a design factor of 5 x 3 with arrangement of split strips for A factor were placed five maize hybrids and the B factor were the three distances between rows. Grooves 0.40 m presented the best grain yield with respect to other hybrids, excelling Stallion, Alicante and the Kangaroo with an average of 9.027 t ha^{-1}, 7.248 t h a^{-1}y 6.955 t ha^{-1}, respectively.

Palabras Clave: maíz, grano, híbridos comerciales, surcos convencionales, surcos estrechos.

INTRODUCCION

En México, algunos ejemplos del uso de surcado angosto a nivel comercial se han tenido en el Pacífico Norte, y ya empieza a utilizarse con diferentes modalidades en otras regiones del país. La siembra de maíz en surcos angostos es una nueva tecnología que permite un mayor espaciamiento de plantas en el surco, un mejor aprovechamiento del suelo y agua, y un control más eficiente de maleza. La optimización del suelo consiste en que se establecen más surcos y se aumenta la distancia entre plantas; mientras que para el agua hay un mejor aprovechamiento debido a una temprana cobertura total del suelo y a la reducción de la evaporación de la humedad. Por otra parte, la cobertura temprana del suelo reduce los problemas de maleza (Reta, 2000).

Considerando la importancia de esta tecnología y siendo la Comarca Lagunera una región que implica una alta demanda de producción de forraje y grano de calidad por ser una de las cuencas lecheras más grandes del país; se estableció un experimento con cinco híbridos comerciales de maíz con el objetivo de evaluar el efecto del distanciamiento entre surcos sobre el rendimiento de grano.

METODOLOGIA

Ubicación geográfica de la zona de estudio. El estudio se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna la cual se encuentra localizada localizada en la porción suroeste del estado de Coahuila y al Noroeste del estado de Durango, entre los paralelos 26º51'00" y 24º22'48" de latitud norte y los meridianos 101º51'36" y 104º48'36" al oeste de Greenwich. Abarca cinco municipios en el estado de Coahuila y diez en el estado de Durango. El clima es muy seco con deficiencias de lluvia en todas las estaciones del año y presenta temperaturas semicálidas con inviernos benignos (Santamaría *et al.,* 2004).

Material genético: Se utilizaron cinco híbridos comerciales provenientes de la empresa MONSANTO los cuales se describen a continuación.

[16] Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez S/N. Torreón, Coahuila, México. C. P. 27054. oantuna_77@hotmail.com

[17] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Fitomejoramiento. Derecho de Huelga#112, colonia Fidel Velásquez, C.P. 27059, Torreón Coahuila de Zaragoza. yuliz_salgado@live.com.mx.

Cuadro 1.Características agronómicas de cinco híbridos comerciales de maíz.

HIBRIDO	CICLO VEGATIVO	ALTURAS (cm)		DIAS A FLORACIÓN
		PLANTA	MAZORCA	
Alicante	Intermedio precoz	260-295	140-150	70-75
Canguro	Intermedio	250-280	120-130	71-74
Cimarrón	Intermedio	245-290	140-160	75
Garañón	Intermedio	230-280	140-150	75-77
Guepardo	Intermedio precoz	250-320	150-180	67

Siembra del lote experimental. La siembra se realizó el 22 de abril del 2018, en seco, se llevó a cabo en forma manual, depositando dos semillas por punto de siembra.

Diseño y parcela experimental. El diseño experimental fue un diseño factorial de 5 x 3 con arreglo en franjas divididas para el factor A se colocaron los cinco híbridos de maíz descritos en el Cuadro 1 y el factor B fueron los tres distanciamientos entre surcos, la parcela experimental consistió en 2 surcos de 5 m de longitud a una distancia de 0.75 m, 0.60 m y 0.40 m entre surco y surco, para así obtener una densidad de 100, 000 plantas por ha con un distanciamiento entre planta y planta de 13.2, 16,6 y 25 cm respectivamente para cada distanciamiento entre surco.

Manejo agronómico del lote experimental. Consistió en la realización de un barbecho, rastra, nivelación, y trazos de surcos. Para los surcos estrechos se realizaron manualmente con la ayuda de un azadón.

Variables evaluadas:

Diámetro de mazorca (DM). Se midió la parte central de la mazorca de dos mazorcas de la parcela útil, con un vernier digital marca Truper, se expresa en milímetros (mm).

Número de hileras por mazorca (NH). Se tomaron dos mazorcas de la muestra de cada parcela útil y se contabilizaron el número de hileras en total de cada mazorca.

Número de granos por hilera (NGH). Este dato se obtuvo tomando dos mazorcas de cada muestra, y luego se contabilizaron los granos de tres hileras.

Rendimiento de grano (RG).
El Rendimiento de Grano se calculó con la siguiente fórmula y se expresó en kg ha^{-1}.

$$RG=PG*CSC*\frac{FH}{100}$$

Dónde: RG: rendimiento de grano, PG: peso de grano, CSC: constante de la superficie cosechada y FH: factor de humedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observa diferencia significativa únicamente ($P\geq0.05$) en híbridos en las variables de diámetro de mazorca (DM) y número de hileras por mazorca (NH). El rendimiento de grano (RG) y el número de granos por hilera (NGH) fueron estadísticamente diferentes en la fuente de variación de distancia. En la interacción bloque por distancia e híbrido por distancia, solamente el número de hileras (NH) fue significativo ($P\geq0.05$) con respecto al resto de las variables medidas en el análisis.

La variable de Rendimiento de Grano (RG) presento un alto coeficiente de variación de 24.734%, lo cual se debido tal vez al manejo de toma de datos. En el resto de las variables los coeficientes de variación oscilaron de 0.523 a 10.225 %, los cuales se consideran aun confiables de acuerdo con De la Cruz *et al.,* (2005) quienes afirman que los coeficientes de variación se consideran confiables, cuando es menor al 15 %.

Cuadro 1. Cuadrados medidos para componentes de rendimiento de cinco híbridos comerciales de maíz.

FV	RG	DM	NH	NGH
Hibrido	7.520ns	11.074*	13.950*	17.035ns
Distancia	54.824*	86.299ns	.533ns	115.835*
Bloque	5.902ns	1.577ns	.033ns	0.237ns
Bloque*Distancia	0.939ns	12.088ns	3.333*	4.659ns
Bloque*Hibrido	1.745ns	1.729ns	0.950ns	7.020ns
Hibrido*Distancia	3.206ns	4.243ns	2.200*	6.591ns
Error	3.141	2.723	0.500	6.287
CV%	24.734	3.716	0.523	10.225

*, ** Los valores significativos al 0.05 y 0.01% de probabilidad, ns= no existe significancia, CV%=Coeficiente de Variación, RG= Rendimiento de Grano, DM= Diámetro de Mazorca, NH= Numero de Hileras, NGH= Numero de Granos por Hilera,.

Promedio de Rendimiento de grano (RG).

En la Figura 1 se observa los híbridos más sobresalientes en rendimiento. Garañón, Alicante y el Canguro presentaron pesos de 9.21 t ha^{-1}, 7.67 t ha^{-1} y 4.6 t ha^{-1} respectivamente. Los híbridos se expresaron mejor en el distanciamiento de 0.40 m, ya que a mayor distancia entre planta y planta el rendimiento de grano aumenta, esto se debe a que a lo largo del ciclo la planta tiene menos competencia y puede obtener más nutrientes del suelo, este comportamiento de los híbridos en la producción de grano son similares a lo que encontrados por Barbieri *et al.*, (2000) donde señalan que los surcos angostos (0.35 *vs* 0.7 m) incrementan significativamente el número de granos por unidad de superficie y el rendimiento de grano en maíz.

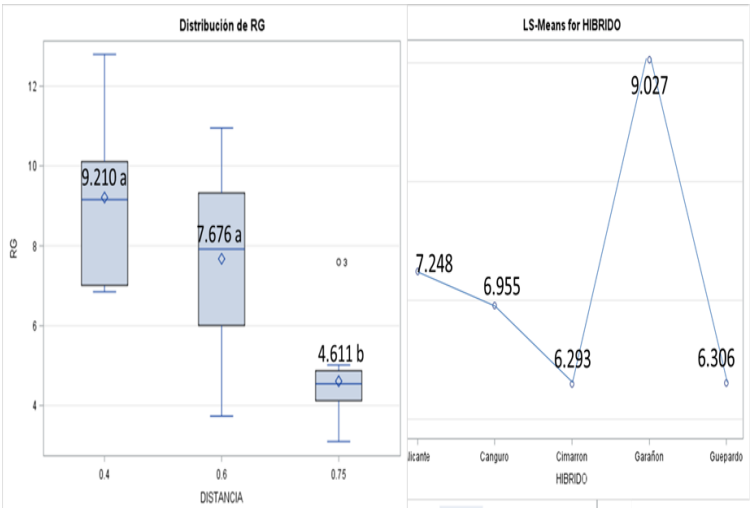


Figura 1. Comportamiento promedio de Rendimiento de grano de cinco híbridos comerciales de maíz

Promedio de Diámetro de mazorca (DM)

Los híbridos tuvieron un comportamiento similar, pero se expresaron mejor en el distanciamiento de 0.40 m con un diámetro de 47.3 cm. Alicante, Garañón y el Canguro presentaron diámetros de mazorca que iban de 46.07 cm a 43.84 cm (Figura 2).

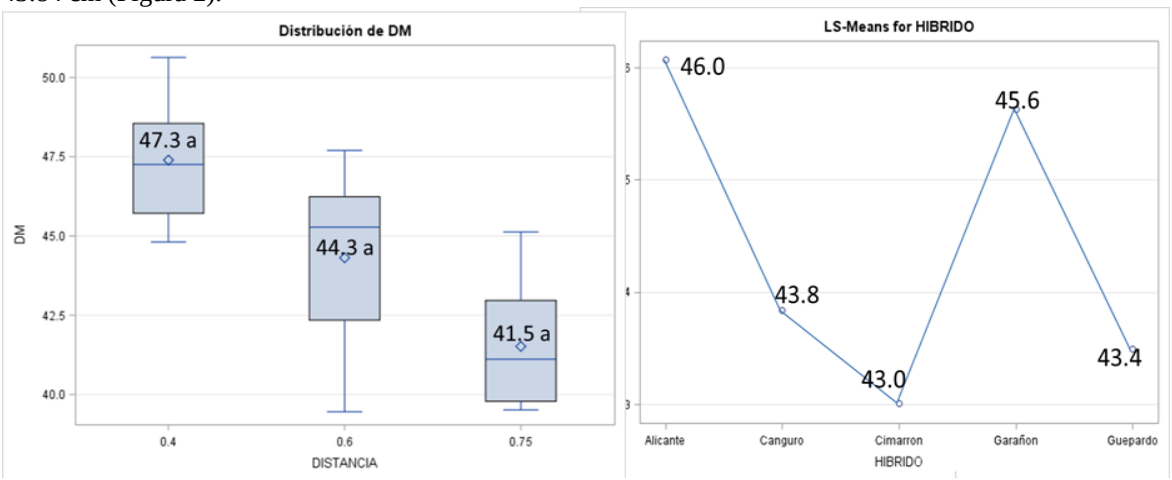


Figura 2. Comportamiento promedio de diámetro de mazorca de cinco híbridos comerciales de maíz

Promedio de Número de hileras por mazorca (NH)

El comportamiento de las medias (Figura 3) de la variable Numero de Hileras (NH) los híbridos más sobresalientes fueron Alicante, Canguro y Cimarrón, con las siguientes medias 17,8 hileras, 16.1 hileras y 15.3 hileras. Los presentaron un comportamiento similar, pero nuevamente se expresaron mejor en el distanciamiento de 0.40 m.

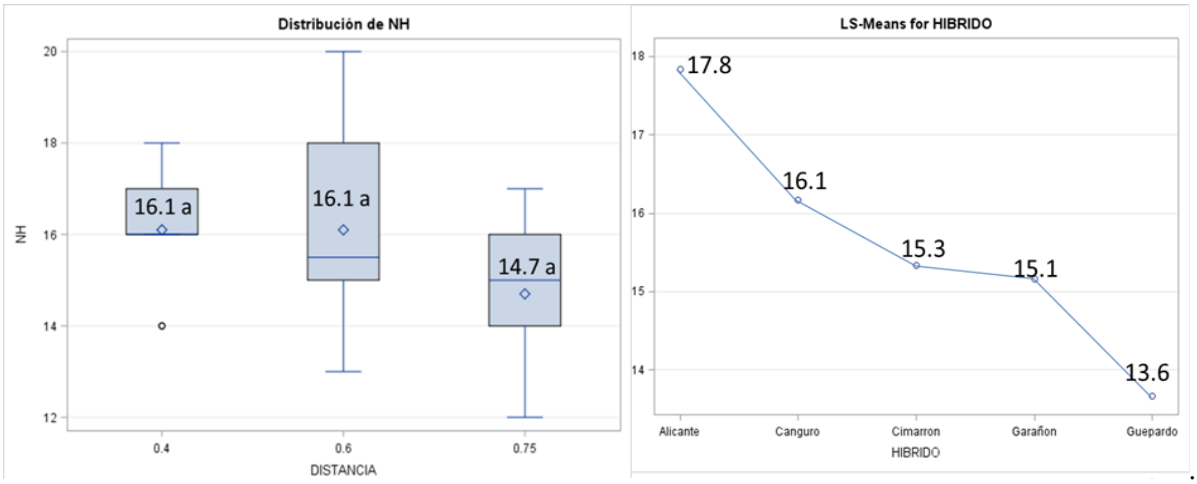


Figura 3. Comportamiento promedio de Número de hileras por mazorca de cinco híbridos Comerciales de maíz

Promedio de Número de granos por hilera (NGH)

En el distanciamiento de 0.40 m los materiales tuvieron una buena expresión en cuanto a número de granos por hilera (NGH). Los híbridos más sobresalientes fueron Alicante, Garañón y Canguro, con los siguientes medias 26.36 granos, 25.86 granos y 24.83 granos (Figura 4).

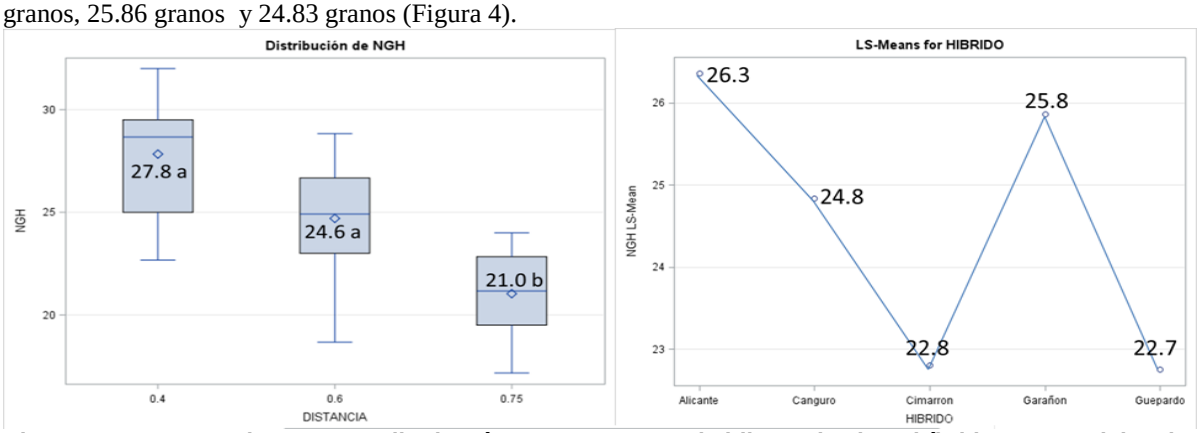


Figura 4. Comportamiento promedio de Número granos por de hileras de cinco híbridos comerciales de maíz

CONCLUSIONES

- El sistema de producción de surcos estrechos incremento el rendimiento de grano, sin disminuir la calidad de la semilla.

- Entre los híbridos y el distanciamiento entre surcos no se encontró interacción, esto fue debido tal vez, porque el origen genético de los híbridos.

BIBLIOGRAFIA

1. Barbieri P A, H R Sainz Rozas, F H Andrade, H e Echeverría (2000) Roe spacing effects at different levels of nitrogen availability in maize. Agron J. 92:283-288

2. De la Cruz L E, Rodríguez H S, Estrada B M A, Mendoza P J D (2005) Análisis dialélico de líneas de maíz QPM para características forrajeras. Universidad y Ciencia 21(41):19-26

3. Reta S D D, A Gaytán M, J S Carrillo A (2000) Respuesta del maíz para ensilaje a métodos de siembra y densidades poblacionales. Rev. Fitotec. Mex. 23:37-48.

4. Santamaría-César J. Figueroa-Viramontes R. Medina-Morales M. (2004) Productividad de la alfalfa en condiciones de salinidad en el distrito de riego 017, Comarca Lagunera. Terra Latinoamericana 22:343.349.

CARACTERIZACION DE FIBRAS PROVENIENTES DE RESIDUOS AGRICOLAS

Serrato López José Juan[1] y Herrera Méndez Carlos Hernán[2]

RESUMEN

La serie de determinaciones a los residuos agrícolas se realizaron dentro de la Universidad de Guanajuato sede Salvatierra., los cuales fueron fibra de nopal, agave y bambú este último usándolo de referencia, las practicas realizas para la caracterización de estas fibras fueron, determinación de proteína, carbohidratos y pectinas, las fibras de nopal y de agave fueron reducidas a un tamaño de tamiz de 420 mics.42 mm. Con la finalidad de tener una homogeneidad en las fibras, la fibra de bambú se utilizó como se adquirió al proveedor. Las fibras de nopal y de agave tuvieron un buen porcentaje de carbohidratos, proteína y de pectinas por lo tanto estas fibras pueden tener un uso para con sumo humano.

ABSTRACT

The series of determinations to agricultural residues were made within the University of Guanajuato, Salvatierra Campus, which were nopal fiber, agave and bamboo this last using it as reference, the practices performed for the characterization of these fibers were, determination of protein, carbohydrates and pectins, nopal and agave fibers were reduced to a sieve size of 420 mics.42 mm. In order to have a homogeneity in the fibers, the bamboo fiber was used as purchased from the supplier. The fibers of nopal, bambú and agave had a good percentage of carbohydrates, protein and pectins therefore these fibers can be used for with great human being.

Palabras Clave: Agave, Bambú, Fibras duras, Nopal,

INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen células especializadas cuya función principal consiste en proporcionar sostén, éstas son las células esclerenquimáticas y su característica principal es una pared secundaria engrosada compuesta de celulosa, hemicelulosa y lignina [1]. Las fibras vegetales se pueden clasificar según sus características morfológicas, estas se clasifican en suaves y duras, las fibras suaves provienen de la corteza de plantas dicotiledóneas en las cuales se encuentra el lino, cáñamo, yute, estas se extraen macerando las plantas con agua durante cierto número de días, para después proceder a la separación y limpieza mecánica., en el grupo de las fibras duras se encuentran todas las variedades de agaves, nopal y algunas palmas, estas se obtienen generalmente de las hojas (laminas y vainas) de las plantas monocotiledóneas y son extraídas de manera mecánica [2].

En México existen una gran diversidad de especies de agaves, el área de distribución comprende los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas y Oaxaca, las características de esta fibra representan un papel importante en el desarrollo histórico del hombre que empezó a hacer utensilios elaborados con fibra de agave tales como cordeles, redes y sandalias y después provino el auge de la elaboración de tanto utensilios domésticos como vestimenta como lo son sogas, estropajos , cepillos, brochas para maquillaje [3].

El nopal es una planta propia del paisaje mexicano y uno de los símbolos más importantes de la nacionalidad se producen en 27 estados de la república Mexicana destacando el Distrito Federal, y los estados de México, Morelos, San Luis Potosí, Jalisco, Aguascalientes, Hidalgo y Puebla, que aportan casi 95% de la producción nacional [4], en el centro de cladodios de nopal (*Opuntia Ficus Indica*) se encuentra un red bilateral de un tejido lignocelulósico que con la edad se endurece y le proporciona una constitución rígida aumentado el grosor e intensifica el color, sin embargo el nopal maduro, de desecho por poda o después de la crianza de grana cochinilla, se puede usar como forraje y si se quiere un aprovechamiento integral puede ser una excelente fuente de fibra por la red lignocelulósico que al purificarse puede implementarse como alimento para consumo humano [5].

En el mundo se producen fibras naturales de origen vegetal en ese contexto México posee una gran diversidad de especies productoras de dicho material, algunas de estas se les considera como residuos agrícolas que pueden utilizarse en diferentes subproductos. En este trabajó se utilizaron desechos agroindustriales como lo son residuos de nopal (*Opuntia Ficus Indica*) la cual se adquirió de los desechos producidos en la producción de grana cochina las

Universidad de Guanajuato, Departamento de ingeniería agroindustrial, C.P 38900, Privada de Arteaga s/n, Col centro, Salvatierra, Guanajuato, chmendez@ugto.mx

pencas tenían una edad de 6 a 12 meses para obtener la fibra de este especie de nopal se obtuvieron por una metodología no descrita en este trabajo debido a que aún está en avance para su optimización.La fibra de agave (*Tequilana).*se obtuvo de productores de ixtle y la fibra de bambú se compró a la empresa Fabpsa. El objetivo de este trabajo es determinar las propiedades químicas de estas tres fibras en cuanto a determinación de carbohidratos, proteínas y pectinas con la finalidad de tener un análisis sobre las características de estas fibras.

METODOLOGÍA

Las prácticas realizadas en este trabajo se realizaron en la Universidad de Guanajuato Campus Celaya- Salvatierra Sede Salvatierra., como se ha mencionado anteriormente para las diferentes determinaciones se usaron solamente las fibras de nopal, agave y bambú para la realización de estas primero se tuvieron que reducir el maño de las fibras de nopal y agave ya que la primera tiene una estructura de abanico y la segunda una estructura alargada por lo cual se redujo el tamaño primero con el uso de tijeras de manera manual y posteriormente con uso de un molino marca (Osterizer 10 velocidades Modelo 853-10,0442-13) y después se procedió a pasar por un tamiz de 40 mallas (mics 420, mm .42, in 0.0165) estos pasos se realizaron para ambas fibras la fibra de bambú no paso por esto ya que es un producto industrializado y su estructura es apropiada para poder hacer el análisis. Las determinaciones se realizaron de la siguiente manera:

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA: Esta determinación se realizó por el método de Bradford la cual se determina por medio de una curva tipo, albumina de suero bovino y el reactivo de Bradford .primero se realizó la curva patrón la cual consiste en una dilución de albumina de 0 a 250 μm/ml a partir de una solución de 500 μm/ml, después esta se mezcló con el reactivo de Bradford en relación 3:1 en tubos de ensaye y se dejó en reposo durante 5 min y se pasó a celdas para centrifuga y leerlas a una absorbancia de 595 nm y para hacer la determinación de las fibras se pesó 0.025 gr de cada fibra se agregó en un vaso de precipitado y se adiciono 10 ml de agua destilada y se dejó en refrigeración por un periodo de 24 hr, trascurrido este periodo se pasó a mezclar con el reactivo de Bradford en una relación 3:1 en tubos de ensaye se dejó en reposo 5 min y se traspasó a celdas para leerse en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS: Para el desarrollo de esta práctica se realizó una gráfica tipo con la cual consistió en hacer una solución estándar de glucosa de 0.1 mg/ml esta se llevó a un volumen de 1000 ml con agua destilada, después se hizo una serie de diluciones en tubos de ensaye por duplicado de 0.00 ml a 1.00 ml del volumen estándar añadiendo en cada uno una relación de 3:1 (tres partes de agua destilada y una del volumen estándar) después a cada tubo se le agrego 1.0 ml de fenol fundido al 5% e inmediatamente se agregó por las paredes del tubo 5 ml de H_2SO_4, se deja en reposo durante un periodo de 10 min y se pasaron a celdas para leerlas en un espectrofotómetro a 490 nm, para la determinación de carbohidratos, se pesó 5 gr de cada fibra y se homogenizo con 40 ml de agua destilada después se hicieron 4 tubos de ensaye por duplicado y se prosiguió con la mismos pasos que para la gráfica patrón.

DETERMINACION DE PECTINAS: Para esta práctica se pesaron 20 gr de las tres fibra estas se añadieron cada una en un matraz Erlenmeyer de 500 ml se adiciono una disolución de ácido cítrico la cual se preparó disolviendo 30gr de ácido cítrico en 300 ml de agua destilada en cada matraz, las fibras deben de estar completamente mojadas por la disolución, los matraz con su respectiva sustancia en su interior se colocó en una parrilla para equipo soxhlets y se le añadió un refrigerante de rosario a cada uno, cuando la disolución con la fibra empezó a hervir se cuentan 30 min y se apaga la parrilla se deja enfriar y después se pasa por tres capas de gasa y papel whatman de 0.642 con ayuda de vacío luego se añadió 300 ml de alcohol respectivamente y se metieron en la parte inferior del refrigerador el cual tenía una temperatura de 8°C durante 12 hr, transcurrido este perdió de tiempo se sacaron y se volvieron a filtrar las soluciones con papel whatman de 0.642 después los tres papeles se metieron aun desecador y cuando estuvieron completamente secos se pesaron y se compararon con el peso de un papel whatman limpio y se determinó el contenido de pectinas de cada fibra.

DETERMINACION DE FIBRA CRUDA: De la tres fibras la de bambú es la más utilizada para alimentos para consumo humano como son en la elaboración de galletas y para retención de agua de algunos productos alimenticios. Así mismo se hizo la determinación de cantidad de fibra cruda que tienen estas fibras para ver si se pueden emplear en un producto para consumo humano, esta determinación se hizo en dos maneras., una con las fibras así como se consiguieron y la otra determinación con las fibras llevadas previamente aun proceso de alto calentamiento esto con la finalidad de ver cuanta fibra cruda se obtenía después del calentamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.- Reducción de tamaño: Las estructuras de las fibras tanto de nopal como de agave (figura 1) son algo brumosas y no permitían desarrollar las prácticas debido a su tamaño por el cual se tuvieron que reducir aun tamaño de 42 mm como se muestra en la (figura 2), la fibra de bambú se estuvo manejando con el tamaño de partícula.

Figura1: a) Fibra de nopal b) agave c) bambú .Las tres fibras se muestran como se obtuvieron inicialmente.

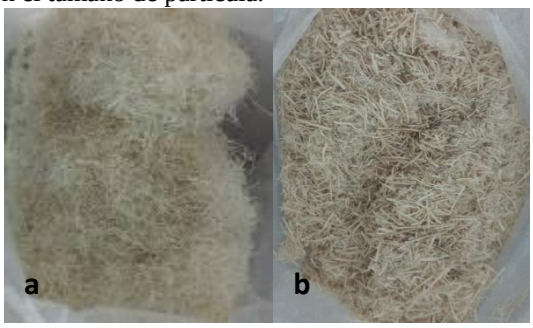


Figura 2:a) Fibra de nopal b) fibra de agave. Ambas con un tamaño de partícula de 42 mm.

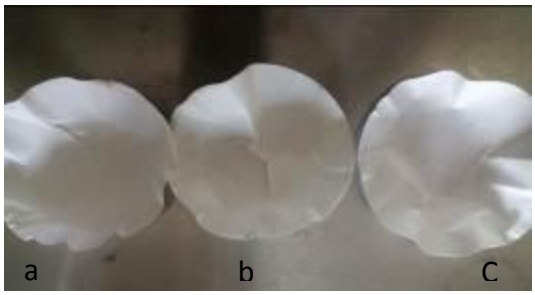
2.- Determinación de proteína: Lo reportado por Guzmán Loayza Deysi en su artículo "Estudio bromatológico del cladodio de nopal (*Opuntia Ficus-indica*)" nos dice que el contenido de proteína en cladodios de 1 año de edad tienen un 0.48% de proteína y Jiménez Muñoz hace mención que el porcentaje de proteína que tiene las hojas de agave tequilana es de 7.77% y en los resultado obtenidos en el verano de estas dos fibras son de 0.9223 % en la fibra de nopal y en las fibras de agave y bambú son de 0.3012 % y 0.9183 % respectivamente como se ve se obtuvieron buenos porcentaje de proteína en las fibras por lo que las hace una buena fuente de proteína (figura 3).

Figura 3: Determinación de proteína de las tres fibras.

3.- Determinación de carbohidratos: En esta determinación se encontró un registro de Guzmán Loayza Deysi en su artículo "Estudio bromatológico del cladodio de nopal (*Opuntia Ficus-indica*)"donde dice que las pencas de nopal tiene un porcentaje de 2.43 % y en cuanto a la fibra de agave se encontró con un porcentaje de 5.11 a 11.83% esto según Montañez-Soto. Los resultados obtenidos en este verano son los siguientes: en la fibra de nopal se obtuvo un porcentaje de 10.8785% y en la agave se registró un 10.8785 % y la bambú con un 5.2378 % (figura 4).

Figura 4: Determinación de carbohidratos de las tres fibras.

4.- Determinación de pectinas: Según lo reportado por Aza Espinosa y Méndez Arellano en "EXTRACCIÓN DE PECTINA DE NOPAL (Opuntia Ficus Indica) POR MEDIO ÁCIDO APLICANDO DOS NIVELES DE TEMPERATURA, TIEMPO Y ESTADOS DE MADUREZ" la pena de nopal y bambú tienen un porcentaje de 0.555 y 0.7 % respectivamente cada fibra por lo que las cantidades que se obtuvieron en la determinación de estas dos fibras son para la fibra de nopal se obtuvo un 6.972 % la cual es una cantidad favorable en cuanto a lo leído en la cita antes mencionada y con respecto a la fibra de bambú se obtuvo un porcentaje bajo el cual es de 1.094 % el bajo contenido pectina en esta fibra se debe a que la fibra utiliza está completamente industrializada lo que esto con lleva a una serie de tratamiento de limpieza y desinfección en cuanto a la fibra de agave se obtuvo una cantidad de 2.14 % en cuanto a lo registrado por Alonso M y L. Rigal tienen un porcentaje de 1% por lo que nos indica que agave que se empleó en la determinación cuenta con un buen porcentaje de pectinas (figura 5).



5.- Determinación de fibra: Para llevar a cabo la determinación de hemicelulosa, celulosa y lignina se tuvieron que mandar las muestras al departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Guanajuato sede Guanajuato y la cual nos mandó los siguientes registros que se muestran en la tabla 1., los resultados de las fibras expuestas a altas temperaturas se está esperando a que lleguen los análisis.

Tabla 1. Cantidad de hemicelulosa, celulosa y lignina en las fibras de nopal, agave y bambú

	Nopal	Agave	Bambú
Hemicelulosa	19.15%	13.78%	5.90%
Celulosa	60.92%	72.57%	82.46%
Lignina	17.06%	11.69%	9.50%

CONCLUSIONES

La realización de este verano fue como parte de la tesis que se está haciendo con la finalidad de tener una caracterización físico-químico de las fibras de nopal, agave y bambú, este verano que lleve a cabo me brindo muchos conocimientos ya que con los practicas realizadas llegamos a la conclusión de que se necesitan hacer más determinaciones a las tres fibras para comprender mejor su características.

BIBLIOGRAFIA

[1] L.J. Hernández Barón, N. Martínez Correa. (2010), Fibras vegetales", en X Feria de la ciencias Universidad Autónoma Metropolitana, pp 1-2, consultada en http://feriacienciasuami.com/semana/documentos/fibrasvegetales.pdf (22-07-18).
[2] Leticia P. Dobrecky (2012), "Plantas textiles", en Centro de Documentación e Información Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca República de Argentina No 6 pp. 1-24. Consultada en

https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/biblioteca/recreativas/_archivos//060000_P%C3%A1ginas%20recreativas%2006%20-%20Planta%20textiles.pdf (22-07-18).
[3] David Castillo Quiroz, J. Trinidad Saenz Reyes, Mario Narcia Velasco (2013), "Propiedades físico-mecánicas de la fibra de Agave lechuguilla Torr. de cinco procedencias bajo plantaciones", en Rev. Mex. De ciencia forestales vol. 4 No 19 Septiembre-Octubre, [pp. 1-14].
[4] Marco A. Anaya-Pérez, Refugio Bautista-Zane (2008), "El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX", en agric. Soc. desarro vol. 5 No 2 Texcoco Julio Diciembre [pp. 1-17].
[5] Laura Victoria Aquino González, Juan Rodríguez Ramírez, Ana María Méndez Rojas (2012), "Extracción y caracterización de fibra de nopal (*Opuntia Ficus Indica*)", en Rev. Naturaleza y desarrollo Vol. 10 No 1 Enero- Junio [pp. 2-9].
[6] Aza Espinosa Marcela Elizabeth y Mendez Arellano Mario Antonio (2011), "EXTRACCIÓN DE PECTINA DE NOPAL (Opuntia Ficus Indica) POR MEDIO ÁCIDO APLICANDO DOS NIVELES DE TEMPERATURA, TIEMPO Y ESTADOS DE MADUREZ", Universidad tencnica del norte Ibarra- Ecuador, pp. 20-40. Consultada en http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/743/1/03%20AGI%20293%20TESIS.pdf.
[7] Guzmán Loayza, Deysi; Chávez, Jorge "Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano "en revista de la Sociedad Química del Perú, vol. 73, núm. 1, enero-marzo, 2007, [pp. 41-45].
[8] Edith Jiménez- Muñoz, Francisco Prieto-García, Judith Prieto-Méndez, Otilio A. Acevedo-Sandoval & Rodrigo Rodríguez-Laguna (2016), "Caracterización fisicoquímica de cuatro especies de agaves con potencial en la obtención de pulpa de celulosa para elaboración de papel" Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, Pachuca, México, pp. 232-242. Consultada en http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v83n197/v83n197a30.pdf.
[9] Montañez-Soto, José; Venegas-González, José; Vivar-Vera, María; Ramos-Ramírez, Emma "Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul Bioagro", en Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, vol. 23, núm. 3, septiembre-diciembre, 2011, [pp. 199-206

VISUALIZACIÓN DIGITAL DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA AGRICULTURA

José Roberto Guerrero Ramírez[1] y Braulio Gutiérrez Medina[2]

RESUMEN

La flora microbiana presente en los suelos de interés agrónomo presenta una gran diversidad de microorganismo, dentro de los cuales se encuentran los hongos filamentosos como lo es *Trichoderma atroviride*, este hongo es utilizado como biocontrol debido a sus capacidades fitopatógenas. En el presente trabajo se monitoreó la germinación de esporas de las cepas mutante (en donde fue deletada la proteína de la cinesina) y silvestre de esta especie, con el propósito de obtener una comparación óptima entre ambas. Dentro de los resultados obtenidos se caracterizaron las esporas por medio del procesamiento digital de imágenes utilizando el software Image J, cuantificando diámetros y cantidad de esporas por volumen específico.

ABSTRACT

The microbial flora present in the soils of interest in agronomy presents a large diversity of microorganisms, in which filamentous fungi are present such as *Trichoderma atroviride*, this fungus is used as biocontrol due to its phytopathogenic capacities. In the present work, the germination of spores of mutant stock (where the kinesin protein was removed) and wild type of this species was monitored, with the purpose of obtaining an optimum comparison of both. Throughout the obtained results, the spores were characterized by means of digital processing of images using the Image J software, quantifying diameters and quantity of spores per specific volume.
Palabras claves: *Trichoderma*, cinesina, nanomotor, *ImageJ*, Velocidad de germinación.

INTRODUCCION

Los hongos filamentosos son microorganismo encontrados comúnmente en el suelo a diversas profundidades, los cuales se ven favorecidos por su habilidad de crear hifas y micelios, es bien sabido que el hongo llega abarcar grandes extensiones ya que presumiblemente llega a tener una mejor asimilación de nutrientes al extender su colonia, son microorganismo con una alta complejidad en todos los aspectos que lo conforman como lo son sus estructuras y rutas metabólicas por mencionar algunas. El suelo al ser un gran ecosistema presenta una alta interacción entre todos los organismos que lo integran, principalmente las micorrizas que denotan por ser asociaciones anatómicas íntimas entre las raíces de las plantas y algunos hongos del suelo, donde el hongo Trichoderma atroviride juega un gran papel como defensa de la planta contra otros hongos que pueden llegar a afectar la planta hospedadora.

Un rasgo característico de las especies de Trichoderma es la producción de anillos de conidiación concéntricos en respuesta a ciclos alternos de luz y oscuridad. Recientemente hemos demostrado una respuesta de fotoconidiación más compleja y específica de especie en Trichoderma (Steyaert et al., 2010). En adición a esto, la competencia por la fotoconidiación depende estrictamente del estado metabolito del microorganismo y de la edad de este.

Micoparasitismo es el fenómeno por el cual un hongo es parásito en otro hongo, un estilo de vida que se puede fechar por lo menos hace 400 millones de años por la evidencia fósil. (Taylor et al., 2005). Esto tiene especial relevancia cuando el ataque es dirigido hacia una planta, proporcionando una estrategia para el control biológico de las plagas para la protección de las plantas, comúnmente llamado "biocontrol". Probablemente los agentes de biocontrol más estudiados sean las especies del género *Hypocrea / Trichoderma*, *Trichoderma atroviride* (Ta) y Trichoderma *virens* (Tv) - los teleomorfos *Hypocrea atroviride e Hypocrea virens*, respectivamente - que se encuentran entre los mejores agentes de biocontrol micoparasitario utilizados en la agricultura. (Harman et al., 2004). Los efectos favorables de *Trichoderma spp.* en las plantas comprenden rasgos tales como la capacidad de antagonizar los patógenos transmitidos por el suelo mediante una combinación de lisis enzimática, secreción de antibióticos y competencia por el espacio y los sustratos. (Howell, 2003, Harman, 2006).

[1] Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Carretera Torreón-Matamoros Km 7.5, Ejido El Águila, C.P. 27275, Torreón, Coahuila.
roberguermz95@gmail.com
[2] Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., División de Materiales Avanzados, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4 sección, CP. 78216. San Luis Potosí, S.LP.
bgutierrez@ipicyt.edu.mx

La mejora basada en la ciencia de agentes de control biológico para aplicaciones agrícolas requiere una comprensión de los principios biológicos de sus acciones.Hasta ahora, algunos de los aspectos moleculares, como la regulación y el papel de las enzimas hidrolíticas de la pared celular y los metabolitos secundarios antagónicos, se han estudiado en *Trichoderma* (Harman et al., 2004).

La mayoría de las nuevas proteínas sintetizadas en la célula se transportan activamente a lo largo de filamentos citoesqueléticos direccionales a su destino apropiado mediante motores moleculares. Las proteínas se transportan en varios orgánulos membranosos y complejos proteicos, y los ARNm se transportan en grandes complejos proteicos. (Hirokawa,1998. Hirokawa et al., 2008). El transporte intracelular direccional es más prominente en las células polarizadas, como las neuronas y las células epiteliales, y es fundamental para la función neuronal y la supervivencia porque la mayoría de las proteínas requeridas en el axón y las terminales nerviosas necesitan ser transportadas desde el cuerpo celular. Por lo tanto, las neuronas son un buen modelo de sistema para estudiar el transporte intracelular. (Hirokawa et al., 2005).

Entre los motores moleculares que participan en el transporte intracelular, se han identificado tres grandes superfamilias: cinesinas, dineínas y miosinas. Las cinesinas usan microtúbulos como un "riel" para transportar carga, y usan la energía química del ATP para impulsar cambios conformacionales que generan fuerza motriz. Las dineínas usan microtúbulos para conducir menos el transporte retrógrado dirigido hacia el extremo y la motilidad de los cilios y flagelos. Las miosinas se mueven a lo largo de los filamentos de actina para controlar la contracción muscular y el transporte de corto alcance que típicamente ocurre debajo de la membrana plasmática. Aquí, nos centramos en el papel de las proteínas de la superfamilia cinesina (también conocidas como KIFs, por sus siglas en inglés) en el proceso de transporte intracelular en varios tipos de células. (Hirokawa et al., 2009).

La modificación genética en los microorganismo nos ha dado a los seres humanos una mejor perspectiva de los múltiples beneficios que podemos llegar a obtener a partir de esta práctica, pero de manera contraria hemos llegado a observar y comprender que con una mínima modificación a la estructura genética de estos organismos para ellos genera enormes cambios, en el caso de Trichoderma atroviride se ha llegado a modificar su estructura genética por la técnica de *knockout* donde el gen endógeno se extrae y se intercambia por una versión mutada, que se introduce. Esta versión mutada puede eliminar toda la secuencia del gen, que es lo más conveniente, esta técnica se aplicó sobre el gen de la cinesina, deletando lo.

El objetivo del presente trabajo es el estudio del porcentaje de germinación a través del tiempo del hongo Trichoderma atroviride y en los efectos que llega a tener la supresión de la cinesina sobre el crecimiento en las primeras etapas de germinación de las esporas, y a sí mismo se enfoca en la cuantificación de los diámetros de las esporas en etapas tempranas y etapas con primeros indicios de germinación. En primera instancia se discute sobre las comparaciones de las dos cepas de interés de estudio en la etapa de germinación y cuáles son los efectos de la supresión del nanomotor denominado cinesina.

MÉTODOS Y MATERIALES

Monitoreo de la germinación de esporas de las cepas mutantes y silvestres pertenecientes al hongo Trichoderma atroviride a partir del procesamiento digital de imágenes.

Se prepararon cajas Petri desechables (90x15mm) con agar PDA estéril, en estas se inocularon las cepas mutante y silvestre del hongo *Trichoderma atroviride*, la inoculación se llevó acabo recortando un cuadrado del medio con el hongo, posteriormente colocando el cuadrado de forma invertida en una nueva caja con agar PDA estéril. Se dejo crecer a temperatura ambiente por 5 días con ciclos de luz y obscuridad con duración de 12/12 horas (Fig. 1)

Una vez que el hongo presentara un crecimiento radial sobre todo la superficie del agar se procedió a la recolección de esporas, adicionando 2 ml de agua destilada sobre el hongo, raspando la superficie con un asa de Digralsky de vidrio. Con la ayuda de una micropipeta (1000 µl) se recolecto el sobrenadante el cual se colocó en tubos eppendorf previamente etiquetados con los códigos WT (Wild Type) para la cepa silvestre y F4.2 1 para la cepa mutante, finalmente se guardaron los stocks a una temperatura de 4°C, dichos stocks presentaron una concentración de 10^8 esporas/ml.

Se realizaron diluciones de los stocks de las dos cepas del hongo, la concentración con la cual se trabajó la cepa silvestre para este experimento fue de 10^4 1:6 esporas/ml y la cepa mutante de 10^4 esporas/ml.

Para proceder con la observación de la germinación de las esporas se utilizaron cajas Petri desechables (90x15mm) en las cuales se colocaron portaobjetos, sobre ellos se posicionaron dos tiras de agar PDA. Cada tira agar se inoculó a lo largo con 5 gotas de 0.5 µl de la dilución perteneciente a la cepa a estudiar, cada caja se incubo a una temperatura de 28 °C sin agitación y se etiquetaron iniciando con la hora 6 a la 14. La hora 6 fue la primera lectura, con la ayuda de una cámara (AmScope MU300) adicionada a un microscopio triocular (AmScope), se tomaron fotos a 4x de cada

gota, después se procedió a contar la cantidad de esporas con la ayuda del software ImageJ 2.0, en el cual se creó un *Macro* (Fig. 2), se utilizó para facilitar la tarea del conteo de esporas por volumen dado. Se repitió la captura y cuenta de esporas cada hora hasta llegar a hora 14 con ambas cepas.

Cuantificación del diámetro de las esporas de las cepas silvestre y mutante por medio de visualización digital.

Se recrearon los portaobjetos con tiras de agar PDA estéril para poder realizar la medición de diámetros de las esporas de ambas cepas (mutante y silvestre), la inoculación de las tiras se realizó a partir del stock, el cual se diluyó hasta una concentración de 10^6 esporas/ml. Cada tira de PDA se inoculó a lo largo con 5 gotas de la dilución 10^6 esporas/ml.

Para realizar las observaciones al microscopio, se eligieron 2 horas para realizar las mediciones de diámetro. La primera medición se realizó a la hora 0(directamente del stock), la segunda medición se realizó después de 6 horas de incubación a 28°C sin agitación. Para realizar la medición de diámetros se tomaron aproximadamente 22 fotos para ambas mediciones con un aumento de 40x, se utilizó una escala de 6.7px/µm, únicamente para el objetivo de 40x. Para tomar las fotos que se utilizaron en la cuantificación de diámetros se utilizó el criterio de enfocar la espora hasta que se mostrara de color blanco en su mayoría y solo el contorno de la espora permaneciera obscuro, el criterio antes mencionado se aplicó para el caso de ambas cepas. (Fig. 3)

La medición de los diámetros a partir de las fotos capturadas se realizó por medio de un algoritmo creado en un *Macro* que se escribió en el programa ImageJ 2.0 (Fig. 4).

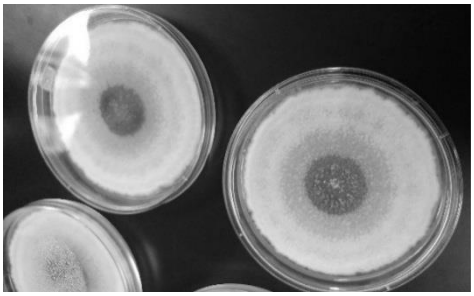


Figura 1. Crecimiento radial del hongo T. atroviride

```
run("8-bit");
rename("1");
run("Duplicate...", "title=2");
run("Gaussian Blur...", "sigma=6.5");
run("Image Expression Parser (Macro)", "expression=A-B a=1 b=2");
rename("Foto");
run("8-bit");
setAutoThreshold("Default");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=1-30 circularity=0.8-1.00 show=[Overlay Masks] display clear include");
close ("1");
close ("2");
close ("Foto");
```

Figura 2. Macro para el conteo de esporas a 4x

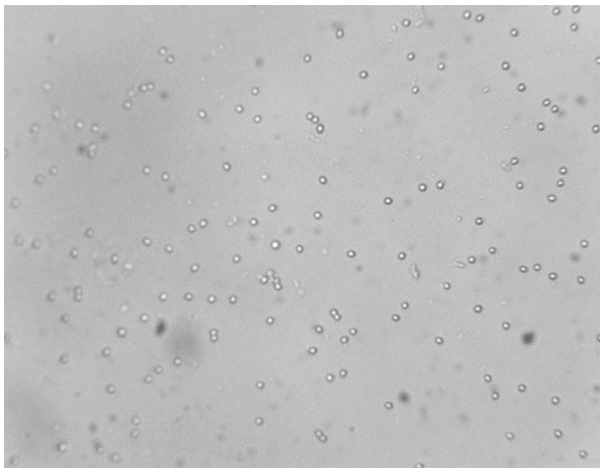


Figura 3. Criterio de enfoque para la cuantificacion de diametros

```
//*ESCALA TRABAJANDO A 40X*
sumatoria = 0;
for (p=1; p<=23; p++) {
    open("C:/Users/JR/Videos/Esporas/Diametro/Kin 10^6 6hrs/"+p+".bmp");
    run("Set Scale...", "distance=6.7 known=1 pixel=1 unit=µm global");
    run("8-bit");
    rename("x");
    run("Duplicate...", " title=y");
    //Sigma= 6.5>7.4
    run("Gaussian Blur...", "sigma=7");
    run("Image Expression Parser (Macro)", "expression=A-B a=x b=y");
    rename("Foto");
    run("8-bit");
    close("x");
    close("y");
    setAutoThreshold("Default");
    //run("Threshold...");
    setOption("BlackBackground", false);
    run("Convert to Mask");
    run("Fill Holes");
    run("Watershed");
    run("Analyze Particles...", "size=5.00-250.00 circularity=0.3-1.00 show=[Overlay Masks] display clear include");
    suma = 0;
    prom = 0;
    x=0;
    j=0;
    while(j==0){
        x++;
        valor = eval ("js","Analyzer.getResultsTable().getValueAsDouble(0,"+x+")");
        if(valor < 1){
        j=1;
        }
    }
    for(i=0; i<x; i++) {
        valor=eval("js","Analyzer.getResultsTable().getValueAsDouble(0,"+i+")");
        //print (valor);
        d=sqrt((4*valor)/PI);
        print(d);
        suma = suma + d;
    }

    close("Foto");
    prom = suma/x;
    print ("Diámetro promedio = " + prom);
    sumatoria = sumatoria + x;
}
print("esporas:"+ sumatoria);
```

Figura 4. Macro establecido para la cuantificación de diámetros a 40x

RESULTADOS Y DISCUSION

Basándonos en la R2 que nos arroja el ajuste de la gráfica, podemos observar que en la cepa silvestre WT nuestro ajuste sigmoidal es del 98.21% de variación entre nuestras variables de estudio y si lo comparamos con la cepa mutante Δ Kin F4.2 1 su R2 es del 94.68%, lo que nos indica que el porcentaje de germinación varia más en la cepa mutante. Lo que se puede considerar como un efecto de la supresión de la cinesina de la cepa mutante, reflejado en el proceso de germinación de las esporas. (Fig. 5 y Tabla 1).

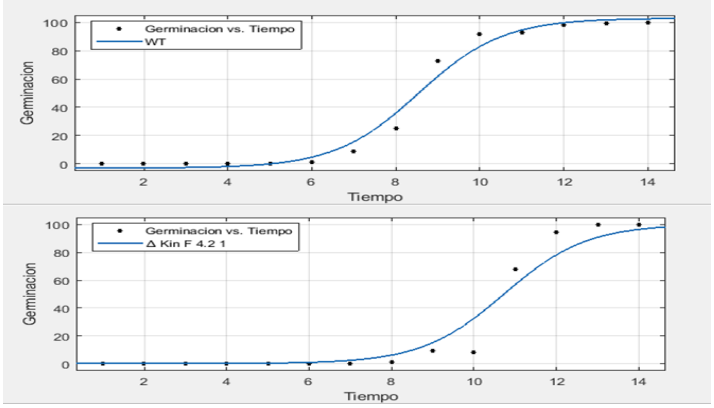


Figura 5. Porcentaje de Germinación vs Tiempo, ambas cepas.

Tabla 1. Ajuste sigmoidal

Constante	Cepa silvestre (WT)	Cepa mutante (ΔKin F4.2 1)
a	106 (97.12, 114.8)	100 (fixed at bound)
b	-2.97 (-8.778, 2.838)	0.1582 (-7.251, 7.567)
x0	8.545 (8.125, 8.965)	10.73 (10.05, 11.41)
R^2	0.9848	0.9509
R^2 Ajustada	0.9821	0.9468

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede observar que entre ambas cepas se presenta una enorme variación de datos con respecto al porcentaje germinación, lo que nos demuestra que el efecto de la supresión de la cinesina en el hongo toma un papel importante en las primeras etapas de desarrollo del microorganismo, tomando en cuenta que ambas cepas se incubaron a las mismas condiciones.

BIBLIOGRAFIA

Taylor TN, Hass H, Kerp H, Krings M, Hanlin RT. (2005). Perithecial ascomycetes from the 400 million year old Rhynie chert: an example of ancestral polymorphism. Mycologia. 97:269-285.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M.(2004). Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2:43-56.

Howell CR.(2003). Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 2003, 87:4-10.

Harman GE.(2006). Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. Phytopathology. 96:190-194.

Steyaert JM, Weld RJ, Stewart A. (2010). Light- and injury-induced conidiation in Trichoderma are differentially affected by nitrogen source. Fungal Biology 114 (2-3): 179–188.

Verhey, K. J., & Hammond, J. W. (2009, November). Traffic control: Regulation of kinesin motors. Nature Reviews Molecular Cell Biology. https://doi.org/10.1038/nrm2782

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 279, 519–526.

Hirokawa, N. & Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. Physiol. Rev. 88, 1089–1118.
Hirokawa, N. & Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. Nature Rev. Neurosci. 6, 201–214.
Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nature Reviews Molecular Cell Biology. https://doi.org/10.1038/nrm2774

AGRADECIMINETOS

Agradezco a Dios, al IPICYT y al Dr. Braulio Gutiérrez Medina por haberme permitido colaborar en la investigación, de igual manera agradezco al Dr. Braulio por la confianza brindada y la directriz otorgada de manera sabia y ardua. A Gamaliel Sánchez Orellana por su continua motivación y gran orientación. A mi compañera Aura Figueroa González por su apoyo y tolerancia que me brindo ante cualquier situación.
Por último, pero no menos importante agradezco a todo el equipo que conforma el Laboratorio de Nanoestructuras I, a la Dra. Alejandra Gutiérrez y al Dr. Alexis Vázquez por gran orientación en mis experimentos.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE DOS EXTRACTOS VEGETALES

Juan Pablo Orozco Martínez[1] y Rafael Alejandro Veloz García[2].

RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó la actividad antifúngica de distintas concentraciones de extractos de semilla de trompeta (*Angelica archangelica)* en agua y en cloroformo sobre el hongo *Fusarium oxysporum* mediante el método de alimento envenenado para determinar si es posible emplearlos para el control de hongos fitopatógenos. Los controles, los tratamientos con extracto en cloroformo y un tratamiento con extracto en agua no presentaron crecimiento de *F. oxysporum*, posiblemente debido a la inviabilidad de los inóculos empleados. En cambio, en el tratamiento con 50 mg/mL de trompeta en agua hubo crecimiento del micelio, sugiriendo la presencia de carbohidratos enriqueciendo el medio, pero presentándose también hifas aéreas de tamaño considerable que pueden indicar estrés generado por compuestos con actividad antifúngica.

ABSTRACT

In this study, antifungal activity of different concentrations of *Angelica archangelica* seed extracts on water and chloroform was evaluated against *Fusarium oxysporum* using the poisoned food technique to determine if it is possible to use those extracts for plant pathogenic fungi control. Controls, chloroform extract treatments and one water extract treatment had no *F. oxysporum* growth, probably due to use of non-viable inoculum. However, there was mycelium growth on a treatment using water extract at a concentration of 50 mg/mL, suggesting carbohydrate presence enriching growth medium, but there was also large aerial hyphae growth, probably indicating stress caused by compounds with antifungal activity.

Palabras clave: Actividad antifúngica, *Angelica archangelica, Fusarium oxysporum*, extracto acuoso, extracto en cloroformo, alimento envenenado.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad en plantas consiste en la alteración de una o varias de sus funciones por organismos patógenos o por determinadas condiciones del ambiente en que se desarrollan. Para que ocurra alguna enfermedad en una planta, deben interactuar tres componentes: la planta hospedera, el patógeno y determinadas condiciones ambientales dentro de límites favorables (Urbina, 2011).

Existen aproximadamente 3000 especies de plantas que se emplean como alimento por el ser humano, de las cuales sólo 11: arroz, maíz, trigo, sorgo, caña de azúcar, papa, yuca, frijol, patata, plátano y coco, constituyen el 95% del suministro de alimentos a la humanidad. Se conocen más de 1,300 especies de hongos, 4,105 especies de nematodos, 950 especies de virus, 30 de viroides y 100 de bacterias que causan enfermedades en los cultivos mencionados. Las enfermedades de importancia económica producen pérdidas en los cultivos de una o varias maneras: reducción en el rendimiento de las plantas, reducción de la calidad del producto, contaminación del suelo, pérdidas de poscosecha, incrementos en costos de producción, costos de manejo y predisposición a otras enfermedades (Guzmán, 2009).

Los hongos son los principales organismos fitopatógenos, representando una pérdida económica importante en la agricultura. Las enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos afectan el rendimiento de numerosos cultivos, resultando en la pérdida anual de aproximadamente el 13% de las cosechas globales (Moore, 2016).

Una de las especies de hongos fitopatógenos más importantes debido a su impacto económico es *Fusarium oxysporum*. Éste provoca una enfermedad conocida como fusariosis en un amplio rango de plantas hospederas. Los síntomas de la fusariosis incluyen pardeamiento vascular, epinastia, marchitamiento progresivo, defoliación y atrofia, provocando incluso la muerte de la planta (Di Petro, 2012). Existen variantes de *F. oxysporum*, que en conjunto

[1]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química; Hidalgo S/N, Col. Las Campanas, C.P: 76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, jp.orozcomtz@gmail.com

[2]Universidad de Guanajuato, Dpto. de Ingeniería Agroindustrial; Privada Arteaga S/N, Col. Centro, C.P: 38000, Salvatierra, Guanajuato, alejandroveloz@ugtomx.onmicrosoft.com

infectan más de cien hospederos, entre los que se encuentran el melón, tomate, algodón, plátano, papa, frijol, ajo, calabaza, cebolla, col, narciso, sandía y vainilla (Di Petro, 2012).Tan solo en la producción de plátano, se estima que *F. oxysporum* generará pérdidas por 10 billones de dólares a nivel global entre 2017 y 2040 si no se toman medidas efectivas al respecto (FAO, 2017). En la producción mundial de papa, puede causar pérdidas del 10% al 53% de los cultivos (Villa, 2015). En México, se estima que puede causar la pérdida de más del 50% del cultivo de tomate (Hernández, 2014). En el caso del cultivo de frijol, también a nivel nacional, puede reducir su rendimiento hasta en un 50% (Montiel, 2005).

Siendo los hongos fitopatógenos una de las principales causas de pérdidas de cultivos a nivel mundial, resulta importante el desarrollo y uso de estrategias que permitan su control. Entre tales estrategias destacan los fungicidas químicos, el control biológico y los biofungicidas. Los fungicidas químicos sistémicos del grupo de los benzimidazoles se emplean para tratar las enfermedades causadas por *Fusarium spp*. y otros hongos. En dicho grupo de fungicidas se encuentran el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. No obstante, es probable que estos fungicidas sean agentes mutagénicos de las plantas y que incrementen la resistencia de los hongos ante su efecto. Además, su uso representa un riesgo para la salud humana y contribuye a la contaminación ambiental (Villa, 2015).

Ante los inconvenientes que implica el uso de fungicidas químicos, se ha dedicado un gran esfuerzo al desarrollo de alternativas para el control de hongos fitopatógenos. De esta manera, se ha desarrollado el control biológico, que consiste en la reducción de la densidad de inóculo, o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o parásito por la acción de uno o más organismos (Melgarejo, 2006). Por otra parte, los biofungicidas controlan las infecciones de hongos fitopatógenos mediante productos naturales. Existen tres tipos de biofungicidas: los biofungicidas microbianos tienen como ingrediente activo un agente de control biológico; los biofungicidas vegetales son sustancias fungicidas producidas por la planta, a partir de material genético que ha sido incorporado a ésta; y los fungicidas bioquímicos contienen sustancias que ocurren en forma natural, afectando directamente a los organismos patógenos o estimulando resistencia sistémica adquirida (RAS) en la planta (McGrath, 2004).

Para el desarrollo y comparación de fungicidas químicos y biofungicidas, es necesario evaluar la actividad antifúngica del compuesto en cuestión. De esta manera, existen diversos métodos de evaluación antifúngica, algunos de los cuales se mencionan a continuación:

1) El método de dilución en caldo consiste en exponer el hongo a estudiar, en medio líquido, a diferentes concentraciones del fungicida que se está evaluando.
2) La prueba colorimétrica consiste en el uso del compuesto MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) como indicador de crecimiento del hongo.
3) El método de difusión en agar consiste en inocular el hongo en medio sólido y colocar discos de papel filtro impregnados en distintas concentraciones del fungicida. De acuerdo al diámetro de inhibición obtenido, se evalúa si el hongo es resistente o susceptible a la concentración usada de fungicida.
4) El método de alimento envenenado consiste en preparar medio de cultivo al que se agrega una concentración determinada de fungicida, se inocula el hongo y se evalúa su resistencia o susceptibilidad (Ernst, 2015).

Cabe destacar que entre los métodos alternativos para el control de hongos fitopatógenos, se ha dado énfasis al estudio de nuevos compuestos derivados de fuentes vegetales, como aceites esenciales, extractos vegetales y metabolitos secundarios (Villa, 2015).

En este aspecto, una fuente vegetal que resulta de interés es la planta *Angelica archangelica*, coloquialmente conocida como "trompeta": una hierba de raíz gruesa, hojas grandes y flores blancas muy ramificadas. Esta planta ha sido utilizada desde tiempos remotos en medicina tradicional como expectorante, sedante, carminativa, diaforética y estimulante. Además, el género *Angelica* por sí mismo es conocido por sus propiedades medicinales, empleándose numerosas especies como remedio para distintas dolencias y enfermedades. Los principios activos presentes en estas plantas incluyen cumarinas, compuestos acetilénicos, chalconas, sesquiterpenos y polisacáridos (Sarker, 2004). En un estudio previo, se reportó que el aceite esencial de raíces de *A. archangelica* tiene actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* y algunas especies del género *Fusarium* (Fraternale, 2014).

En el presente trabajo, se evaluó la actividad antifúngica de extractos de semilla de *A. archangelica* en agua y en cloroformo sobre el hongo *F. oxysporum* mediante el método de alimento envenenado para determinar si es posible emplearlos para el control de hongos fitopatógenos.

MÉTODOS Y MATERIALES

Obtención de material biológico

El material biológico del que se partió fue semilla de trompeta (*Angelica archangelica*), otorgada por el Dr. Rafael Alejandro Veloz García. La planta fue recolectada en el cerro de El Lobo, comunidad de Las Cruces, municipio de Salvatierra, Guanajuato.

Obtención de extractos vegetales

Para la obtención de extractos de trompeta, se utilizaron agua y cloroformo como solventes. Para el extracto en agua, 100 g de semilla de trompeta se dejaron macerar en 1L de agua. Para el extracto en cloroformo, 100 g de semilla de trompeta se dejaron macerar en 1 L de cloroformo. Posteriormente, ambos macerados se sometieron a baño ultrasónico a alta intensidad durante 15 minutos en un equipo Cole-Parmer. Los macerados volvieron a someterse a baño ultrasónico bajo las mismas condiciones 24 y 48 horas después del primer tratamiento. Después, los extractos líquidos de ambos tratamientos se separaron de los sólidos mediante filtración con papel filtro. Los extractos líquidos resultantes se sometieron a destilación para concentrarlos empleando un rotavapor y una bomba de vacío Buchi, aplicando una presión de 200 mbar, una velocidad de giro de 5 rpm y una temperatura de 40 °C, que se incrementó gradualmente hasta 50 °C. Una vez concentrados los extractos, se almacenaron en frascos ámbar y se refrigeraron.

Ensayo de alimento envenenado

Para evaluar la actividad antifúngica de la trompeta, se llevó a cabo un ensayo de alimento envenenado sobre *F. oxysporum*. El extracto de trompeta en agua y el extracto de trompeta en cloroformo se colocaron en baño María durante 30 minutos para facilitar su manipulación. Se prepararon tres cajas Petri con PDA con una concentración de 50 mg/mL de extracto de trompeta en agua, tres cajas con PDA con concentración de 50 mg/mL de extracto de trompeta en cloroformo, tres cajas con PDA con 50 µg/mL de extracto de trompeta en agua y tres cajas con PDA con 50 µg/mL de extracto de trompeta en cloroformo. Como control, se prepararon dos cajas Petri de PDA sin extracto. El pH de cada medio se ajustó a 3.5 con HCl. Las placas se colocaron en incubación durante 48 horas a 35 °C para verificar que no hubiera contaminación, tras lo cual se inocularon como se describió anteriormente y se incubaron a 35 °C. Durante seis días, se midió el diámetro de crecimiento de *F. oxysporum* en todas las cajas, tomando cuatro medidas del hongo en crecimiento y promediando. Los resultados (ver Tabla 1) se reportaron como el promedio de las réplicas ± la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de material biológico y de extractos vegetales

A partir de la semilla de trompeta (ver Figura 1) recolectada en el cerro de El Lobo, comunidad de Las Cruces, Salvatierra, se obtuvieron aproximadamente 7 g de extracto en agua y 1.5 g de extracto en cloroformo (ver Figura 2).

Figura 1. Semillas de trompeta.

Figura 2. Extracto semilla de trompeta en agua (izquierda) y de semilla de trompeta en cloroformo (derecha).

El agua actúa como disolvente para compuestos polares, mientras el cloroformo actúa como disolvente moléculas de menos polaridad, por lo tanto, se espera que la composición de cada extracto resulte diferente.

Aunque en el presente estudio no se analizó la composición de los extractos obtenidos, realizar tal análisis resulta de importancia, ya que en ocasiones diferentes extractos vegetales de la misma parte de una planta y empleando el mismo solvente, resultan tener una composición distinta (Fraternale, 2014).

En extractos de trompeta se ha reportado la presencia mayoritaria de monoterpenoides, seguidos de sesquiterpenos y en menor medida de monoterpenoides oxigenados y sesquiterpenos oxigenados (Fraternale, 2014). Específicamente en extractos de semilla de trompeta obtenidos por hidrodestilación, se reportaron los siguientes compuestos

predominantes: β-felandreno (59.4%), α-copaeno (3.3%) α-pineno (2.9%), α-felandreno (2.3%) y criptona (2.6%) (Wolski, 2003). Por su parte, en extractos de semilla de trompeta obtenidos mediante hexano, el compuesto mayoritario también fue β-felandreno (66.4-82.1%), seguido de otros como α-Pineno (8.3–10.3%), α-felandreno (3.1-4.3%), mirceno (3.4-7.3%), limoneno (2.0%) y sabineno (5.4-11.3%) (Holm, 1997). Es posible que los extractos obtenidos tengan composiciones similares.

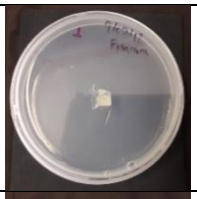
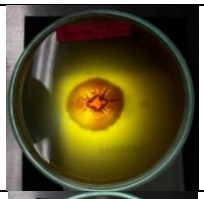
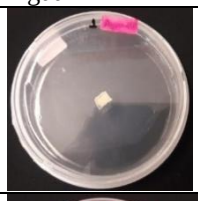
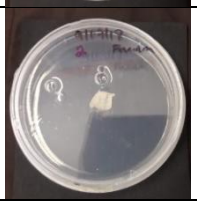
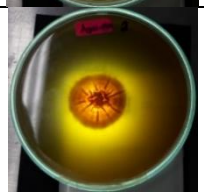
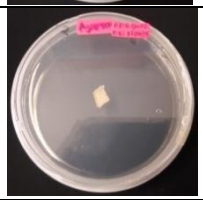
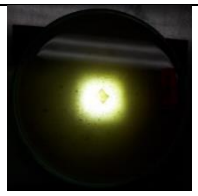
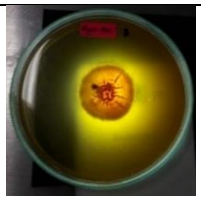
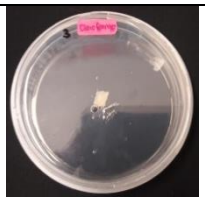
Ensayo de alimento envenenado

El crecimiento de *F. oxysporum* en los controles y los tratamientos se cuantificó durante seis días (ver Tabla 1). El diámetro de micelio reportado en la Tabla 1 para las cajas donde no hubo crecimiento corresponde al diámetro del inóculo inicial. El crecimiento en las cajas al sexto día de incubación se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Cuantificación del crecimiento de F. oxysporum en los distintos tratamientos.

Tratamiento	Diámetro del micelio (cm)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Control	1.15 ± 0.075	1.15 ± 0.075	1.15 ± 0.075	1.15 ± 0.075	1.15 ± 0.075	1.15 ± 0.075
50 mg/mL Cloroformo	0.7333 ± 0.0656	0.7333 ± 0.0656	0.7333 ± 0.0656	0.7333 ± 0.0656	0.7333 ± 0.0656	0.7333 ± 0.0656
50 mg/mL Agua	**0.9083 ± 0.0117**	**0.9083 ± 0.0117**	**1.5667 ± 0.1047**	**2.2333 ± 0.116**	**2.875 ± 0.0204**	**3.4333 ± 0.0311**
50 µg/mL Cloroformo	0.9 ± 0.0707	0.9 ± 0.0707	0.9 ± 0.0707	0.9 ± 0.0707	0.9 ± 0.0707	0.9 ± 0.0707
50 µg/mL Agua	0.8916 ± 0.0235	0.8916 ± 0.0235	0.8916 ± 0.0235	0.8916 ± 0.0235	0.8916 ± 0.0235	0.8916 ± 0.0235

Tabla 2. Crecimiento de micelio de F. oxysporum en los distintos tratamientos.

Réplica	Control	50 mg/mL Cloroformo	50 mg/mL Agua	50 µg/mL Cloroformo	50 µg/mL Agua
Caja 1					
Caja 2					
Caja 3	-				

Como puede observarse, no hubo crecimiento del hongo en ninguno de los tratamientos con extracto de trompeta en cloroformo, ni con el tratamiento de 50 µg/mL de extracto de trompeta en agua. Sin embargo, estos resultados difícilmente pueden interpretarse como una inhibición del crecimiento de *F. oxyspurum* por parte de los extractos, debido a que los controles tampoco presentaron crecimiento alguno. Las condiciones de cultivo empleadas (pH de 3.5 y temperatura de 35°C) se encuentran dentro de los parámetros reportados para el crecimiento de *F. oxysporum*, que son temperatura de entre 8 y 36°C y pH mínimo de 3 (Balasu, 2015). Por lo tanto, es posible que la ausencia de crecimiento en los controles y los tratamientos mencionados se deba a la inviabilidad del inóculo utilizado. Los

inóculos se tomaron de placas de PDA con *F. oxysporum* presentando un crecimiento miceliar limitado y con ausencia de hifas aéreas. Se ha reportado que, para favorecer el crecimiento de hongos filamentosos, el inóculo debe provenir de colonias con crecimiento activo (Peksen, 2013).
En cambio, en el tratamiento de 50 mg/mL de extracto de trompeta en agua pudo apreciarse un crecimiento progresivo (ver Tablas 1 y 2). Además de crecimiento de micelio vegetativo, resultó característica la presencia de hifas aéreas de tamaño considerable. Es posible que el desarrollo del hongo en el medio se favoreciera debido a la presencia de carbohidratos en el extracto. Se ha reportado la presencia de carbohidratos, principalmente fructosa, glucosa y sacarosa en extractos de trompeta (Kylin, 2010). En cambio, la abundancia y tamaño de hifas aéreas puede indicar la presencia de compuestos que provocan estrés al hongo. En estudios previos, se ha observado que el β-felandreno, α-pineno, limoneno y mirceno, todos componentes importantes en los extractos de trompeta, pueden inhibir la germinación de esporas y el crecimiento de micelio en hongos filamentosos (Nivinskiene, 2007). Además, se ha demostrado la actividad antifúngica de extracto acuoso de trompeta, reportándose una concentración mínima inhibitoria de 300 µg/mL y una concentración mínima fungicida de 600 µg/mL para *F. oxysporum* (Fraternale, 2014). Por lo tanto, es probable que la concentración relativamente alta de 50 mg/mL de extracto de trompeta en agua haya proporcionado al hongo carbohidratos en cantidad suficiente como para promover su crecimiento, a la vez que la presencia de compuestos con actividad antifúngica generó estrés sobre el mismo.

CONCLUSIONES

En las placas de control y en los tratamientos con 50 µg/mL de trompeta en agua, 50 µg/mL de trompeta en cloroformo y 50 mg/mL de trompeta en cloroformo no hubo crecimiento de *F. oxysporum*, posiblemente debido a la inviabilidad de los inóculos empleados. Por lo tanto, no fue posible evaluar la actividad antifúngica de tales extractos. En cambio, en el tratamiento con 50 mg/mL de trompeta en agua hubo crecimiento del micelio, sugiriendo la presencia de carbohidratos enriqueciendo el medio, pero presentándose también hifas aéreas de tamaño considerable que pueden indicar estrés generado por compuestos con actividad antifúngica. Se requieren más experimentos para determinar si los extractos de trompeta obtenidos pueden emplearse como agentes de control de hongos fitopatógenos en ensayos *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

BALASU, A., CRISTEA, S., ZALA, C. & OPREA, M. (2015). "The biological growth parameters of the Fusarium oxysporum f. sp. glycines fungus" en Romanian Biotechnological Letters, Núm. 20, Vol. 6, [pp. 10921-10928].

DI PETRO, A., DEAN, R., VAN KAN, J., PRETORIUS, Z., HAMMOND-KOSACK, K., SPANU, P., RUDD, J., DICKMAN, M., KAHMANN, R. & ELLIS, Y. (2012). "The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology" en *Molecular Plant Pathology*, Núm. 13, Vol. 4, [pp. 414-430].

ERNST, E. & ROGERS, P. (2005). *Antifungal agents. Methods and protocols*, Totowa: Humana Press.
FAO. (2017). "The global programme on banana fusarium wilt disease". Consultada en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/fcc/web_programmesummary_PRINT.pdf (fecha de consulta 26-06-2018).

FRATERALE, D., FLAMINI, G. & RICCI, G. (2014). "Essential oil composition of Angelica archangelica L. (Apiaceae) roots and its antifungal activity against plant pathogenic fungi" en *Plant Biosystems*, Núm. 150, Vol. 3, [558-563].

GUZMÁN, O., CASTAÑO, J. & VILLEGAS, B. (2009). "Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico" en *Agron.*, Núm. 17, Vol. 2, [pp. 7-24].

HERNÁNDEZ, R., LÓPEZ, A., BORREGO, F., ESPINOZA, J., SÁNCHEZ, D., MALDONADO, I. & LÓPEZ, L. (2014). "Razas de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici en predios tomateros en San Luis Potosí" en *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, Núm. 7, Vol. 5, [pp. 1169-1178].

HOLM, Y., VUORELA, P. & HILTUNEN, R. (1997). "Enantiomeric Composition of Hydrocarbons in n-hexane Extracts of Angelica archangelica L. Roots and Seeds" en *Flav. Fragr. J*, Núm. 12, [pp. 397–400].
Kylin, M. (2010). "Angelica archangelica L." (Tesis de pregrado). Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, Suecia.

MCGRATH, M. (2004). “What are fungicides” en The American Phytopathological Society. Consultada en: https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidesSpanish.aspx (fecha de consulta 27-06-2018).

MELGAREJO, P. & DE CAL, A. (2006). “Biofungicidas y control biológico de hongos fitopatógenos: aplicación en la filosfera” en *Phytoma*, Núm. 182.

MONTIEL, L., GONZÁLEZ, F., SÁNCHEZ, B., GUZMÁN, S., GÁMEZ, F., ACOSTA, J., RODRÍGUEZ, R., SIMPSON, W., CABRAL, M. & MENDOZA, M. (2005). “Especies de Fusarium presentes en raíces de frijol (Phaseolus vulgaris L.) con daños de pudriciones, en cinco estados del centro de México” en *Revista Mexicana de Fitopatología*, Núm. 23, [pp. 1–10].

MOORE, D. (2016). “Fungal diseases and loss of world agricultural production” en Moore, D., Robson, G. y Trinci, A. *21st Century Guidebook to Fungi*, Cambridge: Cambridge University Press.
NIVINSKIENE, O., BUTKIENE, R. & MOCKUTE, D. (2007). “The Seed (Fruit) Essential Oils of Angelica archangelica L. Growing Wild in Lithuania” en *Journal of Essential Oil Research*, Núm. 19, Vol. 5, [pp. 477-481].

PEKSEN, A., KIBAR, B., & YAKUPOGLU, G. (2013). “Favourable Culture Conditions for Mycelial Growth of Hydnum Repandum, a Medicinal Mushroom” en *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, Núm. 10, Vol. 6, [pp. 431–434].

SARKER, S. & NAHAR, L. (2004). “Natural medicine: the genus Angelica” en Current Medicinal Chemistry, Núm. 11, Vol. 11, [pp. 1479-1500].

URBINA, M. (2011). *Fitopatología general*, Estelí: Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco.
VILLA, A., PÉREZ, R., MORALES, H., BASURTO M., SOTO, J. & MARTÍNEZ, E. (2015). “Situación actual en el control de Fusarium spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales” en *Acta Agronómica*, Núm. 2, Vol. 64, [pp. 194-205].

WOLSKI, T., NAJDA, A. & LUDWICHUK, A. (2003). “The Content and Composition of Essential Oils and Fatty Acids obtained from the Fruits of Angelica (Angelica officinalis Hoffm.)” en *Herba Polonica*, Núm. 49, Vol. 3, [pp. 151-156].

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE MESTIZOS DE MAÍZ GENERADOS CON DOS PROBADORES CONTRASTANTES-II.

Julia Salgado Patricio[18] - Armando Espinoza Banda[19]

RESUMEN

En la presente investigación del verano de la Ciencia 2018 se involucraron 25 líneas, producto de la investigación de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Formando 22 mestizos estos fueron cruzados con un probador denominado TL-244 (cruzas simples) la finalidad del experimento fue para obtener excelentes características Agronómicas deseables.

ABSTRACT

In the present investigation of the Summer of Science 2018 25 lines were involved, product of the research of the Autonomous Agrarian University "Antonio Narro". Forming 22 mestizos these were crossed with a tester called TL-244 (simple crosses) the purpose of the experiment was to obtain excellent desirable Agronomic characteristics.

PALABRAS CLAVES

Maíz, líneas, Probador, Rendimiento, Mejoramiento genético, (ACG).

INTRODUCCIÓN

En México el desarrollo del mejoramiento genético del maíz (*Zea mays L.)* por hibridación fue iniciado por la hoy extinta Oficina de Estudios Especiales de la Secretaria de Agricultura y Ganadería, en 1943 (Wellhausen, 1950). El propósito fue obtener híbridos más rendidores que las variedades criollas regionales en las tres principales zonas agrícolas de México: Mesa Central, El Bajío y los Trópicos húmedo y seco. La hibridación tuvo éxito, ya que en la década de los 50 se liberaron los híbridos tropicales H- 501, H-502 y H-503, que superaron a las variedades criollas en 30 % o más (Reyes *et al.,* 1955).

El mejoramiento genético es un proceso continuo en la formación de nuevas variedades e híbridos comerciales (Beltrán *et al.,* 2003; Malacarne y San Vicente, 2003). Se han desarrollado sistemas de apareamiento o diseños genéticos para conocer la acción génica de caracteres cuantitativos, determinar la aptitud combinatoria de los progenitores, seleccionar los mejores y diseñar los métodos de mejoramiento más eficientes (Comstock y Robinson, 1948; Comstock y Robinson 1952; Griffing, 1956 y Cockerham, 1963).

El uso de la ACG y ACE como herramientas en el mejoramiento genético es muy común no sólo para rendimiento de grano sino para otros caracteres, como tolerancia a salinidad (Welcker *et al.,* 2005), producción de etanol (Lorenz *et al.,* 2009), tolerancia al frío (Rodríguez *et al.,* 2007), digestibilidad en maíz forrajero (Argillier *et al.,* 2000), cantidad y calidad de proteína (Bhatnagar *et al.,* 2004.

Los estimadores de ACG y ACE ayudan a los mejoradores a visualizar estrategias de mejoramiento por hibridación y selección (Welcker *et al.,* 2005; de la Vega y Chapman, 2006).

La probabilidad de que el mejor probador sea una variedad de polinización libre de bajo rendimiento, una línea homocigótica recesiva o en general una población con baja frecuencia de loci importantes, ha recibido importancia práctica y teórica desde su proposición por Davis (1934) y Hull (1945). Según Allison, Curnow (1966) y Márquez (1988), el mejor probador es el que contiene todos los genes recesivos para el carácter de interés.

[18] Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Torreón, Coahuila. aebanda7@yahoo.com.mx

[1]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Media, Carretera Rioverde-San Ciro de Acosta Km 4, Ejido Puente del Carmen, C.P: 79617, Rioverde, San Luis Potosí, felipe_alvarado28@hotmail.com; juan.cardenas@uaslp.mx

METODOLOGÍA

Actividades que se llevaron a cabo durante la investigación del período Verano de la Ciencia: Datos de cruzas Probador x Línea:
Localización. Campo experimental de la UAAAN-UL. Ubicado geográficamente entre 24° 30' y 27° LN y entre 102° y 105° LO, a 1120 msnm.
El proyecto de investigación consto de dos etapas:

Primera Etapa. Durante la primavera-verano del año 2017 **s**e sembraron 25 líneas de maíz y una línea que fungió como probador registrado como TL-244. Se sembraron dos surcos de tres metros de largo y 0.75m entre surcos por cada línea, con distancia de 0.25m entre planta. El probador se sembró cuatro surcos a tiempo, cuatro a los 7 días, dos a 14 días y los dos últimos fueron a 21 días después de la siembra de las líneas. Al momento en que empezaron a emerger los jilotes se cubrieron antes de que los estigmas fueran vistos esto para evitar la contaminación de polen. Las líneas se polinizaron con el probador manualmente de tres a cuatro plantas y se autofecundo la primera planta de cada línea. Se cosecharon 22 mestizos el 24 de agosto del 2017, separando cada cruza para evitar alteraciones de datos. Asimismo se tomaron datos de la floración masculina y femenina de líneas y probador.

Segunda Etapa, El Ciclo primavera-verano del presente año 2018, se sembraron para la evaluación los 22 mestizos, incluyendo al probador (TL-244) y dos híbridos comerciales como testigos regionales (Guepardo, RX8520). El diseño estadístico fue en bloques al azar, dado con tres repeticiones.

Siembra:
Se sembró el 14 de abril en parcelas de 3m de largo y 0.75m entre surco y, a una distancia entre plantas de 0.15m colocando dos semillas por golpe para posteriormente aclarar a una planta, con el fin de asegurar un mayor porcentaje de germinación de las semillas en el experimento.

Manejo de cultivo. A los 25 días de después de la siembra cada parcela se aclaró, dejando 21 plantas por surco, para una densidad de 88,888 plantas ha^{-1}.

Control de maleza: Para el control de maleza se aplicó un herbicida pre-emergente HARNESS (Acetoclor: 2-cloro-N-etiximetil etilacet-o-toluidida al 75.3%), la dosis recomendada por la etiqueta del producto de 2.0-3.0 L/Ha a los 5 días posterior a la siembra.

Fertilización: Se realizó con la fórmula ostentada 200-100- 00 (N-P-K), por medio del riego presurizado por goteo con ayuda de Venturi.

Riego: Se utilizó cintilla calibre 6000, con emisores a 20 cm con un gasto de 1L/h y una presión de 7 Lb. La lámina total de riego fue de 59.74 cm y el INIFAP (2017) recomienda una lámina de riego de 65 cm, con certeza se dice que se encuentra dentro del rango de la lámina.

Control de plagas: Se llevó un control eficiente contra el *spodoptera frugiperda* se utilizó Clorpirifos 48 (Clorpirifos) con una dosis de 0.5-1.5 L/Ha, Kendo (lambda cyalotrina) con una dosis de 0.300 a 0.500 L/Ha, Coragen (Clorantraniliprol) dosis de 0.75-125 mL/100L y *Tetranychus urticae* se utilizó Abamectina (Abamectina) con una dosis de 60-80 L/Ha, Sunfire 240 SC (Clorfenapir) con una dosis de 0.30-125 cc/100L.

Variables evaluadas: Se tomaron datos de días a Emergencia, floración masculina tanto femenina.

Análisis. El análisis de las variables se realizó con el programa SAS v.9.0, (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las deducciones del análisis de varianza se concentran dentro de la tabla 1. En lo cual indica que para la emergencia, no se encontró diferencia significativa entre bloques y tratamientos, puesto que la emergencia presentó un rango muy constreñido que fluctuó entre los 6 y 8 días después de la siembra, con un promedio de 7.06 días.

La variable de la floración masculina puede observarse que en los bloques no se encontró diferencia significativa, en cambio entre tratamientos la diferencia fue significativa. En diferencia con emergencia, la floración se dio en un rango más amplio, de los 50 y 64 días después de la siembra, con una media de 63.70 días.
En la variable de la floración femenina se observó entre bloques no se observa diferencia significativa, no así entre tratamientos donde se detectó diferencia significativa. Los días a floración femenina, muestra un rango más amplio que en floración masculina, de los 50 a 67 días después de la siembra con una media de 66.22 días.

Tabla 1. Significancia de cuadrados medios de tres variables cuantificadas en 22 mestizos y tres testigos en el Campo Experimental de la UAAAN-UL, 2018.

Fuente	Grados de Libertad	Emergencia	Flor masculina	Flor Femenina
Tratamientos	24	0.33 ns	6.73 ns	7.07 **ns**
Bloques	2	2.89 ns	6.41 **ns**	6.81 **ns**
Error Experimental	48	0.18**	1.39 ns	1.41 ns
Total	74			
Media		7.06	63.70	66.22

**: Significativo al 5% de probabilidad, ns: no significativo. EME=Emergencia, FM=Floración masculina, FF=Floración femenina.

Los resultados se agruparon en el análisis de varianza.
En la floración masculina hubo diferencia, el mestizo precoz es el EN-04-2 x TL-244 tuvo un valor de 61.6 días, el mestizo tardío fue En-06-16 X TL-244 con un valor de 66.0 días, aun siendo así los mestizos fueron más precoces que la TL-244 ya que este tubo un media de 67.0 y en comparación de los híbridos Guepardo tuvo una media de 61.0 días y el RX-8520 una media de 63.0 días, lo que nos indica que estos son aún más precoces.

En cuanto a la floración femenina hubo diferencia, el mestizo EN-04-2 X TL-244 obtuvo un valor de 63.3 días, el más precoz EN-07-12 x TL-244 con una media de 62.6 días el cual es el más tardío de los 22 mestizos fueron EN-02-16 x TL-244 y EN-06-16 x TL-244 con una media de 67.3. Siendo de esta forma Se observa que los mestizos no superan al testigo (Probador) TL-244 ya que este cuenta con una media de 67.6 días.

Cuadro 1 (GL: Grados de libertad, EME: Emergencia, FM: Floración masculina, FF: Floración femenina, **: altamente significativo, ns: no significativo).

Tabla 2. Valores medios y Aptitud Combinatoria General (ACG) de Emergencia, Floración masculina y Floración Masculina de 22 mestizos, en el Campo Experimental de la UAAAN-UL, 2018.

Medias				ACG		
Tratamiento	**EME**	**FM**	**FF**	**EME**	**FM**	**FF**
Guepardo	7.3 a	61.3 e	62.6 d			
RX-8520	7.6 a	63.0 ebdc	66.0 bdac			
TL-244	7.0 a	67.0 a	67.6 a			
EN-02-4 x TL-244	7.3 a	63.6 ebdac	67.0 bac	0.24	-0.1	4.78
EN-02-7x TL-244	7.0 a	65.0 ebdac	66.0 bdac	-0.06	1.3	3.78
EN-02-16 x TL-244	7.0 a	65.0 ebdac	67.3 ba	-0.06	1.3	5.08
EN-03-3 x TL-244	7.6 a	63.0 ebdc	67.0 bac	**0.54**	-0.7	4.78
EN-03-9 x TL-244	7.3 a	63.6 abdac	67.0 bac	0.24	-0.1	4.78
EN-03-13 x TL-244	7.3 a	63.6 ebdac	67.0 bac	0.24	-0.1	4.78
EN-04-2 x TL-244	6.6 a	61.6 e	63.3 bdc	-0.46	**-2.1**	1.08

EN-04-4 x TL-244	7.3 a	62.6 edc	67.0 bac	0.24	-1.1	4.78
EN-05-8 x TL-244	7.3 a	64.0 ebdac	67.0 bac	0.24	0.3	4.78
EN-05-10 x TL-244	7.0 a	64.0 ebdac	67.0 bac	-0.06	0.3	4.78
EN-05-12 x TL-244	6.6 a	65.6 bdac	67.0 bac	-0.46	1.9	4.78
EN-06-7 x TL-244	7.0 a	66.6 ba	68.3 a	-0.06	2.9	6.08
EN-06-10 x TL-244	7.0 a	64.3 ebdac	66.3 bdac	-0.06	0.6	4.08
EN-06-12 x TL-244	7.0 a	62.6 ebdc	67.0 bac	-0.06	-1.1	4.78
EN-06-16 x TL-244	6.6 a	66.0 bac	67.3 ba	-0.46	2.3	5.08
EN-07-5 x TL-244	6.6 a	63.0 ebdc	66.0 bdac	-0.46	-0.7	3.78
EN-07-7 x TL-244	6.6 a	63.6 ebdac	65.6 dac	-0.46	-0.1	3.38
EN-07-8 x TL-244	6.6 a	62.3 edc	67.0 bac	-0.46	**-1.4**	4.78
EN-07-12 x TL-244	6.6 a	62.0 ed	62.6 d	-0.46	**-1.7**	0.38
EN-08-01 x TL-244	7.0 a	63.0 ebdc	67 bac	-0.06	-0.7	4.78
EN-08-6 x TL-244	7.0 a	62.6 edc	63.6 bdc	-0.06	-1.1	1.38
EN-08-12 x TL-244	7.6 a	62.6 edc	65.6 bdac	**0.54**	-1.1	3.38
Media	7.06	63.7	62.22			

***Tratamientos con la misma letra, son estadísticamente iguales, (Tukey 0.05).** EME=Emergencia, FM=Floración masculina, FF=Floración femenina. La floración femenina muestra menos variación que la masculina, pues la máxima

La magnitud de los valores de ACG (Tabla1) para la variable EME se considera bajos ya que son menores a la unidad. Con los valores positivos resalta el mestizo **EN-03-3 x TL-244 y EN-08-12 x TL-244 (0.54)** el cual tiende a incrementar el número de días a la emergencia, en tanto los mestizos con los valores más negativos, tenderán a requerir menos días para emerger. Para la variable FM, los genotipos **EN-04-2 x TL-244**, **EN-07-8 x TL-244** y **EN-07-12 x TL-244** muestran valores de ACG negativos, lo cual indica que transmiten a su progenie la condición genética de la precocidad, en contraste, los mestizos que muestran valores de ACG positivos y mayores a la unidad, condicionaran a ser más tardíos para alcanzar esta etapa fenológica. Para floración femenina (FF), se observa la misma tendencia, los mestizos con valores negativos mayores a la unidad contribuirán con mayor precocidad.

CONCLUSION

Se observó en las variables de las floraciones masculinas y femeninas diferencia entre tratamientos pero no entre bloques, debido a la heterogeneidad que existe entre los 22 mestizos y los tres testigos. El mestizo EN-04-2 x TL-244 fue el precoz en la floración masculina como la femenina, pero lo que nos indica que estos fueron aún más precoces que el testigo TL-244, sin embargo los dos testigos comerciales, en la floración femenina como masculina mostraron ser más tardías. El mestizo EN-06-7 x TL-244 fue el más tardío en la floración masculina al igual en la femenina pero aun siendo asi supera a los híbridos comerciales en lo tardío.

BIBLIOGRAFIA

Argillier, O., V. Méchin, and Y. Barrière. 2000. Inbred line evaluation and breeding for digestibility–related traits in forage maize. Crop Sci. 40: 1596–1600.

Beck D., L., Betran, C., Sanchez, G., O. Edmeades, m., Banzinger, M., Sierra, O., Cano y A., Ortega. 1997. Yield potential of hybrids developed from tropical semiprolific populations. In: Book of abstracts the genetics and exploitation of heterosis in crops. An international symposium, Mexico. P 104-105.

Beltrán F. J, J. M Ribaut, D Beck, D González de León. 2003. Genetics diversity, especific ability, and heterosis in tropical maize ander stress and non; stress enviroments. Crop Sci. 4: 707-806.

Bernardo, R. 2001. Breeding potential of intra–and interheterotic group crosses in maize. Crop Sci. 41: 68–71.

Bhatnagar, S., F. J. Betrán, and L. W. Rooney. 2004. Combining abilities of quality protein maize inbreds. Crop Sci. 44: 1997–2005.

Castellanos J., S., A., R., Hallauer y H.,S. Cordova. 1998. Relative performance of testers to identify elite lines of corn (*Zea mays L.*) Maydica 43: 217-226.

Comstock R. E y H. F. Robinsón. 1948. The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degrees of dominance. Biometrics. 4:254-266.

Comstock R. E. y R. N. Moll. 1963. Genotype environment interactions. Simposium on stadistical genetics and plan breeding. Was-NPC pub. Pp. 164-165.

De la Vega, A. J., and S. C. Chapman. 2006. Multivariate analyses to display interactions between environment and general or specific combining ability in hybrid crops. Crop Sci. 46: 957–967.

Márquez S., F. 1988. Genotecnia Vegetal. Métodos, Teoría y Resultados. Tomo II. AGT editor S. A., México, D. F. 756 p.

Marquez S.,F. 1988. Genotecnia vegetal, metodos, teoria, resultados. Tomo ll. AGT Editor. Mexico 665p.

Mendoza E. M.A. oyervides G., Y S. Rodrriguez H. 2000. Efecto de dos probadores en la seleccion de lineas de maiz tropical. Rev. fitotec. Mex 23 (1): 79-86.

Mendoza E., M., A. Oyervides G., y S. A. Rodríguez H. 2000. Efecto de dos probadores en la selección de líneas de maíz tropical. Rev. Fitotec. Mex. 23: 79–86.

Molina G., J. D., J. J. García Z. 1996. Uso de líneas de alta y baja aptitud combinatoria general (ACG) como probadores de la ACG de líneas autofecundadas de maíz. *In:* Memoria del XVI Congreso Nacional de Fitogenética. Montecillo, Edo. de México, pp: 230.

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EVALUAR LA INFECCIÓN DE MELOIDOGYNE EN RAÍCES DE TOMATE BAJO CONDICIONES IN VITRO.

Karla Georgina Romero Sosa[1] y Silvia Edith Valdés Rodríguez[2]

RESUMEN

En el presente trabajo se describen los métodos implementados para la infección in vitro de raíces de tomate var. Río Grande con nemátodos de la especie Meloidogyne, los cuales van desde la extracción de nemátodos de raíces previamente infectadas, hasta la inoculación de raíces crecidas in vitro con nemátodos en estadio infectivo (J2). Además, se incluyen los procedimientos realizados para la extracción y utilización de una cistatina recombinante que ha demostrado tener propiedades antifúngicas. Los resultados obtenidos fueron la estandarización del protocolo de infección mediante semillas sembradas en medio MS y la obtención de un lisado celular que contenía la proteína de interés para su aplicación como compuesto bioactivo. Los resultados de las pruebas inhibitorias con cistatina no fueron concluidos.

ABSTRACT

In the present work the methods implemented for the in vitro infection of var. Rio Grande Tomato roots with nematodes of the *Meloidogyne* species are described, which range from the extraction of nematodes from previously infected roots, to the inoculation of roots grown in vitro with nematodes in the infective stage (J2). In addition, the procedures performed for the extraction and use of a recombinant cystatin that has been shown to have antifungal properties are included. The results obtained were the standardization of the infection protocol by seeds sown on MS medium and obtaining a cell lysate containing the protein of interest for its application as a bioactive compound. The results of the inhibition tests with cystatin were not concluded.

Palabras clave: Nemátodos, *in vitro*, infección, raíces, cistatina.

INTRODUCCIÓN

Los nemátodos pertenecen al reino animalia, forman el cuarto filo más grande del reino animal por lo que se refiere al número de especies. Actualmente se conocen 26.646 especies de nematodos, de las cuales 4,105 son parásitos de plantas (Hugot *et al.,* 2001). Los nematodos fitopatógenos son organismos pequeños, filiformes, más o menos transparentes, presentan cuerpos lisos no segmentados; cubiertos de una cutícula hialina, y son esencialmente acuáticos (Guzmán, et al. 2011). Desde el punto de vista agronómico, los nematodos más importantes son los agalladores y de quistes (Jones *et al.,* 2013). Los nemátodos agalladores pertenecen al género *Meloidogyne,* éstos son llamados así por las agallas (nudos de la raíz) inducidas en las raíces de su planta hospedadora. Estos pequeños gusanos redondos (típicamente de 300 µm a 2 mm para juveniles vermiformes y hembras piriformes, respectivamente) viven en el suelo y son endoparásitos obligados y sedentarios de las raíces de las plantas. Poseen un estilete hueco y protrusible, que utilizan para debilitar o romper las paredes celulares, inyectar secreciones y extraer nutrientes de las células infectadas de la raíz (Castagnone-Sereno, 2006; Jones *et al*., 2011). Las raíces altamente infestadas son mucho más cortas que las sanas, tienen menos raíces laterales y pelos radicales. En cuanto al sistema aéreo, los síntomas pueden ser: inhibición de la brotación, marchitez temporal, disminución del crecimiento y deficiencias nutricionales que se manifiestan como clorosis del follaje, ya que los nemátodos interfieren con la producción y translocación de hormonas provenientes de las raíces, asimismo de sustancias que regulan la fotosíntesis. Se ha estimado que las pérdidas globales de los cultivos debido al ataque de nematodos corresponden a $80 mil millones de dólares al año, sin embargo, es probable que sea una subestimación de la cifra real, ya que muchos productores, especialmente en las naciones en desarrollo, desconocen los nemátodos (Jones *et al.,* 2013). Aunado a esto las interacciones de los nemátodos con otros patógenos, casi siempre resultan en daños mayores al originado por cada parásito en forma individual, lo que podría aumentar aún más la cifra. Las especies de *Meloidogyne* causan dramáticas pérdidas de rendimiento reportadas en vegetales en la agricultura tropical

[1] Universidad autónoma de Querétaro, Facultad de química; cerro de las campanas, centro universitario 76010 Santiago de Querétaro, Qro, Karla.romso@hotmail.com

[2] Silvia Edith Valdés Rodríguez, CINVESTAV Unidad Irapuato, Depto de Biotecnología y Bioquímica Libramiento Norte Carretera Irapuato León Kilómetro 9.6, Carretera Irapuato León, 36821 Irapuato, Guanajuato, silvia.valdes@cinvestav.mx

y subtropical, siendo el tomate uno de los cultivos más susceptibles y afectados con un potencial de pérdida entre el 25 y el 100% (Seid *et al.,* 2015).

A pesar del uso intensivo de nematicidas sintéticos, el control de estos fitoparásitos no es eficiente, y en algunos casos este método reduce o elimina las poblaciones de antagonistas naturales asociados a la rizósfera (Pinzón *et al*. 2015), por ello, actualmente se apuesta por emplear otras alternativas como control biológico o compuestos orgánicos. La propuesta aquí presentada involucra el uso de una cistatina recombinante como compuesto bioactivo para el control de nematodos, del cual se ha reportado tiene efectos antifúngicos (Valdés-Rodríguez et al., 2010).

METODOLOGÍA

Extracción de DNA genómico de nemátodos

El DNA se extrajo de una muestra de 16 masas de huevos contenida en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, la muestra se congeló en nitrógeno líquido y fue macerada con un micro pistilo de propileno estéril hasta obtener un polvo muy fino. Se agregaron 500 µL de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5 % SDS) y se mezcló en vórtex. Después, se adicionaron 500 µL de fenol-cloroformo 1:1 y se mezcló durante 5 min. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo donde el DNA se precipitó con 500 µL isopropanol frío (1:1 v/v), mezclando suavemente e incubando en hielo durante 30 min. Nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, seguido, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 300 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla, volviendo a centrifugar a 12,000 rpm 3 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se puso a secar, para finalmente resuspenderla en 30 µL de agua MQ estéril. Las muestras obtenidas se analizaron en geles de agarosa al 0.8 %

PCR de DNA genómico de nemátodos

Comprobada la integridad del DNA en el gel de agarosa, se procedió a la amplificación de DNA para identificar al nematodo con primers específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la identificación se usaron los primers: INCK14F (5'-GGGATGTGTAAATGCTCCTG-3') y INCK14R (5'-CCCGCTACACCCTCAACTTC-3') reportados por Randing *et al*., (2002). En la reacción de PCR se utilizó la enzima Platinum ® Taq Polimerase High Fidelity, siguiendo el protocolo comercial, con la variante de que se prepararon 3 reacciones diferentes con volúmenes de 2, 3 y 5 µL del DNA extraído con anterioridad. *Condiciones de amplificación del PCR:* 5 min de desnaturalización a 94 °C, seguidas de 35 ciclos de 94 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s, y 68 °C durante 20 s, una etapa de extensión final de 68 °C durante 7 min y un lapso de enfriamiento a 4 °C. Los productos de PCR se mandaron a secuenciación para poder identificar la especie del nemátodo aislado.

Evaluación de productos de PCR

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En total se cargaron 6 pozos con: 2 µL marcador de PM de 1 kb, 3 µL para control (-) (todos los reactivos de la reacción con excepción del DNA), como control (+) se utilizaron 1.5 µL de un vector PMDC856 de 14 kb, y se cargaron 3 µL de los productos de las tres reacciones de PCR (2, 3 y 5 µL de DNA). Se empleó el colorante GelRed para teñir las muestras y se corrió el gel a 80 V durante 1 h. Se midió la concentración de DNA de las 3 reacciones de PCR con un NanoDrop.

Germinación de semillas de tomate

Para los ensayos se emplearon semillas de tomate de la var. Río Grande. Se realizó la desinfección superficial de 70 semillas de acuerdo con el protocolo descrito por Cruz-Hernández *et al.* (2013). El medio utilizado para cultivos asépticos de plantas comprendió medio MS (Murashige y Skoog 1962) y 20 g L^{-1} de sacarosa. El pH se ajustó con NaOH 0.1 N a 5.8, después se agregó Agar, Plant TC (PhytoTechnology Laboratories®) 8 g L^{-1} y la mezcla se esterilizó en autoclave durante 20 min. El medio se vertió en 6 cajas Petri de 90 y 6 de 140 mm Ø, en donde se sembraron semillas de tomate según el protocolo de Olmo *et al.*, (2017) con algunas modificaciones. Las placas fueron incubadas en una cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo invertido (16-8 h oscuridad/luz), manteniéndolas de manera vertical. Se monitoreó la germinación de las semillas y se retiraron del cuarto de crecimiento a los 4 días después de la siembra (dds) para ser inoculadas.

Obtención de juveniles en segundo estadio (J2s) de *Meloidogyne*

Se colectaron 20 masas de huevos de las raíces de una planta de Tomate var. Río Grande previamente inoculada con *Meloidogyne* (un mes desde la inoculación con el nemátodo) de acuerdo con el protocolo de Sun *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Las masas de huevos obtenidas fueron colocadas en 200 µL de agua destilada estéril (pH 7) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, en donde se les realizó un lavado con 800 µL de una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % durante 3 min agitando en vórtex, seguido de centrifugación a 12,000 rpm durante 1 min. El

sobrenadante fue descartado y se añadieron 800 µL de agua destilada estéril para después centrifugar a 12,000 rpm durante 45 s. Este lavado se repitió cinco veces para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio. Después de descartar el último enjuague, se agregaron 300 µL de agua destilada estéril y se agitó la suspensión suavemente en vórtex. Para asegurar la eclosión de los juveniles en estadio 2 (J2) se incubaron los huevecillos a 28 °C en agua destilada estéril a pH 7, durante 21 días.

Conteo de huevecillos
Para el conteo de huevecillos se colocaron alícuotas de 50 µL en portaobjetos y se realizó el conteo en zigzag con 5 réplicas. Con los datos obtenidos se calculó el promedio y la desviación estándar. El conteo fue realizado en un microscopio óptico con el objetivo 10X.

Inoculación con *Meloidogyne*
A los 4 dds se seleccionaron plántulas cuyas radículas crecieron por encima del medio, de forma recta y de 10 a 11 cm de longitud aproximadamente. Estas plántulas se trasplantaron en placas de 140 mm Ø con medio MS. Después, se llevaron al cuarto de crecimiento para adecuarse al medio durante 5 días. Luego de 5 días, se inocularon las raíces con nematodos estadio J2 siguiendo el protocolo de Iberkleid *et al.,* (2013) con ciertas modificaciones. En campana de flujo laminar, se inocularon 6 plántulas de tomate colocando alrededor de 100-200 J2s en la punta de cada raíz. Después se agregaron 400-600 µL de una fina capa de medio MS templado. Para este ensayo se utilizaron: un control (-); el cual contenía el mismo volumen de agua destilada estéril sin inóculo de J2 y se cubrió con medio MS, y un control absoluto; que eran plántulas sin tratamiento alguno. Cuando el medio se solidificó, las placas se sellaron con Vitafilm, y fueron cubiertas con papel aluminio para transferirlas a una cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo invertido (16-8 h oscuridad/luz) durante tres días manteniéndolas verticalmente. Se monitorearon las placas bajo el estereoscopio cada 24 h después de la inoculación para visualizar la penetración de los nemátodos. Tres días después de la inoculación (ddi) se retiró la lámina de aluminio y se cubrieron las placas con una gasa.

Estandarización del protocolo de tinción con fucsina ácida
Como prueba de efectividad de la tinción, se extrajo de una maceta una raíz de tomate var. Río Grande, que se inoculó un mes atrás con *Meloidogyne*. Se siguió el protocolo descrito por Ravichandra (2008) para teñir las raíces infectadas con fucsina ácida, proceso en el cual se identificó que la tinción en frío era más eficiente y menos destructiva en comparación con la tinción donde las raíces eran sometidas a calor.

Medición de parámetros de infección por *Meloidogyne* (Tinción con fucsina ácida)
Debido al corto tiempo para realizar la evaluación del bioensayo, se decidió llevar a cabo la tinción con fucsina ácida de las raíces de 14 ddi. Se realizó la tinción de las raíces de 14 ddi con fucsina ácida siguiendo las modificaciones establecidas anteriormente. Las raíces se visualizaron al microscopio con el objetivo de 10X y en el estereoscopio con el objetivo de 32X, para identificar la penetración de los nemátodos a través de la raíz.

Obtención de cistatina recombinante (lisado celular)
Para la obtención de la cistatina recombinante se utilizó la cepa bacteriana M15Cys(pQE2) T3C11 obtenida por Valdés-Rodríguez *et al.,* (2010). Se obtuvieron dos cultivos líquidos de la cepa en medio SB y cuando la DO fue igual a 0.5 se indujo un cultivo con IPTG 100 mM. Posteriormente, los cultivos (inducido y sin inducir) se sonicaron para lograr la lisis celular. Alícuotas de 50 µL fueron extraídas del Lisado Celular Inducido (LCI) sin sonicar y a los 4, 8 y 13 pulsos para cuantificación de proteína. Los LC se centrifugaron a 18,000 rpm durante 25 min en frío, se recuperó el sobrenadante y se tomó una alícuota de 50 µL para cuantificación de proteína, el resto del volumen se almacenó a -70 °C. Se analizó el LC en un gel de electroforesis SDS-PAGE en una cámara MiniProtean III (BIO-RAD).

Cuantificación de proteína por micrométodo de Bradford
Se realizó la cuantificación de proteína colocando volúmenes de los LC de la siguiente manera: para el Cultivo Inducido No Sonicado, y los LCI de 8 y 13 pulsos 1 µL, y 1.2 µL para el LCI 4 pulsos y el LCNI 13 pulsos. Se realizó una dilución 1:5 para todos los ensayos. Las muestras se colocaron en una microplaca de 96 pozos y se llevaron hasta un volumen final de 10 µL con H_2O desionizada. A cada ensayo se le añadieron 200 µL del reactivo Bradford y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se leyó en un espectrofotómetro a una DO_{595} nm. La concentración de proteína se calculó de acuerdo con la ecuación 1.

$$\mu g/\mu L=[abs-0.008)/0.2089]/\text{alícuota en } \mu L \quad (1)$$

Identificación de la cistatina en gel de electroforesis
Se preparó un gel de electroforesis SDS-PAGE al 1% y se cargó como se muestra en la ***Tabla 1***. El gel se corrió a 80 V durante 15 min y posteriormente se aumentó hasta 105 V.

Tabla. 1. Volúmenes de muestra colocados en gel de agarosa y su concentración de proteína

Pozo	Muestra	Proteína (µg/ µL)	Volumen (µL)	Proteína total (µg)
1	Vacío	-	-	-
2	LCNI	1.27	3.93	5
3	LCI sin sonicar	0.43	5	2.15
4	LCI 4 pulsos	1.56	3.2	5
5	LCI 8 pulsos	1.71	3.2	5.47
6	LCI 13 pulsos	1.86	3.2	5.95
7	Marcador de PM	-	5	-

Después de la corrida el gel se colocó en 50 mL de solución fijadora (Metanol 40 % y Ácido acético 10%) durante 15 min en agitación. Después se colocó en solución teñidora (Azul de Coomasie R-250 al 1%) y se dejó toda la noche en agitación. Finalmente se pasó a la solución desteñidora (Ácido acético al 10%) y se visualizó en un fotodocumentador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de productos de PCR

En el gel de electroforesis se identificaron tres fragmentos de 399 pb aprox. (carriles 4-6), correspondientes a los productos de PCR de DNA de *Meloidogyne* (***Figura 1***). En el NanoDrop se registraron concentraciones de DNA de 387.3, 388.9 y 357.8 ng/µl para los productos de PCR de 2, 3 y 5µL de DNA respectivamente. De la reacción de PCR se esperaba un producto de 399 pb para la identificación de *M. incognita* de acuerdo con Randing *et al.*, (2002), el cual se atribuyó a las bandas encontradas entre 25 y 30 kDa, se corroboró mediante secuenciación de los productos de PCR obtenidos.

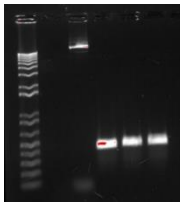


Figura 1. Gel de electroforesis de los productos de PCR. Carril 1 corresponde al marcador de PM, los carriles 2 y 3 corresponden a los controles (-) y (+) respectivamente, y los carriles 4-6 a los productos de PCR.

Identificación de *M. incognita* por biología molecular

Se obtuvieron dos secuencias (directa 5'-3' y reversa 3'-5') de 270 b de los productos de PCR mandados a secuenciar (Secuencias no mostradas). A los resultados de la secuenciación se les realizó un "contig" y se corrigieron de manera manual los nucleótidos que no habían sido identificados en la secuenciación (Secuencia no mostrada). A esta secuencia se le realizó un Blast mediante la plataforma del NCBI. La secuencia que obtuvo un 99 % de identidad fue *Meloidogyne incognita* genome assembly, contig: *Meloidogyne_incognita*_scaffold_9023, whole genome shotgun sequence, con un porcentaje de cobertura de la secuencia a probar del 98%. Con lo cual concluimos que la especie de nemátodos utilizada para los ensayos es *M. incognita.*

Conteo de huevecillos

El promedio del conteo fue de 9 huevecillos por cada 50 µL analizados con una desviación estándar del 13 %.

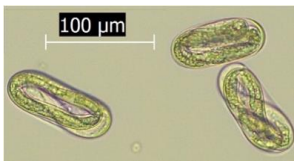


***Figura 3. Huevecillos* de Meloidogyne en estadio J1 encontrados en el conteo**

Germinación de semillas de tomate

Se obtuvo un promedio de germinación del 60 % en las semillas de tomate var. Río Grande sembradas en placas de 90 y 140 mm de Ø con medio MS a los 4 dds con 1.5 a 2 cm de longitud de la radícula. *Varios pueden ser los factores*

que inciden en el proceso de germinación, *los principales conllevan la falta de oxígeno y agua o un exceso de esta última, radiación, presencia de sustancias inhibidoras o activadoras de la germinación, la cubierta seminal y madurez del embrión. Así como también* el tiempo de almacenamiento y el grosor de la cubierta seminal. Desconocemos la causa exacta de la baja germinación obtenida *in vitro*, pero pudo haber sido el resultado de una combinación de todas las anteriores, además de que, el tiempo de almacenamiento de las semillas una vez compradas, fue de tres meses, pero no podemos determinar el periodo exacto en que estas estuvieron almacenadas antes de obtenerlas.

Figura 2. Germinación de semillas de tomate var. Río Grande en placa Petri de 90 mm Ø

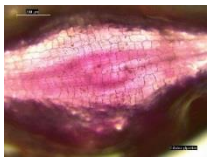
Estandarización de protocolo de tinción

En la tinción realizada a plantas sembradas en macetas, se siguió el protocolo de Ravichandra (2008), donde se llevó a cabo un teñido y desteñido sometiendo las raíces en soluciones hirviendo, resultando en raíces altamente debilitadas y quebradizas. Por tal motivo se probó la tinción con el mismo colorante, pero realizando los pasos de teñido y desteñido sin calor. Esta tinción tomó dos días; uno para la absorción del colorante y otro para retirar el exceso con glicerol acidificado. La capa más externa del cuerpo de los nemátodos es la cutícula (una estructura compuesta por colágeno).El colágeno tiene afinidad por grupos aniónicos como son los colorantes de gran tamaño molecular; como la fucsina ácida, que tiende a unirse a través de atracción electrostática o por fuerzas de Van der Waals. El colágeno tipo I o colágeno «maduro»; una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular, se tiñe de color rojo por la fucsina ácida y da como resultado una coloración de acuerdo con la densidad del colágeno presente (Salgado, 2012).

Figura 4. Tinción de raíces de tomate var. Río Grande con fúcsina ácida en frío. A la izquierda se observa un abultamiento color rosa que indica presencia de nemátodo. A la derecha se encuentra una hembra de Meloidogyne junto a la agalla de donde se extrajo

Monitoreo y medición de parámetros de infección para *Meloidogyne*

La formación de agallas por parte de *Meloidogyne* se inicia con la penetración de los J2 en el interior de las raíces, una vez ahí, la alimentación del J2 induce a las células de la raíz a diferenciarse en células nodrizas, llamadas células gigantes. Cuando se inicia una célula gigante, el nemátodo se vuelve sedentario y se agranda hasta diferenciarse sexualmente. Las hembras continúan alimentándose a través de las células gigantes produciendo deformación de las mismas y provocando la aparición de agallas. Iberkleid *et al.,* (2013) reportan un incremento en el tamaño de células de raíz de tomate infectadas por *Meloidogyne* a los 15 días después de infección (aparición de células gigantes). En nuestro ensayo, 24 h después de inoculación se observaron tres nemátodos próximos a la radícula, el monitoreo continuó hasta los 14 d, donde mediante la fucsina, se identificó un abultamiento en una de las raíces (formación de células gigantes), con una zona cuya pigmentación resaltaba del resto. Se observó a 10X con un microscopio. Suponiendo que a partir de este tiempo comenzamos a ver hipertrofia en algunas células de la raíz, suponemos que la formación de agallas sería visible a partir de este periodo. Por otro lado, en plantas sembradas en suelo se observó un gran número de agallas dos meses después de la inoculación. Estos resultados sugieren que necesitamos de un mes o más para observar efectos de la infección por *Meloidogyne.* En la ***Figura 5*** se observa la diferencia de las células gigantes con el resto de la raíz por su coloración, indicando probabilidad de encontrar nemátodos en esa zona.



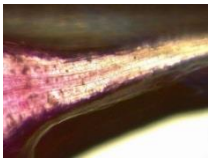


Figura 5. Tinción de células gigantes en raíces de tomate indicando la posible presencia de nemátodos

Cuantificación de proteína

La ruptura de estructuras celulares (lisis) mediante ultrasonidos se utiliza para la extracción de compuestos intracelulares o para la inactivación microbiana (Kim, 1989). Bajo una sonicación intensa, las enzimas o proteínas pueden ser liberadas de células u orgánulos subcelulares como resultado de la ruptura celular. En este caso el LCI que recibió 13 pulsos en la sonicación fue el LC que mayor concentración de proteína obtuvo (1.86 µg/µL), dado que fue el proceso con mayor intensidad implementado, por esta razón se eligió para utilizar en los ensayos posteriores. Además, mediante este resultado queda corroborado que las condiciones de sonicación para los cultivos celulares son aplicables en cultivos grandes (500 mL) así como en microcultivos (como en este caso).

Identificación de la cistatina en gel de electroforesis

Las bandas obtenidas con un peso aprox. de 28 kDa fueron anteriormente identificadas por Valdés-Rodríguez *et al.*, (2010). Esta banda corresponde a la cistatina presente en los LC. El resto de las bandas corresponden a proteínas o componentes celulares que se encontraban en el lisado. En la (***Figura 6***) se puede observar un aumento en el grosor de las bandas de acuerdo al aumento en el número de pulsos y por consiguiente a la cantidad de proteína cuantificada.

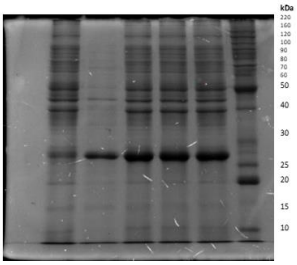


Figura 6. Identificación de cistatina en banda de 28 kDa (banda gruesa presente en los carriles 3-6) en gel de electroforesis

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones iniciales de la estandarización de un protocolo de infección de raíces de tomate por Meloidogyne, donde se determinó el género del nemátodo de estudio, el método de desinfección de semillas, el medio de crecimiento, tiempo de germinación, selección de radículas y proceso de infección por los nemátodos en estadio infectivo, así como también la concentración de cistatina obtenida a partir de micro cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. CASTAGNONE-SERENO, P. (2006). Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96, 282-289.
2. CRUZ-HERNÁNDEZ, A., TOMASINI-CAMPOCOSIO, A., PÉREZ-FLORES, L. (2013) "Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of Festuca arundinacea promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots" in *Plant Soil*, Vol. 362, [pp. 261-270]
3. GUZMÁN, O., CASTAÑO, J. & VILLEGAS, B. (2012). Principales nemátodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Agronomía* 20, 38-50.
4. HUGOT, J., BAUJARD, P., & MORAND, S. 2001. Biodiversity on helminths and nematodes as a field of study: an overview. Nematology. 3:199-208.
5. IBERKLEID, I., VIEIRA P., DE ALMEIDA ENGLER, J., FIRESTER, K., SPIEGEL, Y., HOROWITZ, S. (2013). "Fatty Acid-and Retinol-Binding Protein, Mj-FAR-1 Induces Tomato Host Susceptibility to Root-Knot Nematodes" in *PLoS ONE*, Vol. VIII, [e64586].
6. JONES, J., GHEYSEN, G. & FENOLL, C. (2011). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. New York: Springer.

7. JONES, J., HAEGEMAN, A., DANCHIN, E., GAUR, H., HELDER, J., JONES, M., KIKUCHI, T., MANZANILLA-LÓPEZ, PALOMARES-RIUS, R., WESEMAEL, J., & PERRY, R. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* (2013) 14, 946-961.
8. **KIM, S., ZAYAS, J. (1989).** "Processing parameter of chymosin extraction by ultrasound" in *J. Food Sci.* 54: 700.
9. MOENS, M., PERRY, R., & STARR, J. (2009). *Meloidogyne* Species – a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites in *Root-knot Nematodes*. CAB International. 1-17.
10. OLMO R., ANA S., DÍAZ-MANZANO, F., CABRERA, J., FENOLL, C., & ESCOBAR, C. (2017). "A Standardized Method to Assess Infection Rates of Root-Knot and Cyst Nematodes in Arabidopsis thaliana Mutants with Alterations in Root Development Related to Auxin and Cytokinin Signaling" in *Methods in molecular biology, Vol. 1569*, [pp. 71-81].
11. PINZÓN, L., CANDELERO, J., TUN, J., REYES, V. y ALEJO, J. (2015). "Control de Meloidogyne incognita en tomate (Solanum lycopersicum L.) con la aplicación de Trichoderma harzianum" en *Fitosanidad, Num.* 19, Vol. I, [pp. 5-11], 2015.
12. RANDIG, O., BONGIOVANNI, M., CARNEIRO, R., & CASTAGNONE-SERENO, P. (2002). "Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species". in *Genome*, Num. 45, Vol. V, [pp. 862-70].
13. RAVICHANDRA, N. (2008). Plant Nematology. I. K. New Delhi: International Publishing House Pvt. Ltd.
14. SALGADO, R. (2012). "Fundamentos de una técnica policrómica: Tinción de Herovici" en *Investigación en Discapacidad*, No. 1, pp. 35-36.
15. SEID, A., FININSA, C., MEKETE, T., DECRAEMER, W. & WESEMAEL, W. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) – a century-old battle. Nematology 00, 1-15.
16. SUN, M. H., GAO, L., SHI, Y. X., LI, B. J., & LIU, X. Z. (2006). "Fungi and actinomycetes associated with Meloidogyne spp. eggs and females in China and their biocontrol potential" in *Journal of Invertebrate Pathology*, Num. 93. [pp. 22-28].
17. VALDES-RODRIGUEZ, S., CEDRO-TANDA, A., AGUILAR-HERNANDEZ, V., CORTES, E., BLANCO-LABRA, A., & GUERRERO-RANGEL, A. (2010). "Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi" en *Plant physiology and biochemistry*, Num. 48. [pp. 469-75].

ESTUDIO Y ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN SUELOS Y AGUAS DE DIFERENTES SITIOS DE LA ZONA MEDIA

Felipe Alvarado Diaz[1] y Juan Fernando Cárdenas González[2]

RESUMEN

El Refugio, Ciudad Fernández es un poblado que se caracteriza por tener un amplio resultado en la producción de cultivos (hortalizas, cítricos principalmente), por consecuencia, al tener una amplia obtención de este tipo de cultivos se tiene una utilización excesiva de fertilizantes, fungicidas asimismo productos relacionados para una mejor producción. Esto implica una contaminación directa tanto de suelo como de agua. Es aquí donde entra nuestra principal investigación ya que analizaremos los elementos que intervienen en el suelo y el agua, además de los microorganismos que se reproducen en estos medios, buscar una posible solución de biorremedación para después de analizar los elementos encontrados principalmente y que tienen una acción negativa para los habitantes de esta ciudad.

ABSTRACT

EL Refugio,Ciudad Fernández is a town that is characterized by a wide resulted in the production of vegetables, citrus crops (mainly), therefore having a wide application of this type of crops has an excessive use of fertilizers, fungicides also related products for better production. This implies a direct contamination of both soil and wáter. This is where our main research because we will analyze the elements that are involved in the soil and water, in addition to the microorganisms that are reproduced in these media, search for a possible solution of bioremediation for after analyzing the elements that have a negative action for the inhabitants of this city.

Palabras Clave: cultivos, contaminación, biorremediación metales pesados.

INTRODUCCIÓN

El excesivo uso de agroquímicos en la agricultura no es solo un problema que afecta a la economía desde el punto de vista de adquisición de los mismos, sino también es un problema que puede estar relacionado con desequilibrios en el suelo que perjudiquen su fertilidad, además de contaminar el medio ambiente, donde las aguas utilizadas para el consumo humano, animal y vegetal pueden estar afectadas de manera negativa.

Cañizares-Villanueva (2000) denominan contaminación a toda causa que contribuya a que un determinado medio o recurso sea inapropiado para su uso, considerándose que las aguas están contaminadas cuando se altera su composición, resultando no apta para cualquiera o todas las funciones y propósitos para las que sería apropiada en estado natural.

Por otro lado, un uso poco controlado de dichos agroquímicos puede generar microorganismos e insectos resistentes a los plaguicidas, herbicidas y pesticidas, muchos de los cuales pueden llegar a causar daños serios en la salud de los seres humanos (Franco et al. 2015). Muchos de los agroquímicos pueden llegar a filtrarse a distintos cuerpos de agua afectando el suelo y provocando a largo plazo la erosión de este. Estos también pueden movilizarse a través de aire y mediante los ciclos de lluvia terminar en suelo de cultivo filtrándose finalmente a los mantos acuíferos y sedimentos (Franco et al. 2015).

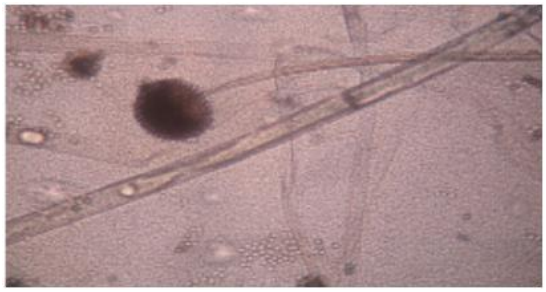
MÉTODOS Y MATERIALES

Las muestras de suelo de cultivo extraídas de algunas tierras que se encuentran atrás del Centro de Investigación y Vinculación “El Balandrán”, que se encuentra en el poblado de El Refugio, dichas tierras de cultivo están en contacto con una gran cantidad de agroquímicos, por lo que se procedió a tomar muestras a 3 distintas profundidades (5,10 y 20 cm). Se extrajeron 300 gramos aproximadamente de cada profundidad, de estas muestras fueron tomados 40 gr para

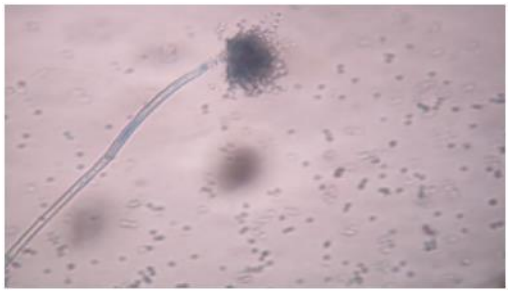
realizar un análisis microbiológico. Sembrando 100 µL en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), dejándolos para su proliferación en la incubadora a una temperatura ambiental controlada de 28° C, después de 7 días de incubación, se analizaron los microorganismo que crecieron como las bacterias y hongos, enseguida se procedió a realizar el primo aislamiento de cada una de las cepas que crecieron en el medio PDA, de dejo incubar durante 7 días en la incubadora. Cada una de las cepas que crecieron fue analizada mediante la técnica de la cinta adhesiva y el colorante azul algodón lactofenol para después observar las estructuras en el microscopio óptico a una resolución de 40x.
Después de haber realizado el análisis microbiológico, se realizó el análisis de elementos tóxicos, se puso a secar y tamizar la muestra a un tamaño de 100 mallas para llevar a caracterizar en el instituto potosino de investigación científica y tecnología (IPICYT) para ser más específico, con el propósito de utilizar el equipo de ICP-OES (espectro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente) para detectar alrededor de 64 elementos que puedan estar presentes en las muestras de tierra.

RESULTADOS

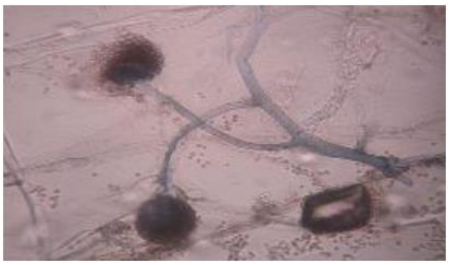
En este trabajo se aislaron una gran cantidad de bacterias y hongos que evidentemente presentaban resistencia a distintos agroquimicos, fueron de interés algunos hongo filamentos y contaminantes ambientales como Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Rhizopus sp., Mucor sp y Cladosporium sp (Figura 1), lo que coincide con algunos reportes de la literatura (Díaz y cols., 2002; Cañizares-Villanueva, 2000). Los hongos aislados presentan diferentes patrones de resistencia a los distintos agroquímicos. Estos hongos se pueden utilizar para la captación de metales pesados, ya que estos son un subproducto de la degradación de los agroquimicos, puede ser usado el microorganismo vivo en solución o la biomasa muerta de estos (Acosta et al. 2004).



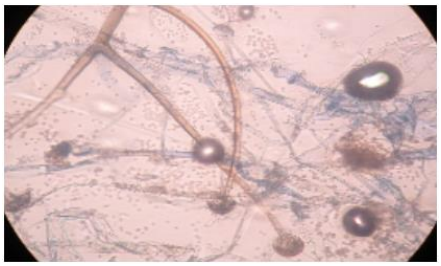
Aspergillus niger



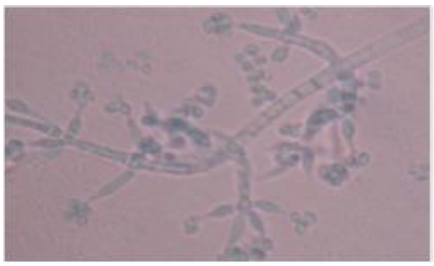
Aspergillus flavus



Rhizopus sp.



Mucor sp.



Cladosporium sp.

Figura 1.- Diferentes microorganismos aislados en tierras de cultivo tratados con agroquímicos. Microscopia óptica de 40x, técnica de cinta adhesiva con colorante azul algodón lactofenol. ón lactofenol.

Se realizó el análisis de suelo mediante la técnica de ICP-OES que tiene la capacidad de detectar hasta 64 elementos distintos, se encontraron algunos elementos minerales en grandes cantidades: Aluminio, Calcio, Cobre, Hierro, Magnesio y Manganeso (Figura 2), lo que puede ocasionar un determinado grado de toxicidad en los seres vivos de esa región. Por otro lado, se encontró la presencia de algunos metales tóxicos como Arsénico, Plomo y Vanadio en pequeñas concentraciones (Figura 3), mas sin embargo estos se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles impuestos por las normas mexicanas (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-20004), por lo que no deberían presentar problema alguno para la salud de los trabajadores, o consumidores de los productos que ahí se cosechan, aunque falta realizar estudios en la materia prima después de la fumigación con dichos agroquímicos.

		ID DE LA MUESTRA		
ANALITO	UNIDADES	Murestra 1	Muestra 3	
Ag	mg/Kg	0.00	0.00	
Al	mg/Kg	3605.38	3429.41	
As	mg/Kg	5.32	4.94	
B	mg/Kg	14.17	14.13	
Ba	mg/Kg	47.46	40.51	
Be	mg/Kg	0.00	0.00	
Ca	mg/Kg	3085.23	2907.71	
Cd	mg/Kg	0.00	0.00	
Co	mg/Kg	0.00	0.00	
Cr	mg/Kg	9.07	14.93	
Cu	mg/Kg	87.69	13.76	
Fe	mg/Kg	5131.94	5258.24	
K	mg/Kg	447.27	612.14	
Li	mg/Kg	4.43	4.17	
Mg	mg/Kg	1086.60	1121.02	
Mn	mg/Kg	256.07	218.04	
Mo	mg/Kg	0.15	0.12	

		ID DE LA MUESTRA		
ANALITO	UNIDADES	Murestra 1	Muestra 3	
Na	mg/Kg	141.49	149.32	
Ni	mg/Kg	4.80	4.01	
P	mg/Kg	422.25	610.02	
Pb	mg/Kg	18.24	10.96	
Sb	mg/Kg	0.00	0.00	
Se	mg/Kg	0.00	0.00	
Si	mg/Kg	116.41	105.98	
Sn	mg/Kg	2.31	0.00	
Sr	mg/Kg	60.22	58.57	
Tl	mg/Kg	0.00	0.00	
V	mg/Kg	6.09	6.28	
Zn	mg/Kg	20.46	15.57	

Figura 2.- Determinación de elementos en suelo de cultivo mediante la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Acoplado Inductivamente.

		ID DE LA MUESTRA		
ANALITO	UNIDADES	ML1 5/07/18	ML2 5/JUL/18	CML1 6/JUL/18
Ag	mg/L	0.00	0.00	0.00
Al	mg/L	0.09	0.07	0.08
As	mg/L	0.00	0.00	0.00
B	mg/L	0.18	0.12	0.08
Ba	mg/L	0.00	0.00	0.00
Be	mg/L	0.00	0.00	0.00
Ca	mg/L	217.94	213.92	216.41
Cd	mg/L	0.00	0.00	0.00
Co	mg/L	0.00	0.00	0.00
Cr	mg/L	0.00	0.00	0.00
Cu	mg/L	0.00	0.00	0.00
Fe	mg/L	0.00	0.00	0.00
K	mg/L	4.45	4.46	4.70
Li	mg/L	0.21	0.21	0.21
Mg	mg/L	63.52	62.94	63.77
Mn	mg/L	0.00	0.00	0.00
Mo	mg/L	0.00	0.00	0.00

		ID DE LA MUESTRA		
ANALITO	UNIDADES	ML1 5/07/18	ML2 5/JUL/18	CML1 6/JUL/18
Na	mg/L	15.66	15.48	15.73
Ni	mg/L	0.00	0.00	0.00
P	mg/L	0.00	0.00	0.00
Pb	mg/L	0.00	0.00	0.00
Sb	mg/L	0.00	0.00	0.00
Se	mg/L	0.00	0.00	0.00
Si	mg/L	16.44	16.95	16.94
Sn	mg/L	0.00	0.00	0.00
Sr	mg/L	4.58	4.46	4.53
Tl	mg/L	0.00	0.00	0.00
V	mg/L	0.00	0.00	0.00
Zn	mg/L	0.00	0.00	0.00

Figura 3.- Determinación de elementos en agua de cultivo mediante la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica por Plasma Acoplado Inductivamente.

CONCLUSIONES

La utilización de productos químicos en la actividad agrícola del poblado de El Refugio, es la principal causa de contaminación en el suelo, elementos como Bario, Aluminio y Silicio presentan una concentración considerada, además de interactuar con los microorganismos, brindándole a estos un cierto tipo de resistencia, que por razones de tiempo desconocemos aun. Este estudio nos da una idea de la microflora que existe en las tierras de cultivo que son tratadas con agroquímicos, dichos microorganismos pueden ser potencialmente usados para la remediación del mismo lugar.

BIBLIOGRAFIA

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 131-143.

FRANCO, M. F., PAZIN, M., PEREIRA, L. C., JUNQUEIRA, D. (2015). Impact of Pesticides on Environmental and Human. *INTECH*, 2015, 195-233.

DÍAZ, M.P., MOCTEZUMA, M.G. y ACOSTA I. (2002). Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de Metales pesados y Flúor en solución. *FEMISCA*. 473-474.

ACOSTA, I., RODRÍGUEZ, X., GUTIÉRREZ, C. and MOCTEZUMA-ZÁRATE, M.G. (2004). Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions onto fungal biomass. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2(12), 1-7.

EVALUACION DE LA CALIDAD DE SEMILLA DE MAIZ EN SURCOS CONVENCIONALES Y ESTRECHOS

Manuel Maclovio Rodríguez Chávez[20] y Oralia Antuna Grijalva[21]

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio II del departamento de fitomejoramiento perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Unidad Laguna durante el verano del año 2018. Se evaluaron cinco híbridos comerciales con diferentes distancias entre surco y surco (0.75 m, 0.60 m y 0.40 m), para así poder determinar la relación de surcos convencionales y estrechos y el efecto en la calidad de la semilla. El diseño experimental fue un diseño factorial de 5x3 con arreglo en franjas divididas, para el factor A se colocaron los cinco híbridos de maíz y el factor B fueron los tres distanciamientos entre surcos. Se midieron las variables de germinación estándar (GE), longitud de plúmula (LP) y peso de mil semillas (PMS). La calidad fisiológica de la semilla no se vio afectada por el distanciamiento entre surcos.

ABSTRACT

Research "Antonio Narro" was conducted in the laboratory II of the Department of plant breeding belonging to the Autonomous Agrarian University Unit Laguna during the summer of the year 2018. Five commercial hybrids with different distances between Groove and Groove were evaluated (0. 75 m, 0.60 m and 0.40 m), the experimental design was a design factor of 5 x 3 with arrangement of split strips for A factor were placed five maize hybrids and the B factor were the three distances between rows. The variables of standard germination (GE), length of plumule (LP) and weight were measured of thousand seeds (PMS). Seed physiological quality was not affected by the distance between furrows.

Palabras Clave: maíz, semilla, híbridos comerciales, germinación, vigor.

INTRODUCCION

La calidad de la semilla de maíz es importante 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, prefiere aquellas que muestran alto vigor (Delouche y Cadwell, 1962). Para la industria es trascendente la calidad de la semilla por la gran variación en tipo de grano que exhiben las variedades e híbridos de maíz.

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del distanciamiento entre surcos y su efecto en la calidad fisiológica de la semilla de maíz.

METODOLOGIA

Ubicación geográfica de la zona de estudio. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio II del departamento de fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna la cual se encuentra localizada localizada en la porción suroeste del estado de Coahuila y al Noroeste del estado de Durango, entre los paralelos 26º51'00" y 24º22'48" de latitud norte y los meridianos 101º51'36" y 104º48'36" al oeste de Greenwich. Abarca cinco municipios en el estado de Coahuila y diez en el estado de Durango. El clima es muy seco con deficiencias de lluvia en todas las estaciones del año y presenta temperaturas semicálidas con inviernos benignos (Santamaría *et al.*, 2004).

Material genético: Se utilizaron cinco híbridos comerciales provenientes de la empresa MONSANTO los cuales se describen a continuación.

[20] Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Fitomejoramiento. C Acerina 467, pedregal del valle, C.P 27083, Torreón Coahuila de Zaragoza. Maclovio_rodriguez97@hotmail.com.

[21] Departamento de Fitomejoramiento. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez S/N. Torreón, Coahuila, México. C. P. 27054. oantuna_77@hotmail.com

Cudro 1.Características agronómicas de cinco híbridos comerciales de maíz.

HIBRIDO	CICLO VEGATIVO	ALTURAS (cm)		DIAS A FLORACIÓN
		PLANTA	MAZORCA	
Alicante	Intermedio precoz	260-295	140-150	70-75
Canguro	Intermedio	250-280	120-130	71-74
Cimarrón	Intermedio	245-290	140-160	75
Garañón	Intermedio	230-280	140-150	75-77
Guepardo	Intermedio precoz	250-320	150-180	67

Siembra del lote experimental. La siembra se realizó el 22 de abril del 2018, en seco, se llevó a cabo en forma manual, depositando dos semillas por punto de siembra.

Diseño y parcela experimental. El diseño experimental fue un diseño factorial de 5 x 3 con arreglo en franjas divididas para el factor A se colocaron los cinco híbridos de maíz descritos en el Cuadro 1 y el factor B fueron los tres distanciamientos entre surcos, la parcela experimental consistió en 2 surcos de 5 m de longitud a una distancia de 0.75 m, 0.60 m y 0.40 m entre surco y surco, para así obtener una densidad de 100, 000 plantas por ha con un distanciamiento entre planta y planta de 13.2, 16,6 y 25 cm respectivamente para cada distanciamiento entre surco.

Cosecha. La cosecha se realizó de forma manual, cuando la mazorca se encontraba en un rango de 15 a 30 % de humedad. Se cosecharon de cada parcela útil dos metros lineales de plantas con competencia completa. Se desgrano la mazorca y se tomó una muestra de 500 g y se llevó a laboratorio, para realizar las pruebas de calidad fisiológica de la semilla.

Variables de calidad fisiológica de semillas:

Germinación estándar (GE). Se realizó esta prueba con el método "entre papel" propuesto por la International Seed Testing Association (ISTA, 2004), la cual consistió en colocar las semillas sobre toallas de papel, enrollarlas, hidratarlas y mantenerlas en una cámara de germinación a 25 ºC+1°C durante 7 días. Se hizo un primer conteo al cuarto día. Se cuantificaron el número de semillas germinadas. Por último al séptimo día se registraron las semillas germinadas que desarrollaron plántulas normales. El porcentaje de germinación se expresó en porcentaje y se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$GE=\frac{PN}{NS}*100$$

dónde: PN: plántulas normales y NS: número de semillas utilizadas en el ensayo.

Longitud de plúmula. Consistió en medir en centímetros la longitud de la plúmula de 25 plántulas por parcela. Se calculó el vigor y se clasifico dentro del rango de la escala propuesta por Peretti (1994).

$$LP=\frac{1n+3n+5n+7n+9n+11n+13n}{ns}$$

dónde: LP: longitud de plúmula, n: número de plántulas normales y ns: número de semillas utilizadas.

Peso de mil semillas. Se seleccionaron ocho repeticiones de 100 semillas del total cosechada de cada híbrido, se promediaron los pesos y se registró su peso en gramos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de varianza (Cuadro 1) se observó diferencia significativa (P≥0.05) en las fuente de variación de Híbridos, distancia, bloques y Bloque*Distancia, para peso de mil semillas (PMS), el resto de las variables no presento diferencia estadística.
La variable longitud de plúmula (LP) presenta diferencias estadísticas en la interacción Bloque*Hibrido. El distanciamiento no afecto a los tratamientos ya que presentan un comportamiento similar en todas las variables.
Los coeficientes de variación oscilaron de 1.472 a 5.939 %, las variables presentan valores confiables de acuerdo con De la Cruz *et al.*, (2005) quienes afirman que los coeficientes de variación se consideran confiables, cuando es menor al 15 %.

Cuadro 1. Cuadrados medidos para calidad de semilla de cinco híbridos comerciales de maíz.

FV	gl	GE	LP	PMS
Hibrido	4	4.533ns	1.268ns	23.083**
Distancia	2	4.800ns	0.153ns	36.131**
Bloque	1	4.800ns	1.434*	20.418*
Bloque*Distancia	2	4.800ns	0.066ns	11.963*
Bloque*Hibrido	4	8.800ns	1.223*	1.096ns
Hibrido*Distancia	8	8.133ns	1.036ns	3.437ns
Error	8	6.800	0.304	2.578
CV%		2.607	5.939	4.902

*, ** Los valores significativos al 0.05 y 0.01% de probabilidad, ns= no existe significancia, CV%=Coeficiente de Variación, GE= Germinación, LP= Longitud de Plúmula y PMS= Peso de Mil Semillas

Promedio de Germinación estándar (GE).
El comportamiento promedio de la variable Germinación (GE) se presenta en la Figura 1, se observa que los híbridos más sobresalientes fueron Cimarrón, Alicante y Canguro con un porcentaje de :100%, 99.3% y 98.0 %, los materiales se expresaron mejor en el distanciamiento de 0.75 m con una media de 99.2%, para los demás distanciamientos de 0.60 m y 0.40 m, presentan promedio de 99.2% (a) y 98.0 % (a) respectivamente.

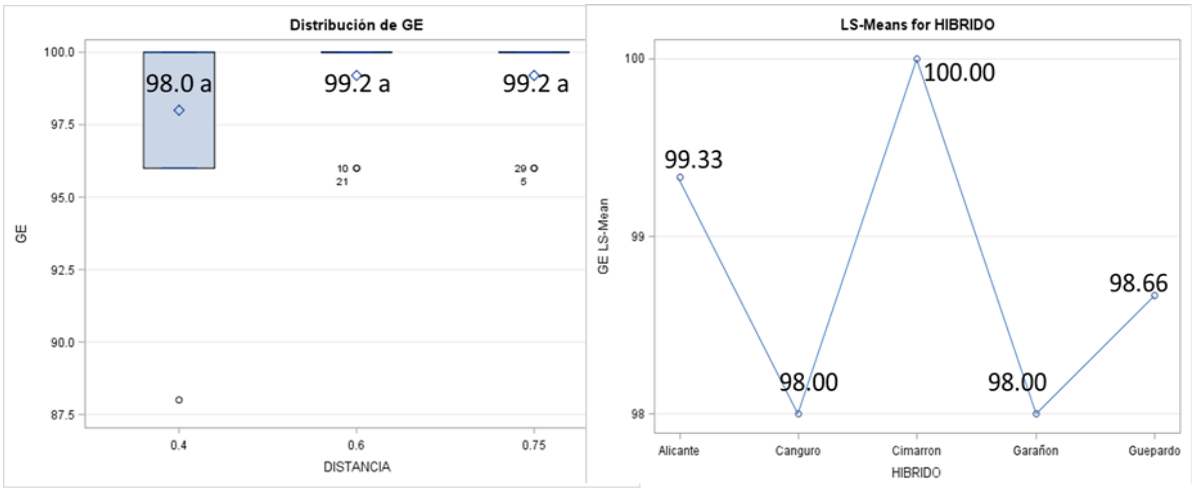


Figura 1. Comportamiento promedio de germinación estándar (GE) de cinco híbridos comerciales de maíz

Promedio de Longitud de plúmula (LP)
El comportamiento de las medias (Figura 10) de la variable Longitud de Plúmula (LP), En el ensayo de longitud de plúmula los híbridos con el mejor vigor Garañón, Alicante y Guepardo, con 9.68 cm, 9.62 cm y 9.36 cm. Los híbridos se expresaron igual en cada distanciamiento, para 0.75 m con una media de 9.28 cm, para el de 0.60 m y 0.40m con medias de 9.15 cm y 9.40 cm respectivamente. La emergencia de las plántulas no se vio afectada por los

distanciamientos de surcos, ya que los resultados obtenidos en el ensayo nos indican que los materiales cuentan con plántulas de alto vigor (Peretti, 1994).

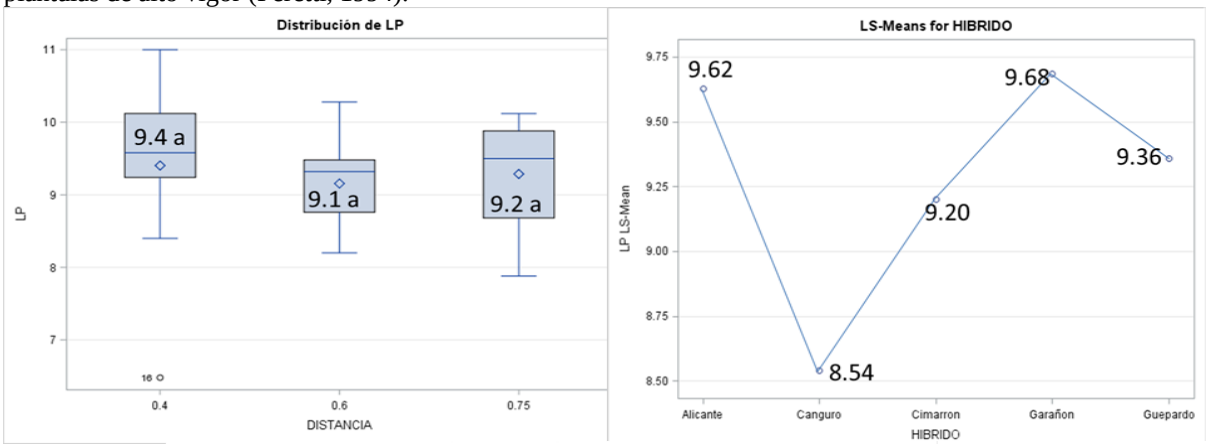


Figura 2. Comportamiento promedio de Longitud de plúmula de cinco híbridos comerciales de maíz

Promedio de peso de mil semillas (PMS)

El peso de mil semillas (Figura 3) se vio afectado por el distanciamiento ya que no se registra como semilla de buena calidad dentro del rango reportado por Peretti (1994) quien indica que semillas de maíz de calidad poseen un peso absoluto de 250 a 400 g.

Guepardo, Canguro y Cimarrón presentaron los promedios de 35.71 g, 33.02 g y 32.98 g, respectivamente. Los híbridos se expresaron mejor en el distanciamiento de 0.40 m con peso de mil semillas de 34.94 g, para los demás distanciamientos de 0.75 m y 0.60 m, con lecturas de de 31.80 g y 31.51 g.

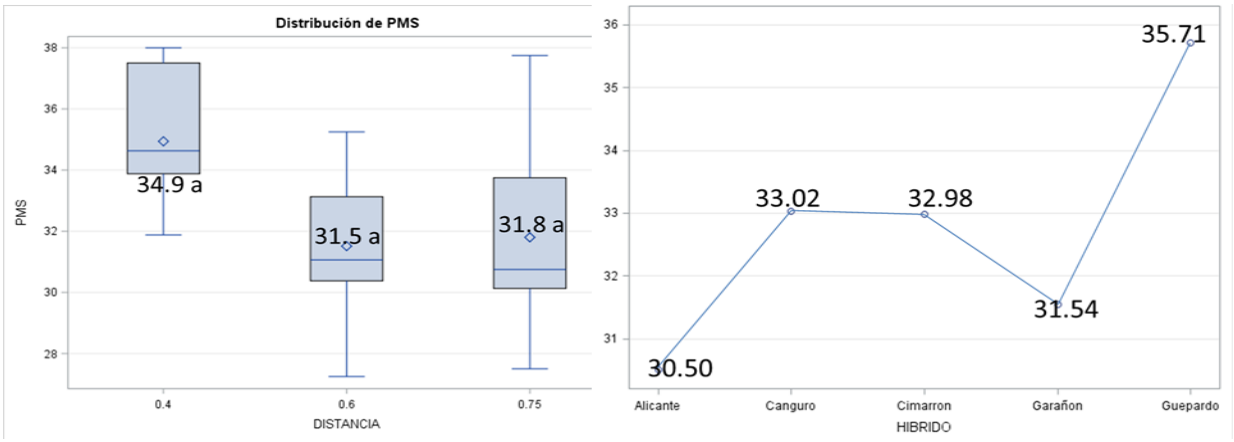


Figura 3. Comportamiento promedio de peso de mil semillas de cinco híbridos Comerciales de maíz

CONCLUSIONES

El sistema de producción de surcos estrechos no afecto la calidad fisiológica de la semilla. Sin embargo la calidad física disminuyó en el peso de mil semillas ya que los datos registrados en esta variable no se encuentran dentro de los estándares de calidad.

BIBLIOGRAFIA

1. De la Cruz L E, Rodríguez H S, Estrada B M A, Mendoza P J D (2005) Análisis dialélico de líneas de maíz QPM para características forrajeras. Universidad y Ciencia 21(41):19-26
2. Delouche J C and Caldwell W P 1962. Seed vigour test. Proc. Assoc. Offi c. Seed Anal. 50:124129.
3. International Seed Testing Association (ISTA). 2004. International rules for seed testing. Ed. 2004. Bassersdorf, CH-Switzerland, 243 p
4. Peretti, A., 1994 Manual de Análisis de semillas. Editorial Hemisferio Sur S.A., 281 P.
5. Reta S D D, A Gaytán M, J S Carrillo A (2000) Respuesta del maíz para ensilaje a métodos de siembra y densidades poblacionales. Rev. Fitotec. Mex. 23:37-48.
6. Santamaría-César J. Figueroa-Viramontes R. Medina-Morales M. (2004) Productividad de la alfalfa en condiciones de salinidad en el distrito de riego 017, Comarca Lagunera. Terra Latinoamericana 22:343.349.

AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE RAÍZ DE JITOMATE SOLANUM LYCOPERSICUM.

Oliva Negrete Marcela Lizbeth[22]; Ramírez Martínez Francisco [23]

RESUMEN

El objetivo principal del proyecto fue la obtención de protoplastos a partir de tejido radicular de jitomate (Solanum lycopersicm), llevado a cabo por medio de una disociación enzimática y una previa plasmólisis para lograr la remoción total de la pared celular de las células vegetales. Se utilizaron raíces de 4 meses de edad en sustrato comercial y semillas germinadas de un mes de edad en hidroponia. Se adaptaron metodologías para la eficiente obtención de protoplastos a uno, dos y tres días de disociación. Se observó una diferencia entre los protoplastos y células vegetales obtenidas en raíces y semillas germinadas. Se adaptó una metodología por medio de una serie de experimentos para la obtención de protoplastos, y su adecuada formación para un método electrofisiológico por Patch Clamp.

ABSTRACT

The main objective of the project was to obtain protoplasts from tomato root tissue (Solanum lycopersicm), carried out by means of an enzymatic dissociation and a previous plasmolysis to achieve the total cell wall removal of plant cells. Roots of 4 months of age were used in commercial substrate and germinated seeds of one month of age in hydroponics. Methodologies were adapted for the efficient obtaining of protoplasts at one, two and three days of dissociation. A difference was observed between protoplasts and plant cells obtained in roots and germinated seeds. A methodology was adapted for the medium of a series of experiments to obtain protoplasts, and its adequate formation for an electrophysiological method of Patch Clamp.

Palabras clave: disociación enzimática, raíz, protoplastos.

INTRODUCCIÓN

El jitomate *(Solanum lycopersicum)* es la segunda hortaliza más cultivada en el mundo después de la papa. En la actualidad, el cultivo del tomate es destinado a dos mercados diferentes: el que se vende al consumidor final y el que se destina a un proceso industrial, para, ya elaborado, llegar a los consumidores. (Lesur, 2006)

Es originario de la América del Sur, sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. Holanda ocupa el primer sitio, con 22% del volumen de exportaciones mundiales de jitomate; México tiene el segundo lugar con 18% de las mismas; en tercer lugar, España con 17% del total mundial. (SAGARPA, 2010)

Durante 2008, se produjo en todo México 2.26 millones de toneladas de jitomate, siendo el principal e productor el estado de Sinaloa, cuya producción representó el 35% del total nacional, San Luis Potosí (la producción está concentrada principalmente en diez municipios que por orden de importancia son los siguientes: Villa de Guadalupe (32%), Vanegas (18%), Ciudad Fernández (7%), Cedral (11%), Matehuala (10%), Venado (4%), Moctezuma (2%), Ébano (1%), San Luis Potosí (1%) y Villa de Arista (1%).) y Jalisco con 8%, 6% y 5%, respectivamente. (SAGARPA, 2010)

Las plantas normalmente absorben los nutrientes minerales del suelo a través de las raíces. La absorción raramente se realiza en forma de sales, sino en forma de iones, el cual se divide en transporte pasivo y transporte activo. En el transporte a corta distancia, los iones del suelo o de una solución externa, son absorbidos por la raíz en el espacio de libre difusión, en donde los iones pueden continuar por la vía del apoplasto hasta la endodermis, en dónde la banda de Caspary interrumpe la libre circulación, debiendo continuar por la vía del simplasto, previa carga activa de las células. O pueden ser absorbidos directamente en la epidermis (pelos radiculares) y transportados de célula en célula, por los plasmodesmos, en la vía del simplasto. (Salisbury & Ross, 1994)

La pared celular es la característica más importante que diferencia la célula vegetal de la animal.

[22] Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carretera Irapuato - Silao km 12.5 Colonia El Copal, Irapuato, GTO., México, marcelaoliva0302@gmail.com

[23] Facultad de Agronomía y veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Carretera San Luis - Matehuala Km. 14.5, Ejido Palma de la Cruz, 78321 Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P., México; francisco.martinez@uaslp.mx

Le confiere la forma a la célula y le da la textura a cada tejido, siendo el componente que le otorga protección y sostén a la planta. Sus principales componentes estructurales son celulosa, hemicelulosa y pectina. Para remover a pared celular de las células vegetales y obtener los protoplastos se utilizan enzimas hidrolíticas como la celulasa y pectinasa, además se mantiene un medio ligeramente hiperosmótico para que la membrana se contraiga y se separe de la pared celular, a este procesos se le conoce como plasmólisis.
Una vez obtenidos los protoplastos, se pueden realizar diversos estudios, uno de ellos es el estudio del flujo de iones por canales o bombas iónicas por medio de una técnica electrofisiológica llamada Patch Clamp.-(Vogelzang & Prins, 1994)

METODOLOGÍA

Obtención de las raíces.

Para el muestreo de las raíces de jitomate, se seleccionaron 5 raíces germinadas de semillas comerciales certificadas de tomate (Hyb) de la marca Caloro, variedad Paisano, con pureza del 99% y con 90% de germinación, pretratadas con Thiram de 4 meses de edad crecieron en un sustrato comercial (Picmos) que se limpiaron retirándoles todo el sustrato (Picmos) comercial, posteriormente, fueron pretratadas con una solución biosida (antibióticos y fungicidas) y una solución de hipoclorito de sodio al 10%. De igual forma, se utilizaron raíces de semillas comerciales sin marca que se germinaron en medio hidropónico preparado con macro y micronutrientes Una vez concluido el pretratamiento se prosiguió con la resiembra, en donde se utilizó el medio de Murashige y Skoog (MS), bajo una campana de flujo laminar para garantizar la asepsia de las raíces.

Disociación enzimática.

Para la obtención de protoplastos, se utilizó una solución enzimática de celulosa y pectinasa, y una solución osmótica preparada con manitol y $MgCl_{2.}$ y previamente esterilizada en una autoclave a 120°C y 0.15 Psi; al igual que todo el material necesario: matraces Erlenmeyer, medios MS, frascos de vidrio, cajas Petri y sol. Osmótica y medio de conservación MS.
Una semana después de la resiembra, sobre una caja de Petri, se colocan las raíces de donde se extraerán los protoplastos, con ayuda de un bisturí se corta una de las raíces más gruesas y cercanas a la raíz principal para después seccionarlas en cuatro partes iguales. Después se toman pequeñas láminas de tejido de la raíz pivotante. Se cortó con ayuda de un bisturí la raíz más gruesa (que no sean las raíces laterales o adventicias) y se parte en 4 partes iguales, después se toman pequeños filamentos de la raíz pivotante, todo esto sobre una caja Petri.
Se prepara la solución enzimática con 0.0396g de celulasa, 6 ml de solución osmótica y 53.4 µl de pectinasa. Las secciones de raíces se introducen dentro de un frasco de vidrio junto con la solución enzimática y se introducen dentro de un baño María a 40 °C por 1 h para comenzar la disociación, después de este tiempo, a la temperatura del baño se baja a 30 °C. Se deja la disociación por 24 y 48 horas.
Posteriormente se colocaron los fragmentos de raíz dentro del frasco mencionado anteriormente mencionado, este se metió a baño María a 40°C por 1h para comenzar la disociación.
Pasada 1h se bajó la temperatura a 30°C y se dejaron los frascos 24h.

Conteo de protoplastos.

Después de 24h de disociación, se tomó una alícuota y se colocó sobre ~~la~~ una cámara de Neubauer. Realizar el conteo en 9 campos con el objetivo de 40x en el microscopio. Repetir el conteo a las 48h y 72h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó el experimento n-(4) número de veces, en donde en cada uno se realizó el conteo de protoplastos por día, así como hubo en cada uno de ellos un decremento de la temperatura pasada 1 hora en baño María. A continuación se muestran los promedios de número total de células vegetales y protoplastos en raíces y germinadas en cada uno de los días y repeticiones realizadas.

1ª Repetición

Tabla 1. Promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la primera repetición.

Raices. Aislamiento 1		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	168	128.25
2	780.5	379.75
3	212.75	58.75

Tabla 2. Promedio total de células vegetales y protoplastos en germinadas de la primera repetición.

Germinadas. Aislamiento 1		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	570.5	63.5
2	1261	257.5
3	364	181.5

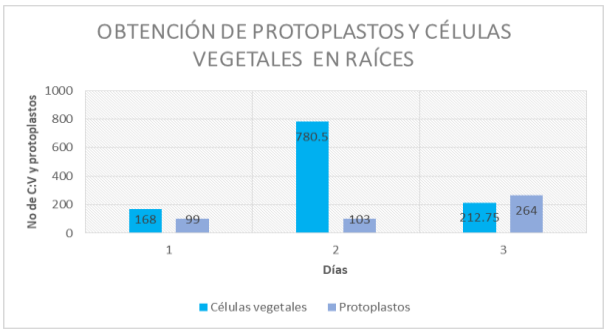


Figura 1. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la primera repetición.

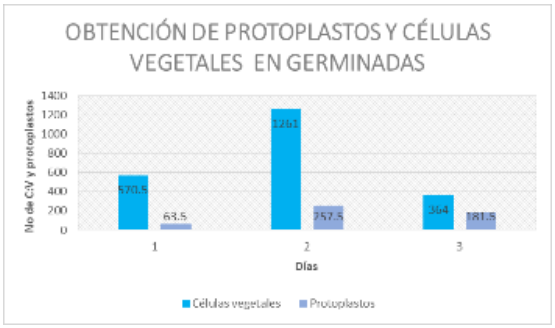


Figura 2. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en germinadas de la primera repetición.

2ª Repetición

Tabla 3. Promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la segunda repetición.

Raices. Aislamiento 2		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	404.25	42.5
2	1037.25	291.75
3	549	128

Figura 4. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en germinadas de la segunda repetición.

Germinadas. Aislamiento 2		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	795	71
2	1214	260
3	766	93.5

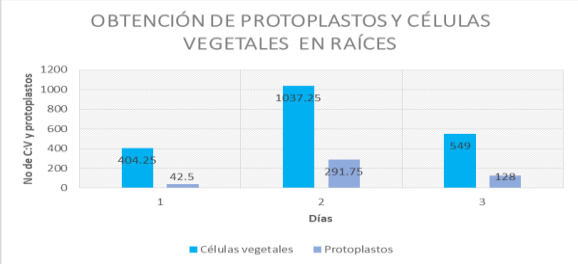


Figura 3. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la segunda repetición.

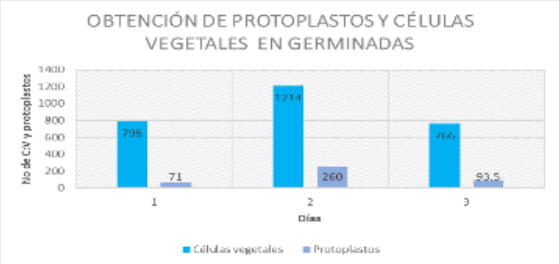


Figura 4. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en germinadas de la segunda repetición.

3ª Repetición

Tabla 5. Promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la tercera repetición.

Raices. Aislamiento 3		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	86.75	24.75
2	306.75	85.5
3	192.5	45

Tabla 6. Promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la tercera repetición.

Germinadas. Aislamiento 3		
Días	Células vegetales	Protoplastos
1	52.5	14.5
2	83	104.5
3	15.5	43.5

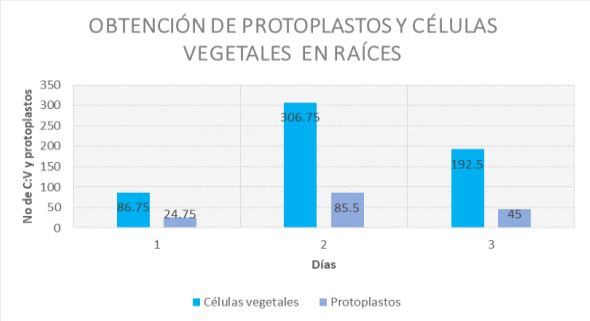


Figura 5. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la tercera repetición.

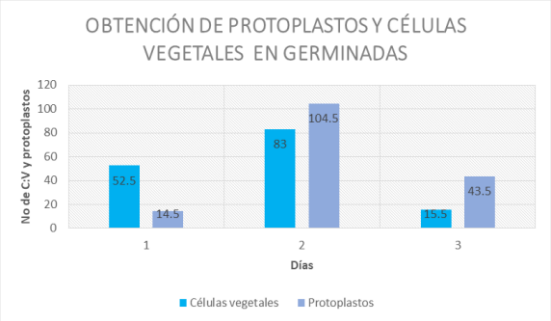


Figura 6. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en germinadas de la tercera repetición.

4ª Repetición

Tabla 7. Promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la cuarta repetición.

Raices. Aislamiento 4		
Días	Células vegetales	Protoplastos

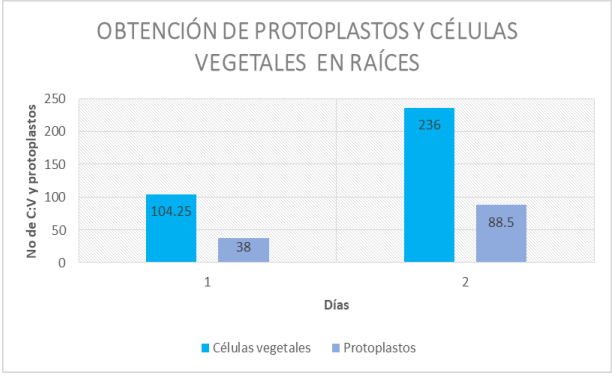


Figura 7. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la cuarta repetición.

Tabla 8. promedio total de células vegetales y protoplastos en raíces de la cuarta repetición.

Germinadas. Aislamiento 4		
Días	Células vegetales	Protoplastos

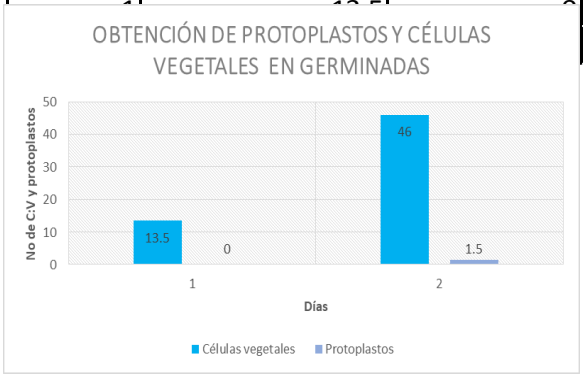


Figura 8. Grafica del promedio total de células vegetales y protoplastos en germinadas de la cuarta repetición.

Como puede observarse en las 4 repeticiones realizadas, al segundo día se notó un aumento considerable en protoplastos y células vegetales, sin embargo al tercer día se logró observar una disminución notoria en consideración con el día anterior. Esto debido a la actividad de la enzima.

CONCLUSIONES

- Se logró la obtención de protoplastos a partir de raíz de jitomate.
- Se adaptó una metodología para mayor obtención de protoplatos.
- La disminución de temperatura de 40º a 30ºC ayudo a una mejor disociación de la célula.
- El pretratamiento con la solución biosida nos favoreció a que no se contaminara la raíz, ni el medio en el que se encontraba.

- Se identificó una producción mayor de protoplastos en el segundo día.

REFERENCIAS

FAO. (2010). *INFOODS*. Recuperado el 6 de Agosto de 2018, de Food Composition Database for Biodiversity: http://www.fao.org/infoods/tables_int_en.stm

Lesur, L. (2006). *Manual del cultivo del tomate: una guia paso a paso* . Mexico: Trillas .

SAGARPA. (2010). *Monografía de cultivos jitomate, secretaría de fomento a los agronegocios.* México .

Salisbury, F., & Ross, C. (1994). *Fisiología Vegetal.* Interamericana.

Velasco Hernández, E., & et al, .. (2005). *Cultivo de tomate e hidroponia e invernadero.* México: bba.

Vogelzang, S. A., & Prins, H. B. (1994). *PATCH-CLAMP ANALYSIS OF THE DOMINANT PLASMAMEMBRANE K+ CHANNEL IN ROOT CELL PROTOPLASTS OF PLANTAGO-MEDIA L - ITS SIGNIFICANCE FOR THE P-STATE AND K-STATE*. Journal of Membrane Biology.

CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS DETOXIFICATIVAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA DE INSECTICIDAS EN PULGÓN AMARILLO DEL SORGO *Melanaphis sacchari* (Zehntner) EN LA ZONA SURESTE DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Marcelo Andrés Posada Martínez[24], Enrique Garcia Burgos[2], Luis Patricio Guevara Acevedo[3] y Ernesto Cerna Chávez[25]

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue cuantificar las enzimas detoxificativas, α y β-esterasas (α-est y β-est), glutatión S-transferasas (GST), acetilcolinestera (ACE) y oxidaxas (Oxi) asociadas a la resistencia de insecticidas en pulgón amarillo Melanaphis sacchari (Zehntner) en la zona suereste del estado de Guanajuato, para ello se realizaron colectas del insecto en 5 localidades de los municipios de Abasolo, Cuerámaro, Huanímaro, Pénjamo y Valle de Santiago. El material biológico se trasladó al laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitologia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Donde se realizó la identificación de *Melanaphis saccahari*. El material biológico se etiqueto y se mantuvo a una temperatura de -2°C. Hasta obtener la cuantificación de enzimas detoxificativas. Para la cuantificación de proteínas para determinar la cantidad de insectos a emplear,se utilizó la metodología descrita por Brogdon (1984), Una vez calculada la cantidad de insectos a emplear, se determinaron los niveles de α-esterasas (αEST), β-esterasas (βEST), oxidasas (Ox), Acetilcolinesterasas (ACE) y Glutatión S-transferasas (GST) utilizando las metodologías descritas por Brogdon, (1988), Brogdon y Barber (1990) y Brogdon *et al*. (1997). Los resultados muestran que las poblaciones de Huanimaro observaro los mayores valores para α y β-esterasas con una escala de clasificación número 4 "Alta", mientras que para ACE y Oxi el municipio de Abasolo la resistencia se consideró "Moderada" y para GST Pénjamo observo una resistencia Moderada.

Palabras Clave: *Pulgón amarillo, resistencia metabólica, enzimas detoxificativas, sorgo, Guanajuato*

ABSTRACT

The objective of the work was to quantify the detoxificating enzymes, α and β-esterases (α-est and β-est), glutathione S-transferases (GST), acetylcholinestera (ACE) and oxidaxes (Oxi) associated with the resistance of insecticides in aphids yellow Melanaphis sacchari (Zehntner) in the southeastern part of the state of Guanajuato, for which insect collections were carried out in 5 localities in the municipalities of Abasolo, Cuerámaro, Huanímaro, Pénjamo and Valle de Santiago. The biological material was transferred to the Toxicology laboratory of the Department of Parasitology of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Where was the identification of M. saccahari. The biological material was labeled and kept at a temperature of -2 ° C. Until obtaining the quantification of detoxifying enzymes. For the quantification of proteins to determine the amount of insects to be used, he used the methodology described by Brogdon (1984). Once the amount of insects to be used was calculated, the levels of α-est, β-est, Ox, ACE and GST using the methodologies described by Brogdon, (1988), Brogdon and Barber (1990) and Brogdon et al. (1997). The results show that the populations of Huanimaro observed the highest values for α and β-esterases with a classification scale number 4 "High", while for ACE and Oxi the municipality of Abasolo the resistance was considered "Moderate" and for GST Pénjamo I observe a moderate resistance.

Key words: *Yellow aphid, metabolic resistance, detoxification enzymes, sorghum, Guanajuato.*

INTRODUCCION

México ocupa el cuarto lugar como mayor país productor de sorgo con 8, 394,056.77 ton (FAOSTAT, 2014), donde ha sido un factor importante como componente fundamental de los alimentos balanceados de su uso pecuario, utilizado ampliamente para la alimentación de aves, cerdos, bovinos, ovinos y equinos, (SIAP, 2003). De acuerdo a la

[24]Estudiante de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Saltillo. andresposada90@gmail.com
[25]Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Saltillo. Calzada Antonio Narro #1923, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. C. P. 25315. jabaly1@yahoo.com
[3]Instituto Tecnologico de Roque. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, Apartado Postal 508, C.P. 38110, Celaya; Gto.

encuesta nacional agropecuaria realizada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en coordinación con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el estado de Guanajuato aparece como segundo productor de sorgo en el país (Hernández, 2015), sin embargo, la presencia de áfidos reduce los rendimientos ya que causan daño directo por la alimentación y daño indirecto como transmisores de virus permitiendo la propagación de enfermedades (Blackman y Eastop, 2000). El pulgón amarillo del sorgo es considerado una de las plagas más dañinas para el cultivo de sorgo, en Guanajuato, en el 2015 esta plaga afectó la producción tanto en riego como en temporal, reduciendo la producción hasta en un 100% en los sitios donde no se atendió el problema (SDAYR, 2016) con el paso del tiempo este daño por pulgón amarillo se han ido agravando y afectando de manera considerable la producción de sorgo en la entidad, alcanzando un daño estimado a nivel nacional de poco más de 2 millones de hectáreas afectadas, con un valor monetario cercano a $20´890,234.64 (miles de pesos) (SENASICA, 2015). En la actualidad el método más utilizado para el control del pulgón amarillo es la aplicación de productos químicos (Rodríguez y Terán, 2015). El cual está basado en el uso de materias activas como: imidacloprid, sulfoxaflor, spirotetramat, thiamethoxan y metamidofos, sin embargo, presenta como desventajas, la resurgencia de la plaga, eliminación de los enemigos naturales e inducir resistencia a los insecticidas utilizados en su control (INIFAP, 2014). El uso irracional y elevado en el número de aplicaciones genera la selección de múltiples mecanismos de resistencia (Lagunes y Villanueva, 1994). Está demostrado que la resistencia de los insectos a los insecticidas es frecuentemente el incremento de la actividad metabólica de la plaga. Estos mecanismos de resistencia metabólica no están ligados a ningún punto de acción específico y por tanto, pueden conferir resistencia a insecticidas de más de un grupo de diferente modo de acción (IRAC, 2015). Las principales enzimas que se encuentran realizando estos mecanismos son: esterasas, mono-oxigenasas, citocromo P450, y glutatión S-transferasas. Los insectos resistentes pueden tener elevados niveles de una enzima en particular o formas alteradas de la enzima que metaboliza al plaguicida a un nivel más rápido que la forma no alterada (FAO, 2012). En la agricultura se ha recurrido al estudio de estas biomoléculas para encontrar soluciones a dos grandes retos: la pérdida de cultivos por ataque de plagas y la utilización de compuestos sintéticos tóxicos para su control (Morillo y Notz, 2003).

METODOLOGIA

Colecta de material biológico. Para la obtención de material biológico, consistió en buscar o identificar parcelas con sorgo, durante el trascurso de este verano 2018, en los municipios de Abasolo, Cuerámaro, Huanímaro, Pénjamo y Valle de Santiago municipios del estado de Guanajuato, con problemas de pulgón amarillo. De cada municipio se obtuvieron 5 muestras de diferentes localidades. Cada muestreo consistió en llenar un tubo eppendorf y posteriormente lleno el tubo las muestras se colocaron en una hielera para evitar que se deshidrataran los pulgones.

Ubicación del experimento El material biológico se trasladó al laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Donde se realizó la identificación de *Melanaphis saccahari*. El material biológico se etiqueto y se mantuvo a una temperatura de -2°C. Hasta obtener la cuantificación de enzimas detoxificativas.

Pruebas bioquímicas. Cuantificación de proteína de *Melanaphis sacchari.* Se empleó la metodología descrita por Brogdon en 1984 utilizando albumina sérica, como proteína de referencia, se colocaron 3 insectos en tubos eppendorf, se agregaron 100µL de buffer KPO_4 a 0.05 molar y 7.2 de pH, se trituraron y se aforo a 1ml posteriormente se realizaron diferentes diluciones (1,5,10,15,20 y 30 pulgones de cuarto instar) para su evaluación, en cada cavidad de la microplaca de 96 pozos se colocaron 20µL de homogenato y se agregaron 80µL de boffer KPO_4 y 200µL de colorante diluido, esto se realizó por triplicado para cada repetición, las lecturas de absorbancia se tomaron utilizando un filtro de 630nm y se calcularon los valores de microlitros por mililitro por proteína comprendidos en el rango de 80 a 120µ. Una vez calculada la cantidad de insectos a emplear, se determinaron los niveles de α-est y β-est, GST, ACE y Oxi utilizando las metodologías descritas por Brogdon, (1988), Brogdon y Barber (1990) y Brogdon *et al*. (1997).

Niveles enzimáticos. Para la determinación de alfa (α) y beta (β) esterasas en cada pozo de una microplaca, se colocaron 100µL de homogenato, se agregaron 100µL de acetato de alfa o beta-naftil, se dejó incubar por 10 min, y se agregaron 100µL de fast-blue, se volvió a incubar durante 2 minutos y se leyeron en el lector de placas usando un filtro de 540nm. En cuanto a las Ox se colocaron 100µL de homogenato, se agregaron 200µL de TMZ (Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride), agregando una gota de (25µL) de agua oxigenada (H_2O_2), se dejó incubar 5 minutos, y se leyeron con un filtro de 620nm; Para las GST se colocaron 100 µL del homogenato, se agregaron 100 µL de Reduced glutation, y 100 µL de CDNB (1 – cloro- 2,4 dinitrobenceno), se leyó inmediatamente que fue tiempo cero (T_0)

usando un filtro de 340 nm, se volvió a leer transcurridos 5 minutos (T_5). Para el análisis de resultados se saco la diferencia entre ambos tiempos (T_5-T_0) y los resultados negativos se consideraron como 0 y por ultimo para ACE se colocaron 100 µL de homogenato, se agregaron 100 µL de acetilcolina-yodisada y 100 µL de DNTB (Acido- Ditio-Bis-Nitrobenozoico), se leyeron en tiempo cero (T_0) usando un filtro de 414nm, transcurridos 10 minutos (T_{10}) se volvió a leer. Para el análisis de resultados se obtuvo la diferencia entre ambos tiempos (T_{10}-T_0) y los resultados negativos se consideraron como 0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentaron diferencias significativas entre las poblaciones muestreadas para las enzimas α-est (24.94, <0.0001), β-est (47.83, <0.0001), GST (56.10, <0.0001), ACE (15.91, <0.0001) y Oxi (17.28, <0.0001). Observando que para el contenido de enzimas α–est y β-est (Cuadro 1) en los 5 municipios muestreados, se presentó en Huanímaro con 1.0159 y 0.9444 α-esterasas y β-esterasas y de acuerdo a la clasificación de Montella (2007), este municipio presenta los valores de resistencia más altos, encontrándose en la escala en el número 4 "Alta". Para α–est los municipios que le siguieron fueron Pénjamo, Cuerámaro y Abasolo con 0.9138, 0.8843 y 0.8478 respectivamente. Encontrándose en último lugar el municipio de Valle de Santiago con una media de 0.8100, estos 4 municipios se encuentran en la clasificación de resistencia en la escala 3 que es "Moderada". Estos resultados son similares a los reportados por Flores *et al*., (2006), en un trabajo con mosquitos de *Aedes aegipty L.* en el cual encontró que los niveles enzimáticos elevados son característicos de α-est en poblaciones que se han expuesto a piretroides y organofosforados. Mientras que para β-est el municipio de Cuerámaro con una media de 1.0976 presentó el mayor valor, encontrándose en la escala de resistencia en el número 4 que corresponde a "Alta", seguido de los municipios de Valle de Santiago, Pénjamo y Abasolo con 0.8984, 0.8729 y 0.8322 respectivamente, estos municipios se encuentran en la clasificación de resistencia número 2 que corresponde a "Ligera". Estos valores difieren a los reportados por Ponce *et al.,* (2009) donde ellos registraron que las β-est son el mecanismo que registra los valores más altos en adultos de *Aedes aegipty* expuestos a piretroides y organoclorados.

Tabla 1. Contenido de α y β-est de Melanaphis sacchari y escala de clasificación de resistencia de los municipios estudiados en el estado de Guanajuato.

No	Municipio	α – est				β - est			
		Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación	Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación
1	Abasolo	0.8478 ± 0.0736	cd	3	Moderada	0.8322 ± 0.1075	d	2	Ligera
2	Cuerámaro	0.8843 ± 0.1208	bc	3	Moderada	1.0976 ± 0.1510	a	4	Alta
3	Huanímaro	1.0159 ± 0.1787	a	4	Alta	0.9444 ± 0.1130	b	3	Moderada
4	Pénjamo	0.9138 ± 0.1022	b	3	Moderada	0.8729 ± 0.0748	cd	2	Ligera
5	Valle de Santiago	0.8100 ± 0.0782	d	3	Moderada	0.8984 ± 0.0756	bc	2	Ligera

En la Tabla 2 se muestra el contenido de GST y ACE en los 5 municipios muestreados, en donde se observa que para el caso de la enzima GST el municipio con el valor más alto fue Pénjamo con una media de 0.0257 con un 3 en la escala de la clasificación de resistencia que corresponde a "Moderada", seguido del municipio de Cuerámaro con 0.0195 (Ligera). Posteriormente se encuentra Huanímaro, Valle de Santiago y Abasolo con 0.0115, 0.0051 y 0.0040 respectivamente. todos ellos estando en la escala de clasificación "Nula" que es la numero 1. Estos valores son similares a los reportados por Rodríguez *et al.* (2001) en cepas de *Aedes aegypti* donde se muestra que la frecuencia de aparición del mecanismo GST es muy baja. Esto se lo atribuyen a que este mecanismo de detoxificación interviene generalmente en la resistencia a organofosforados, pero en las cepas estudiadas el mecanismo de esterasas elevadas fue el de mayor frecuencia en estas poblaciones y principal responsable de la resistencia a organofosforados, aunque también se encontró una acetilcolinesterasa alterada. Por otra parte, se observa que para la enzima ACE el municipio que reporto el valor más alto fue para Abasolo con una media de 0.0217 encontrándose en la escala de resistencia 3

que corresponde a "Moderada", posteriormente se observaron los municipios de Valle de Santiago Cuerámaro, Huanímaro y Pénjamo que se encuentran en la escala de clasificación de resistencia 2 que corresponde a "Ligera" con valores de 0.0105, 0.0079, 0.0068 y 0.0064 respectivamente. Al respecto Bisset (2002) menciona que las ACE produce un amplio espectro de resistencia a la de los organofosforados y en mayor medida a los carbamatos.

Tabla 2. Comparación de medias del contenido de GST y ACE de Melanaphis sacchari y escala de clasificación de resistencia de los municipios estudiados en el estado de Guanajuato.

No	Municipio	GST				ACE			
		Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación	Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación
1	Abasolo	0.0040 ± 0.0059	d	1	Nula	0.0217 ± 0.0198	a	3	Moderada
2	Cuerámaro	0.0195 ± 0.0152	b	2	Ligera	0.0079 ± 0.0090	b	2	Ligera
3	Huanímaro	0.0115 ± 0.0098	c	1	Nula	0.0068 ± 0.0069	b	2	Ligera
4	Pénjamo	0.0257 ± 0.0078	a	3	Moderada	0.0064 ± 0.0748	b	2	Ligera
5	Valle de Santiago	0.0051 ± 0.0076	d	1	Nula	0.0105 ± 0.0756	b	2	Ligera

Para las Oxi (Tabla 3), el municipio que obtuvo los valores más altos fue Abasolo con 0.3172, encontrándose en cuanto a la clasificación de resistencia en la 3 que es "Moderada", enseguida se observó Valle de Santiago con una media de 0.2709 y en la resistencia se encuentra en la 2 que corresponde a "Ligera", por ultimo los municipios de Pénjamo, Huanimaro y Cuerámaro con 0.2489, 0.2475 y 0.2286 respectivamente, encontrándose estos municipios en la escala 1 que corresponde a "Nula". Al respecto Pimentel *et al.,* (2008) mencionan que las oxidasas juegan un papel fundamental en la detoxificación de diversos plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados; según Clark *et al*., (1994), las enzimas oxidativas son el principal mecanismo fisiológico de resistencia a la abamectina.

Tabla 3. Comparación de medias del contenido de Oxi de Melanaphis sacchari y escala de clasificación de resistencia de los municipios estudiados en el estado de Guanajuato.

No	Municipio	Absorbancias ± SD		Escala	Clasificación
1	Abasolo	0.3172 ± 0.0843	a	3	Moderada
2	Cuerámaro	0.2286 ± 0.0358	c	1	Nula
3	Huanímaro	0.2475 ± 0.0532	bc	1	Nula
4	Pénjamo	0.2489 ± 0.0480	bc	1	Nula
5	Valle de Santiago	0.2709 ± 0.0584	b	2	Ligera

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye que en los municipios muestreados en el suereste del estado de Guanajuato, para las enzimas *α y β*-est, el municipio de Huanimaro presentó lo mayores valores con un valor en la escala de resistencia "Alta", el municipio de Abasolo se considera con una resistencia "Moderada" en relación al contenido de enzimas ACE y Oxi y a la vez el municipio de Pénjamo para GST.

BIBLIOGRAFIA

1. Bisset, A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana Medicina Tropical 54 (3).
2. Blackman, R. y Eastop, F. 2000. Aphids on the World´s Crops: An Identification and Information Guide, Wiley, second edition. 476 p.

3. Brogdon, W. G. 1984. Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of singlemosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 79: 457-459.
4. Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 90: 145-150. Brogdon, W. G. (1984). Mosquito protein microassay-1, protein determinations from small portions of singlemosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 79: 457-459.
5. Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology, 90: 145-150.
6. Brogdon, W. G.; Mcallister, J. C; Vulule, J. 1997. Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. Journal of the American Mosquito Control Association, 13: 233-237.
7. Clark, J. M., Scott, J. G.; Campos, F.; Bloomquist, J. R., 1994. Resistance to avermectins: Extent, mechanisms and management implications. Annual Review Entomology, 40: 1-30. http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.40.010195.00 024.
8. FAO, 2012. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia de los Plaguicidas.
9. FAOSTAT, 2014, Food and agriculture organization of the united nations. statistics división. Production of top 5 producers in 2014. Consultado en http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E
10. Flores, E. A.; Grajales, J. S.; Fernández, I. S.; Ponce, G. G.; Loaiza, M. H. B.; Lozano, S.; Brogdon, W. G.; Black Iv, W. C.; Beaty, B., 2006. Mechanisms of insecticide resistence in field populations of Aedes aegypti (L.) from Quintana Roo, Souther Mexico. J. of the American Mosquito Control Association, 22: 672-677.
11. Hernandez, R., 2015. Guanajuato, 2do. en producción de sorgo, trigo y alfalfa. Obtenido de https://periodicocorreo.com.mx/guanajuato-2do-en-produccion-de-sorgo-trigo-y-alfalfa/
12. INIFAP, 2014. Pulgon Amarillo *(Melanaphis sacchari)* Nueva Plaga del Sorgo de Tamaulipas. Consultado en http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/tamaulipas/Documents/Pulgon%20amarillo.pdf
13. IRAC, 2015. Comité de Acción para la Resistencia a los Insecticidas. Versión actualizada, octubre 2015.
14. Lagunes, T. A. y J. Villanueva, J.1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos, Edo. De México. 264 pp.
15. Montella, I. R.; Martins, A. J.; Fernández, V.; Pereira, L. B.; Braga, I. A.; Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanism of Brazilian Aedes aegyti populations from 2001-2004. The American Journal of Tropical Medical and Hygiene, 77: 467-477.
16. Morillo F. y A. Notz. 2003. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. Entomotropica 16:79-87.
17. Pimentel M. A. G., Antonino F. L. R., Duarte B. M., Humberto S., 2008. Resistance of storedproduct insects to phosphine. Pesq. Agropec. Bras. 43: 1671-1676. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_ arttext&pid=S0100- 204X2008001200005.
18. Ponce, G. G.; Badii, M.; Mercado, R.; Flores, A. E., 2009. Esterases in *Aedes albopictus* from Northeastern Mexico. Soutwestern entomologist, 34(4): 477-484. http://www.bioone.org/doi/abs/10.3958/059.034.0411.
19. Rodríguez del B., L. A. and A. P. Terán. 2015. Melanaphis sacchari (Hemiptera: Aphididae): A new sorghum insect pest in Mexico. Southwestern Entomologist, 40: 433−434.
20. Rodríguez MM, Bisset JA, Molina D, Díaz C, Soca LA. Adaptation of microtitration plate methods for quantification of the activity of esterases and glutathione-s-transferase in *Aedes aegypti*. Rev Cubana Med Trop 2001;53(1):32-6.
21. SDAYR, 2016. Secretaria de desarrollo agroalimentario y rural, Consultado en http://sda.guanajuato.gob.mx/contenido/adjuntos/publicaciones/2016/CuadernilloPulgonAmarillo.pdf (fecha de consulta 16-06-2018).
22. SENASICA, 2014. Pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehnter). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica, no 43, 15p.
23. SIAP, 2003. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Situación actual y perspectivas de la producción de sorgo en México 1992-2004. Boletín informativo. 93 p.

DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS EN LA EPIDERMIS SE RELACIONAN CON LA INCLINACIÓN DEL TALLO DE *Echinocactus platyacanthus*

Páez Jiménez, M. G.[26]; Escoto Rodríguez, M.[27]

RESUMEN

Diversos estudios señalan que algunas cactáceas, especialmente las de tallo globoso, tienden a inclinarse hacia las zonas de mayor radiación solar y, hasta donde sabemos, no se ha indagado el mecanismo por el cual esto ocurre. En esta investigación se muestrearon 5 individuos inclinados de la especie *Echinocactus platyacanthus* en S.L.P. Las mediciones fueron tomadas a todo lo largo de cuatro secciones: interna, externa, izquierda y derecha, y se compararon los pares "Interno-Externo" e "Izquierdo-Derecho". Se obtuvo la inclinación, la distancia entre areolas y espinas, la densidad y el índice estomático, el número de células epidérmicas y estomas y el ancho y largo de las mismas; se ejecutaron pruebas t-Student para su análisis. En algunos individuos se encontró que el tamaño celular y la densidad estomática fueron diferentes en los lados interno y externo, mientras que fueron similares en los lados izquierdo y derecho. Sin embargo, hubo mucha variabilidad en los datos a lo largo de todo el tallo. Estos resultados sugieren que la inclinación de la cactácea se relaciona con un crecimiento celular diferenciado pero estas diferencias no ocurren a lo largo de todo el tallo.

Palabras Clave: cactáceas, estomas, inclinación.

ABSTRACT

Several studies indicate that some cacti, especially those with a globose stem, tend to lean towards areas of greater solar radiation and, as far as we know, the mechanism by which this occurs has not been examined. In this investigation, 5 tilted individuals of the species *Echinocactus platyacanthus* were sampled in S.L.P. Measurements were taken along the whole stem in each of four sections: internal, external, left and right side, and comparing them in pairs "Internal-External" and "Left-Right". The inclination, the distance between areolas and spines, the density and the stomatal index, the number of epidermal cells and stomata, and cell width and length were obtained; t-Student test were performed for the analysis. In some individuals it was found that cell size and stomal density were different between external and internal sides, while there was no difference between left and right sides. However, there was much variability in the data. These results suggest that the inclination of the cactus is related to a differentiated cell growth but these differences do not occur along the whole stem.

Keywords: cacti, stomate, tilt.

INTRODUCCIÓN

Algunas cactáceas de tallo globoso tienden a inclinar el ápice hacia áreas de mayor radiación lumínica (Nobel, 1981; Ehleringer and House, 1984; Cano-Santana, 1992; Zavala Hurtado et al, 1998; Palomino, 2014; Herce et al, 2014; Méndez, 2015). Desde hace tiempo se ha sugerido que un crecimiento celular asimétrico podría causar esa inclinación en los tallos (Macdougal and Spalding, 1910), es decir, si las células de un lado del tallo crecen más que las células del lado opuesto se ocasionaría una curvatura en el tallo. Sin embargo, el diferencial en las características morfológicas y anatómicas de esos lados opuestos no ha sido muy estudiado; es apenas recientemente, con el trabajo de Sánchez-Méndez y Escoto-Rodríguez (2017), que se inició la investigación sobre ese tema. Hace falta continuar con los estudios del posible diferencial morfoanatómico en los cactos globosos que ayudaría a entender el proceso de inclinación del tallo y sus consecuencias anatómicas, como podría ser una modificación en la densidad estomática o el tamaño de las células epidérmicas.

[26] Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Dr. Manuel Nava No. 8, Col. Zona Universitaria Poniente, C.P. 78290, San Luis Potosí, S. L. P., México, marianagepaez@alumnos.uaslp.edu.mx

[27] Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ejido Palma de la Cruz. C.P. 78321, San Luis Potosí, S.L.P., México. martin.escoto@uaslp.mx

Sánchez-Méndez y Escoto-Rodríguez (2017), estudiaron 10 individuos de *Echinocactus platyacanthus* con diferente grado de inclinación, comparando únicamente los lados largo y corto a través de pocas mediciones. Sus resultados indicaron a través de un análisis estadístico que existían diferencias significativas entre ambos lados del tallo con respecto a el crecimiento celular, la distancia entre areolas y la densidad estomática; además, encontraron mucha variabilidad en las mediciones, lo que sugiere que podrían existir diferencias en las longitudes celulares las cuales, sin embargo, no fueron cuantificadas.

El objetivo de este trabajo es contrastar, en *Echinocactus platyacanthus*, las hipotéticas diferencias entre el lado interior (costilla que presentaba la curvatura más corta) y el lado exterior (costilla que presentaba la curvatura más larga); asimismo, comparar ese diferencial con el obtenido entre los lados derecho e izquierdo (ambos vistos desde el lado interior de la planta, tal como se muestra en la Figura 1). El comparar el par "Interno-Externo" con el par "Derecha-Izquierda" en los que no existe diferencial de crecimiento, a manera de control, permite comprobar predicciones relacionadas con un diferencial de crecimiento en un solo sentido que ocasiona la curvatura. Es decir, la predicción sugiere que, en los lados no relacionados con la curvatura, no habría diferencias en los parámetros estudiados. Se estableció como hipótesis de trabajo que los lados interior y exterior deberían ser diferentes entre sí mientras que los lados izquierdo y derecho deberían ser similares.

METODOLOGÍA

El estudio se llevó a cabo en el Estado de San Luis Potosí. Fueron muestreados un total cinco individuos inclinados de la especie *Echinocactus platyacanthus* en la denominada Zona Centro del Estado, dos en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UASLP, en el Ejido Palma de la Cruz y tres en el Jardín Botánico "El Izotal" ubicado en el Parque Tangamanga I. Se midió la inclinación de cada individuo con un clinómetro (Suunto) y se localizó su costilla más larga y su costilla más corta, así cada ejemplar fue seccionado imaginariamente en cuatro: lado interior (costilla que presentaba la curvatura más corta), lado exterior (costilla que presentaba la curvatura más larga), lado derecho (visto desde el lado interior) y lado izquierdo (también visto desde el lado interior), como se muestra en la Figura 1. Se estableció como hipótesis inicial que el lado exterior y el lado interior deberían presentar diferencias significativas entre sí y el lado izquierdo y derecho similitudes.

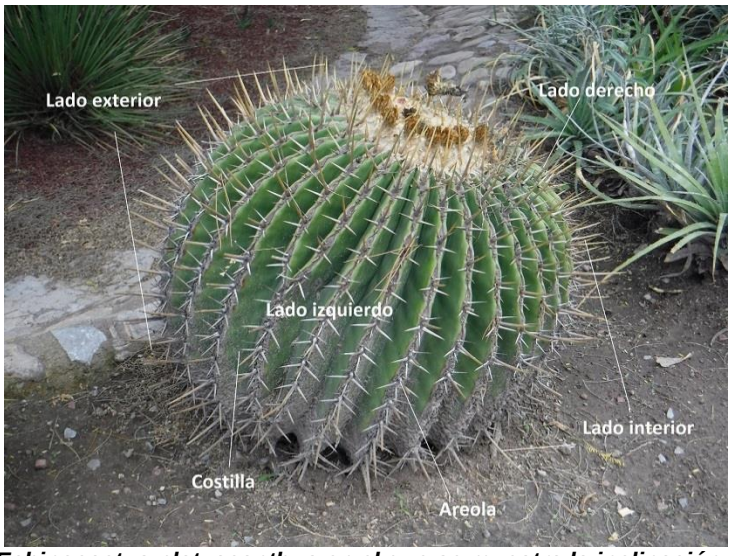


Figura 1. Individuo de Echinocactus platyacanthus en el que se muestra la inclinación del ápice. En la imagen se señalan las costillas, areolas y lo que se consideró como el lado exterior, lado derecho, lado izquierdo y lado interior.

De las secciones ya establecidas se midió con un vernier digital la apertura de cada una de las areolas desde su raíz y la distancia entre cada una de las espinas principales.

Además, se tomaron 10 impresiones de cada una de las cuatro costillas, espaciadas según el largo de esta, encontrándose, así la impresión número 1 ubicada en la parte más superior de la cactácea y la número 10 en la parte más inferior, esto con el objetivo de determinar si existía alguna diferencia según la posición, entre el índice y la

densidad estomática y el número, ancho y largo de las células epidérmicas. La técnica para recolectar las impresiones se basó en la aplicación de esmalte comercial transparente para uñas en un área de alrededor de $1cm^2$ (tamaño de una uña del dedo meñique adulto) en la superficie de las costillas, seguida de la remoción de la misma con cinta adhesiva transparente comercial colocada de manera perpendicular a la curvatura de la costilla, la cual era finalmente colocada en un portaobjetos. Cabe señalar que el tiempo para colocar la cinta y removerla fue crucial para obtener una impresión de calidad, ya que, después de una serie de errores, se llegó a la conclusión de que había que aplicar esmalte en 5 posiciones y a continuación, colocar la cinta en el mismo orden y proceder de la misma manera con el resto de las costillas sin despegar ninguna de las cintas, así, una vez que se hayan terminado de colocar las 40 cintas adhesivas se procederá a despegarlas en el orden en el que se comenzó a colocarlas, lo cual no sólo garantizó una impresión de calidad, sino también agilizó el proceso de recolección de muestras.

Estas impresiones fueron observadas en un microscopio óptico con cámara fotográfica (marca: Zeiss) en campos de 40x y 10x, registrando el número de estomas en el campo 10x y 40x y el número de células epidérmicas en el campo 40x de manera manual, además del ancho y largo promedio de células epidérmicas escogidas aleatoriamente y medidas con ayuda del software ImageJ. El conteo se realizó en una computadora con la imagen del microscopio proyectada a través de un programa de cómputo de visualización de fotos (ZEN 2) y se calculó el área del campo de observación con un portaobjetos con escala micrométrica.

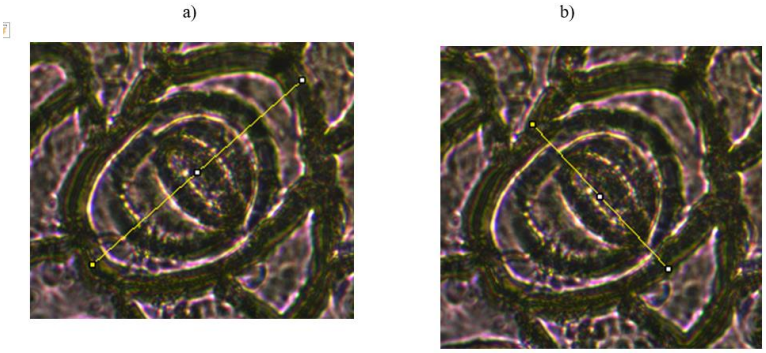


Figura 2. Impresiones de epidermis de un mismo individuo de <u>Echinocactus platyacanthus</u> con inclinación del ápice. a) Se señala lo que se consideró como ancho del complejo estomático y b) Se señala lo que se consideró como largo del complejo estomático. Las mediciones fueron realizadas con el software "Image J".

Se determinó la densidad estomática como estomas por mm^2 y el índice estomático (IE) se calculó con la siguiente expresión:

$$IE = [NE / (NE + NCE)] \times 100 \quad (1)$$

donde NE = número de estomas, y NCE = número de células epidérmicas.

Por último, se utilizó la prueba de t-Student de dos colas con $\alpha = 0.05$, para comparar por pares el lado interno con el externo y el lado derecho con el izquierdo en un mismo individuo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inclinación de las biznagas se encontró entre los 23° y los 39° y se mostró independiente del tamaño de las mismas; se observaron cambios en la orientación del ápice, debidos posiblemente a traslados antropogénicos de las biznagas, ya que este parece alejarse de la sombra y buscar la luz en todos los casos, tal y como han reportado otros autores.

La hipótesis planteada inicialmente establecía que deberían existir diferencias entre el lado exterior y el lado interior de la biznaga y similitudes entre el lado izquierdo y derecho, por lo que los datos obtenidos fueron comparados en los pares: "Interior-Exterior" y "Derecha-Izquierda". En el 80% de los casos se encontró una mayor distancia entre espinas y entre areolas en el lado exterior en comparación con el interior y un mayor número de estomas en el lado

interior en comparación con el exterior, además el largo de las células epidérmicas fue mayor en el lado exterior en comparación con el interior y la densidad estomática fue mayor en el lado interior en comparación con el exterior. La mayor densidad estomática del lado interior puede indicar que las células epidérmicas son más chicas que en el lado exterior, lo cual coincide con lo encontrado que las células epidérmicas tienden a ser más largas en el lado externo que en el lado interno. Además, se encontró similar distancia entre espinas en ambos lados, pero mayor distancia entre ellas en el lado externo en comparación con el interno. Todo lo anterior, parece explicar que se produzca un crecimiento inclinado longitudinal y no lateral.

No siempre se presentó una mayor distancia entre espinas y areolas en el lado exterior, esto podría explicarse debido a que las biznagas muestreadas no presentaban una forma esférica perfecta y su inclinación no era constante. La inclinación parece darse en posiciones específicas del tallo y haber regiones sin tanta inclinación. Se debe tener cuidado en muestrear la región que determina la inclinación del tallo para así poder observar las diferencias relacionadas con el tamaño celular.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se sugiere que el crecimiento asimétrico de los lados de *Echinocactus platyacanthus* se relaciona con un crecimiento longitudinal, y no lateral, de sus células epidérmicas. Asimismo, se sugiere estudiar los individuos más inclinados y solamente en la sección que determina el cambio en la dirección del tallo para poder observar diferencias epidérmicas más evidentes.

BIBLIOGRAFIA

CANO-SANTANA, Z., CORDERO, C. AND EZCURRA, E. (1992). Termorregulación y eficiencia de intercepción de luz en Opuntia pilifera Weber (Cactaceae). Acta Botanica Mexicana, (19), p.63.

EHLERINGER, J., AND HOUSE, D. (1984). Orientation and slope preference in barrel cactus (Ferocactus acanthodes) at its northern distribution limit. *The Great Basin Naturalist*, 133-139.

HERCE, M. F., MARTORELL, C., ALONSO-FERNANDEZ, C., BOULLOSA, L. F. V. V., AND MEAVE, J. A. (2014). Stem tilting in the inter-tropical cactus Echinocactus platyacanthus: an adaptive solution to the trade-off between radiation acquisition and temperature control. *Plant Biology*, *16*(3), 571-577.

MACDOUGAL, D. T., AND SPALDING, E. S. (1910). *The water-balance of succulent plants* (No. 141). Carnegie Institution of Washington.

MÉNDEZ, E. (2015) Inclinación de *Denmoza rhodacantha* (cactaceae) en el w árido de Mendoza, Argentina. Efecto nurse. *Boletín de Estudios Geográficos*, 104, 15-23.

MÉNDEZ, E. (2007), Variación estructural en poblaciones de *Denmoza rhodacantha* (Cactaceae) sobre laderas de montañas en Mendoza-Argentina, en: Rev. FCA, U. N. Cuyo, n. 39 (2), pp. 71 – 80

NOBEL, P. S. (1981). Influences of photosynthetically active radiation on cladode orientation, stem tilting, and height of cacti. *Ecology*, *62*(4), 982-990.

PALOMINO. A. G. (2014). Caracterización de relaciones espaciales y aclimataciones morfológicas de *Ferocactus viridescens* como base técnica para programas de rescate y reubicación de individuos. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México.

SÁNCHEZ-MÉNDEZ, M.K.; ESCOTO-RODRÍGUEZ, M. (2017). Mecanismo de inclincación del tallo en la biznaga burra *(Echinocactus platyacanthus)*. Memorias del Verano de la Ciencia de la UASLP Edición 2017; Área de Ciencias Agropecuarias.

ZAVALA-HURTADO, J. A., VITE, F., NAD EZCURRA, E. (1998). Stem tilting and pseudocephalium orientation in *Cephalocereus columna-trajan*i (cactaceae): a functional interpretation. *Ecology*, *79*(1), 340-348.

EVALUACION *IN VITRO* DE LA INTERACCIÓN MICOBIONTE Y FOTOBIONTE

Maricela Zumaya García[1], César Álvarez Mejía[2] y Varinia López Ramírez [3]

RESUMEN

Los líquenes son organismos conformados por un hongo, un alga o cianobacteria y una levadura a través de una simbiosis mutualista. Los fotobiontes asociados a los líquenes no son específicos, es decir, un fotobionte puede asociarse a diferentes hongos liquénicos. En este trabajo evaluamos la interacción *in vitro* de cepas de hongos asociados a líquenes M002/N002, *Melanelixia* y *Arthoria #2* y los distintos fotobiontes *Trebouxia sp., Brateacoccus sp., Scenedesmus sp., Stiochococcus sp.* y la cianobacteria *Crinalum sp.* aisladas de líquenes. El desarrollo de la interacción se evaluó microscópicamente cada 48 h., durante 14 días. El crecimiento de las cepas se realizó a través de un sistema de poliuretano sobre papel filtro inoculado con medio liquido Czapek con 15 g/L de sacarosa. En el análisis microscópico de todos los ensayos no se logró la visualización del alga, sin embargo, en la combinación *Arthoria #2* con *Trebouxia sp.* y M002/N002 con *Brateacoccus sp.* se observó esporulación del hongo desde las primeras 48 horas. Es necesario implementar nuevas condiciones de cultivo que permitan que el hongo siga desarrollándose y pueda interactuar con el fotobionte.

ABSTRACT

Liches are organisms formed by fungus and a algae or cyanobacteria and a yeast through a mutualist simbiosis. Photobionts associated to lichens are not specific, this mean that it could be one photobiont associated to different lichen fungi. In this work, we evaluated the *in vitro* interaction between fungal strains associated with lichens M002/N002, *Melanelixia* and *Arthoria # 2* and the different photobionts *Trebouxia sp., Brateacoccus sp., Scenedesmus sp., Stiochococcus sp*. and the cyanobacterium *Crinalum sp.* isolated from lichens. The development of the interaction was evaluated microscopically every 48 h., for 14 days. The growth of the strains was carried out through a polyurethane system on filter paper inoculated with Czapek liquid medium with 15 g/L of saccharose. In the microscopic analysis of all the trials the visualization of the alga was not achieved, however, in the combination *Arthoria # 2* with *Trebouxia sp.* and M002/N002 with *Brateacoccus sp*. fungal sporulation was observed from the first 48 hours. It is necessary to implement new cultivation conditions that allow the fungus to continue to develop and to interact with the photobiont.

Palabras clave: liquen, interacción, simbiosis, fotobionte, micobionte

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son una asociación simbiótica mutualista entre un hongo (micobionte), algas verdes o cianobacterias (fotobionte), y una levadura en la cual todos los miembros se ven beneficiados, durante la interacción pueden estar involucrados uno o más organismos fotosintéticos (Soto Medina & Bolaños R., 2010). El micobionte es la fracción se encarga de brindarle al fotobionte sales minerales y protección contra la radiación solar (Vaillant, 2104), y este por medio de la fotosíntesis le proporciona las fuentes de carbono escenciales para el micobionte (Kopun, Grube, Muggia & Pe, 2017). Los líquenes comienzan el desarrollo del talo cuando el hongo entra en contacto con el fotobionte y posteriormente el micobionte envuelve completamente al fotobionte (Nash, 2008). Durante las primeras etapas de la simbiosis son fundamentales para el reconocimiento del fotobionte por el micobionte (Muggia, Kopun, & Grube, 2017). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la interacción entre las cepas de hongos M002/N002, *Melanelixia* y *Arthoria #2* y distintas algas, *Trebouxia sp., Brateacoccus sp., Scenedesmus sp., Stiochococcus sp.* y la cianobacteria *Crinalum sp.* aisladas de líquenes y que forman parte del cepario del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana.

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. mari96p@hotmail.com

[2] Subdirección de Investigación. Instituto Tecnológico Superior de Abasolo. Blvd Cuitzeo de los Naranjos No. 401 Col. Cuitzeo de los Naranjos, C.P. 36976. Abasolo, Guanajuato. cesar.alvarez@tecabasolo.edu.mx

[3]Coordinación de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. valopez@itesi.edu.mx

MATERIALES Y METODOS

I. Reactivación de las cepas y preparación de material

Se reactivaron las cepas de hongos con los nombres: M002/N002, *Melanelixia* y *Arthoria #2* en agar dextrosa Sabouraud, tomando 0.5 cm de inoculo con un horadador. Para los ensayos de simbiosis se recortaron trozos de poliuretano con una medida de 2 cm por lado y se perforo con un horadador de 0.5 cm de diámetro, estos se colocaron en una caja Petri de vidrio sobre papel filtro estéril.

II. Conteo celular de algas

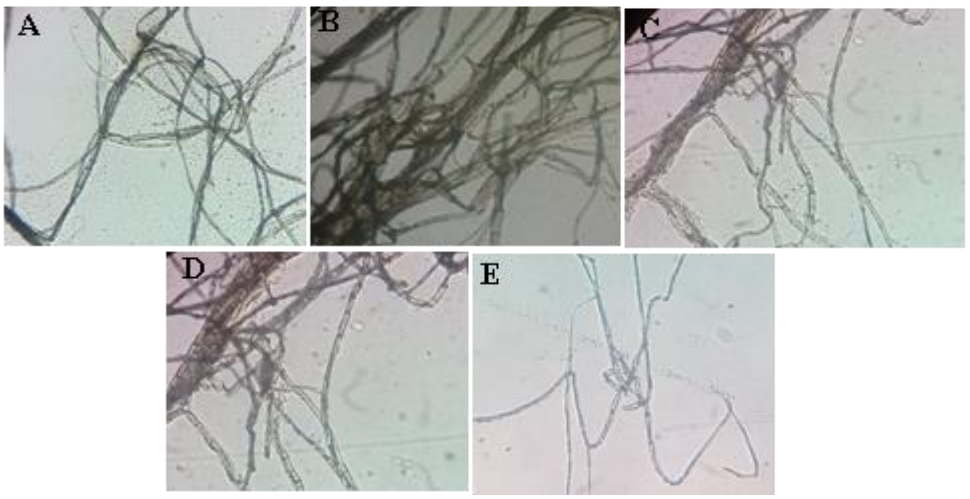
Se realizó conteo celular en cámara de Neubauer de las cepas de algas aisladas de líquenes *Trebouxia sp., Brateacoccus sp., Scenedesmus sp., Stiochococcus sp.* y la cianobacteria *Crinalum sp.* y se preparó y se diluyo en medio líquido BG11 hasta alcanzar una concentración celular de $1x10^6$ cel/mL.

III. Preparación de los ensayos de simbiosis

De las cepas M002/N002, *Melanelixia* y *Arthoria #2* en agar dextrosa Sabouroud se tomó 0.5 cm de inoculo con un horadador y se sembraron 6 replicas de cada una de las cepas colocando el inoculo en el orificio del poliuretano, agregando 3 mL de medio liquido Czapek con 15 g/L de sacarosa. Los hongos se incubaron por un periodo de 96 horas a una semana debido a su lento crecimiento. Una vez desarrollado el hongo se le agrego una cantidad de 50 µL ($1x10^6$ cel/mL) de las distintas algas, dejando un control del hongo sin alga, esto se realizó en las tres cepas de hongos: M002/N002, *Melanelixia* y *Arthoria #2* por separado, se colocó un cubreobjetos estéril sobre la zona donde se aplicó el alga en el hongo y ambas fracciones se incubaron a temperatura ambiente y procurando un fotoperiodo de 16 h luz/8 h obscuridad. La observación microscópica de la interacción se evaluó cada 48 horas por 14 días.

RESULTADOS

El desarrollo de los hongos liquénicos es muy lento, por lo tanto, se agregó el alga hasta una semana después de incubación. Para dar seguimiento al desarrollo de la interacción se observaron las muestras desarrolladas en los cubre objetos cada 48 horas, obteniéndose un mejor resultado en los hongos *Arthoria #2* con la cianobacteria *Crinalium sp.* (Figura 1) y las algas *Trebouxia sp.* (Figura 2), *Stiochoccoccus sp.* (Figura 3) y *Brateacoccus sp.* (Figura 4) y M002/N002 con *Brateacoccus sp.* (Figura 5). Durante la evaluación microscópica de *Arthoria #2* con *Crinalium* (Figura 1) no se observaron cambios morfológicos con respecto al control, tampoco se logró visualizar el alga en el campo, solo una coloración verde oscuro en las hifas. Sin embargo, se pudo observar que el hongo continuaba creciendo con lentitud aun después de tener contacto con el alga, debido a la baja cantidad de fuente de carbono proporcionada por el medio, con esto también se deseaba evaluar si el alga era capaz de proporcionar la fuente de carbono al hongo.



En el ensayo de *Arthoria #2* con *Trebouxia sp.* (Figura 2) después de 120 horas de incubacion (Figura 2B) se observó la presencia de esporas, al igual que en el ensayo de M002/N002 con *Brateacoccus sp.* donde desde un inicio se presentó esporulación como se muestra en las Figuras 5A y 5D.

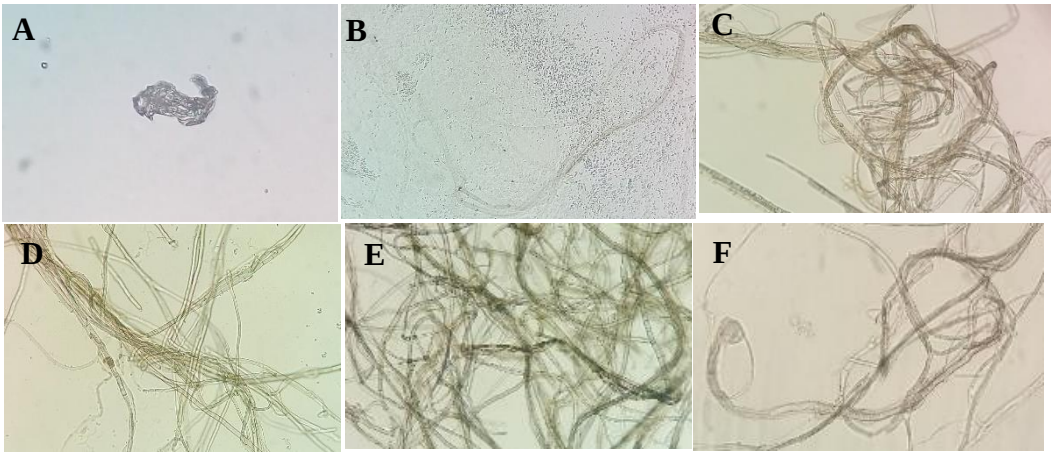


Figura 2. Evaluación microscópica de la interacción de Arthoria #2 con el alga Trebouxia sp. a diferentes tiempos de incubación. A. 48 horas; B. 120 horas; C. 168 horas; D. 216 horas; E. 288 horas; F. 336 horas.

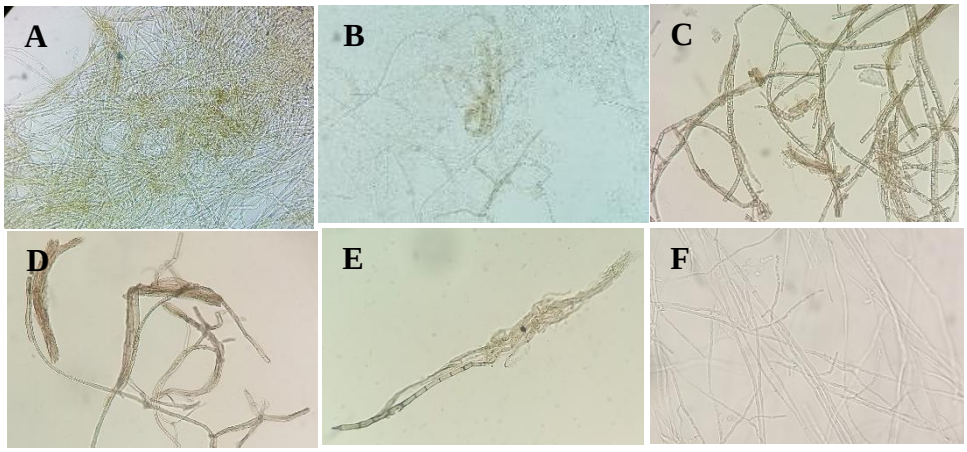
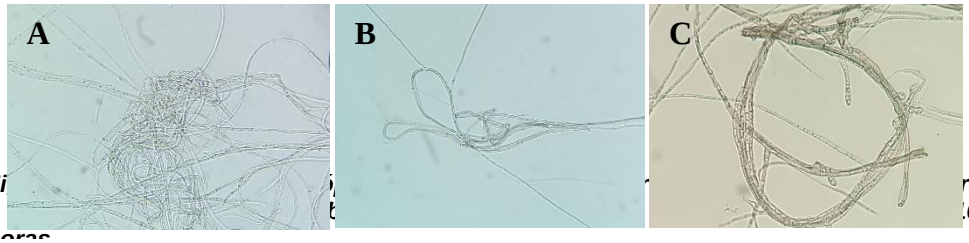


Figura 3. Evaluación microscópica de la interacción de Arthoria #2 con el alga Stiochococcus sp. a diferentes tiempos de incubación. A. 48 horas; B. 120 horas; C. 168 horas; D. 216 horas; E. 288 horas; F. 336 horas.



Fi ria Crinalium sp. a 6 horas; E. 264 horas

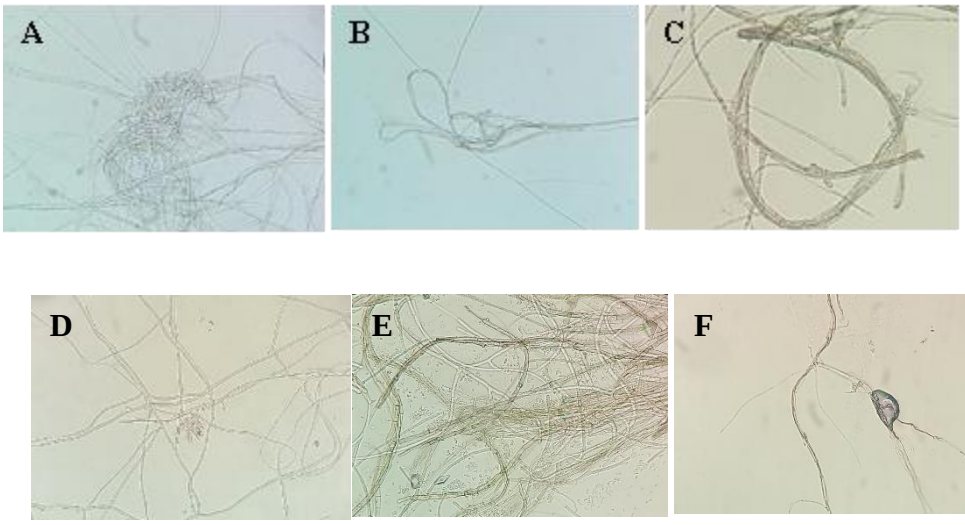


Figura 4. Evaluación microscópica de la interacción de Arthoria #2 con el alga Brateacoccus sp. a diferentes tiempos de incubación. A. 48 horas; B. 120 horas; C. 168 horas; D. 216 horas; E. 288 horas; F. 336 horas.

En el ensayo de *Arthoria #2* con *Brateacoccus sp.* (Figura 3) las hifas se observaron muy pálidas conforme el paso de los días, y la visualización del alga no fue perceptible. A diferencia de los ensayos de *Arthoria #2*, que el hongo continuaba creciendo en el ensayo de M002/N002 con *Brateacoccus sp.* no se observó crecimiento por parte de este. En el análisis microscópico de la interacción de M002/N002 con *Brateacoccus sp.* solo se observó que las hifas presentaban un tono verde oscuro con la presencia de vacuolas dentro de las mismas. A las 168 horas de incubación (Figura 5D) se observó la presencia de sacos al termino de las hifas del hongo fue hasta las 216 horas de incubación que se observaron esporas.

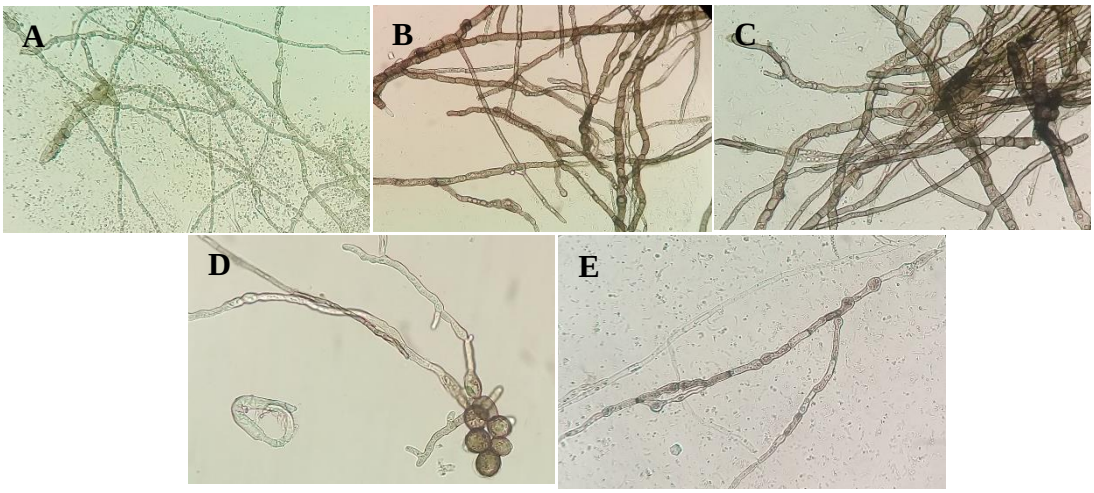


Figura 5. Evaluación microscópica de la interacción de M002/N002 con el alga Brateacoccus sp. a diferentes tiempos de incubación. A. 24 horas; B. 72 horas; C. 120 horas; D. 168 horas; E. 216 horas.

DISCUSIÓN

El estudio de la interacción entre hongos liquénicos y algas ha sido evaluado anteriormente, con el objeto de determinar los genes o las señales químicas involucradas durante las primeras etapas de simbiosis. El objetivo principal de nuestro trabajo fue la evaluación morfológica en un sistema de microcultivo sobre poliuretano y medio

liquido Czapek diluido. Anteriormente se han realizado interacciones utilizando otros micobiontes y fotobiontes como en el estudio reportado por Arabindan y col. (2016), donde utilizaron una matriz de soporte de polipropileno con algodón que fue la que resulto más efectiva para la interacción, la inoculación se realizo de una manera distinta a la de nuestro trabajo, dado a que inocularon las esporas del hongo y las células de alga al mismo tiempo en una proporción de 1:300 obteniendo respuesta de interacción a las 160 horas, mostrando en el estudio microscópico las algas fijadas a las hifas del hongo, en dicho estudio en un principio no hubo respuesta de crecimiento por parte del alga debido a que el hongo tomaba la fuente de carbono del medio de cultivo y no del fotobionte, misma situación que se podría estar presentando en nuestro ensayo al agregar medio de una a dos veces por semana durante las dos semanas del ensayo, por lo tanto, se sugiere que se reduzca aún más la fuente de carbono del medio para que la suministrada por el alga pueda ser aprovechada y puedan crecer en conjunto. En otro trabajo de interacción entre fracciones liquénicas se observó una respuesta de interacción después de un año de montado el ensayo (Muggia, Kraker, Gobler & Grube, 2018), en dicho estudio, se evaluó la interacción entre distintas cepas de hongos liquenicos y el fotobionte *Trebouxia sp.*, adaptando en el laboratorio las condiciones en las que los líquenes se encuentran en la naturaleza, proporcionado un lugar seco y carente de nutrientes empleando esferas de alginato sobre medio solido de extracto de levadura de malta, posterior a un año de interacción se observó que las células del alga estaban rodeadas por las hifas del hongo; por lo cual, proponemos la conveniencia de modificar las condiciones de crecimiento y ampliar el tiempo de seguimiento del ensayo.

CONCLUSION

En los resultados mostrados anteriormente se puede observar que no existe interacción de hongos y algas en las condiciones ensayadas. En estudios posteriores de interacción *in vitro* se sugiere modificar la fuente de carbono, reduciendo la concentración para permitir que el alga suministre al hongo los elementos requiere para su desarrollo, así como realizar el ensayo durante un tiempo mas prolongado, procurando semejar las condiciones a las que normalmente se encuentran las fracciones liquénicas en la naturaleza.

BIBLIOGRAFIA

Kopun, T., Grube, M., Muggia, L., & Pe, S. (2017). Photobiont selectivity leads to ecological tolerance and evolutionary divergence in a polymorphic complex of lichenized fungi, *Annals of Botany*, 114(3), 463–475. https://doi.org/10.1093/aob/mcu146

Muggia, L., Kopun, T., & Grube, M. (2017). Effects of Growth Media on the Diversity of Culturable Fungi from Lichens, Lichens, *Molecules*, 22(5), 1–22. https://doi.org/10.3390/molecules22050824

Soto Medina, E., & Bolaños R., A. C. (2010). Diversidad de líquenes cortícolas en el bosque subandino de la finca Zíngara (Cali, Valle del Cauca). *Revista de Ciencias*, *14*(12), 35–44.

Vaillant, D. (2014). Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatogenos. *Fitosanidad*, *18*(1), 51–57.

Thomas H. Nash. (2008). Lichen Biology. United States of America: Cambridge University Press.

Lucia Muggia, Sigrun Kraker, Theodora Gößler, Martin Grube (2018). Enforced fungal-algal symbioses in alginate spheres, *FEMS Microbiology Letters*, 365(14). https://doi.org/10.1093/femsle/fny115

SUSCEPTIBILIDAD DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS A DIMETIL SULFÓXIDO

Rodríguez Castillo Nahaivi Paola[1]; Barrón Bravo Óscar Guadalupe[2] y Angel Sahagún César Andrés [2,3]

RESUMEN

Dimetil sulfóxido (DMSO) se utiliza como solvente de diferentes productos químicos, aumentando o disminuyendo su acción. Los nematodos entomopatógenos tienen un rol biológico importante dentro del control de plagas y la salud del suelo, sin embargo, debido al uso indiscriminado de productos químicos (diluidos en DMSO) utilizados para el control de plagas, estos organismos pueden o no verse afectados. El objetivo fue evaluar la susceptibilidad de nematodos entomopatógenos a dimetil sulfóxido. En condiciones de laboratorio se evaluó DMSO a una concentración de 5% durante 24 y 48 horas. Se encontró el tratamiento de H_2O+DMSO al 5% del volumen total, obtuvo el mayor porcentaje de susceptibilidad en todas las cepas a las 48 horas y la cepa M1 obtuvo 81.01%.

ABSTRACT

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is used as a solvent for different chemical products, increasing or decreasing its action. The entomopathogenic nematodes have an important biological role withih the biological pest control and soil health, however, due to the indiscriminate use of chemical products (diluted in DMSO) used for pest control, these organisms may or may not be affected. The objective was to evaluate the susceptibility of entomatological nematodes to dimethyl sulfoxide. In laboratory conditions DMSO was evaluated at a concentration of 5% for 24 and 48 hours. The H2O + DMSO treatment was found at 5% of the total volume, it obtained the highest percentage of susceptibility in all the strains at 48 hours and the M1 strain obtained 81.01%.

Palabras clave:

Control biológico, producto químico, contaminación ambiental, antihelmíntico.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos cumplen un papel importante en el medio ambiente en su fase de vida libre, ayudan a la salud del suelo y a incorporar biodiversidad en el entorno que habitan. Los nematodos entomopatógenos son gusanos redondos que parasitan insectos mediante una asociación mutualista con bacterias. Debido al uso cotidiano de productos químicos como insecticidas o desparasitantes que se aplican de forma oral o por aspersión en los animales, estos habitantes normales del suelo pueden ser afectados. Algunos productos químicos empleados para diferentes evaluaciones en condiciones de laboratorio y campo suelen ser hidrofóbicos por lo que es necesario el uso de dimetil sulfóxido (DMSO) el cual es un producto proveniente de la industria maderera y además de ser un solvente se utiliza como fármaco y crioprotector (Huang *et al.*, 2018; Josephsen *et al*., 2018). Los nematodos entomopatógenos son cada vez más utilizados en la investigación sobre control biológico lo que es benéfico para el medio ambiente. Ferreira *et al.* (2011) evaluaron la influencia de timol y DMSO en la supervivencia, crecimiento y reproducción de *Bradybaena similares*, el cual es un caracol que habita en Asia; donde utilizaron un control con DMSO al 1% durante 10 min, obteniendo una susceptibilidad de 10%. Son-de Fernex *et al.* (2016) evaluaron la actividad ovicida de extractos de plantas contra el nematodo *Cooperia punctata* utilizaron un control negativo de DMSO al 2.5 % durante 48 h, y obtuvieron una susceptibilidad de 4.71%.

[1]Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato, nahaivi.c@gmail.com
[2]Posgrado en Biociencias, Universidad de Guanajuato. oscarbarronb@hotmail.com
[3]Departamento de Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato. sahagun01@yahoo.com.mx

La preparación de los bioensayos es diferente dependiendo del producto químico a utilizar, si el producto es hidrofóbico se utiliza DMSO. Existe poca información sobre la influencia del DMSO como agonista o antagonista de los fármacos que se diluyen en él, así como la susceptibilidad de organismos benéficos para el control biológico y que se encuentran
en el medio ambiente donde se eliminan los productos o metabolitos utilizados como los NEP por lo cual el objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad de nematodos entomopatógenos de suelos a dimetil sulfóxido al 5%

METODOLOGÍA

El experimento se realizó en el Laboratorio de Parasitología y Control Biológico de la Universidad de Guanajuato (LPCB-UG). Se utilizaron nematodos entomopatógenos NEP pertenecientes al LPCB-UG y la metodología de evaluación fue la de inhibición de la migración larvaria de Demeler *et al*. (2010).
Para cada ensayo se necesitaron aproximadamente 50 a 80 IJ (infectivo juvenil) en 200 µl. En una placa de 24 pozos se colocó un tratamiento testigo con 200 µl de IJ y 1000 µl de agua destilada, un tratamiento con DMSO al 5% del volumen total, 200 µl de IJ y agua destilada, cada tratamiento constó de cuatro repeticiones. La placa se dejó incubar con los tratamientos en completa oscuridad durante 24 h a 25±1°C. Pasadas las 24 h se realizaron los conteos de IJ vivos y muertos en un microscopio estereoscópico, posteriormente el contenido fue transferido a otra placa de pozos y se pasó a través de filtros maya de 25 µl y se incubó por 24 h a 25±1°C, transcurrido el tiempo se retiraron los filtros y se procedió a contar vivos y muertos.
Inicialmente los resultados fueron transformados a porcentajes y se corrigieron las mortalidades aplicando la fórmula de Sun-Shepard y posteriormente se realizó la transformación angular (Arc Sen $^{-1}$) para normalizar los datos. Al final se realizó un análisis de varianza con un arreglo factorial (Factor A: Cepa; Factor B: Cepa del nematodo y Factor C: el tiempo de duración de la evaluación) y una prueba de separación de medias por el método de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones en que se realizaron los experimentos se encontró que los resultados variaron de 0 al 81.01% respecto al grupo testigo. El tratamiento de H_2O/DMSO 5% obtuvo el mayor porcentaje de susceptibilidad en la cepa de nematodos M1 a las 48 horas y el menor porcentaje de susceptibilidad en la cepa M18 a las 24 horas.
El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos (P<0.0001). Respecto al tratamiento la prueba de Tukey formó dos grupos donde el más sobresaliente es el H_2O/DMSO 5%; el análisis de varianza también demostró diferencia significativa en el factor de tiempo de duración de la evaluación (P<0.0007), donde la mayor susceptibilidad ocurre a las 48 horas; finalmente no existen diferencias significativas entre las muestras (P<0.0835).

Tabla 1. Susceptibilidad de nematodos entomopatógenos a* dimetil sulfóxido al *5%.

TRATAMIENTO	**M1 a**		**M4 a**		**M13 a**		**M18 a**	
	24 h ***b***	48 h ***a***	24 h ***b***	48 h ***a***	24 h ***b***	48 h ***a***	24 ***b***	48 ***a***
H_2O/DMSO 5% ***a***	69.09±1.59	81.01±11.91	51.23±5.55	62.53±20.67	46.18±14.49	74.33±8.77	44.84±3.85	68.65±22.83
TESTIGO H_2O ***b***	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

*Diferentes literales por línea (muestras y tiempo) y por columna (tratamiento) indican diferencias significativas (P<0.05). DMSO: dimetilsulfóxido; h: horas; H_2O: Agua; ±: desviación estándar; M: Cepas de nematodos.

De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de la investigación se determinó la susceptibilidad de nematodos entomopatógenos a dimetil sulfóxido al 5%.
Ferreira *et al*. (2011) evaluaron las propiedades mosquicidas del timol en combinación con DMSO contra huevos y adultos de *B. similaris*. Realizaron tratamientos en combinación y el testigo con DMSO al 1% en 160 huevos de 10 días y 160 jóvenes de 30 días. Los resultados del testigo con DMSO mostraron una susceptibilidad del 10%. El anterior estudio denota baja susceptibilidad a comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio,

probablemente porque *B. similaris* no se encuentra en constante contacto con dimetil sulfóxido a diferencia de los nematodos entomopatógenos aislados de suelos pecuarios.

Son-de Fernex *et al*. (2016) determinaron y evaluaron la actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra *C. punctata*. Utilizaron 100 huevos/200 µl en una placa de 24 pozos con sus respectivos tratamientos y un testigo de DMSO al 2.5%, con 4 repeticiones para cada dosis y se incubaron a 27°C por 48 horas, obteniendo así una susceptibilidad de 4.71% en el testigo de DMSO. En este estudio al igual que el anterior se obtiene susceptibilidad a DMSO, sin embargo, fueron menores de los resultados obtenidos en el presente estudio, probablemente debido a que se evaluó el efecto ovicida y no el daño al nematodo infectivo.

CONCLUSIONES

Existe susceptibilidad de nematodos entomopatógenos de suelos a DMSO al 5 %.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por abrirme sus puertas en el ámbito académico y por apoyarme en la participación en el Verano Regional del Centro.

BIBLIOGRAFÍA

Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., Von Samson, G. H. (2010). Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectine in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* 174:58-64

Ferreira, P., Soares, G. L. G., D'avila, S., De Almeda, B. E. C. (2011). The influence of thymol+DMSO on survival, growth, and reproduction of *Bradybaena similaris* (Mollusca: Bradybaenidae). *Sociedade Brasileira de Zoología* 28 (2): 145-150

Huang, Y., Cartlidge, R., Walpitagama, M., Kaslin, J., Campana, O., Wlodkowic, D. (2018). Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. *Science of the Total Environment* 615: 107-114

Joshephsen, J. (2018). Diaminehalogenoplatinum (II) complex reactions with DMSO. *Inorganica Chimica Acta* 478: 54-58

Son de Fernex, E. V., Alonso, D. M. A., Mendoza, G. P., Valles, M. B., Zamilpa, A., González, C. M. (2016). Actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra el nematode gastrointestinal *Cooperia punctata*. *Veterinaria México* 3(2): 1-15

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DURANTE LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR CEPAS FÚNGICAS

Oscar Guadalupe Castillo Martínez[1], Fernando Martínez Armenta[1] y Varinia López Ramírez[2]

RESUMEN

La contaminación por metales pesados en México es un problema debido a su uso y generación en diversas actividades industriales. La curtiduría es la principal fuente de contaminación por cromo en Guanajuato, debido al uso de sales de este metal para el procesamiento de pieles. En este estudio se evaluó la capacidad de tolerancia a cromo y la cinética de crecimiento por parte de un aislado fúngico M008. La cepa M008 tolera y es capaz de desarrollarse en presencia de cromo (800 µM-5 mM), sin embargo, al aumentar la concentración de cromo su fase de adaptación al medio es mayor. El aislado M008 resulta un buen candidato para evaluar su tolerancia y remoción a cromo, en consorcio y su posible aplicación a técnicas de biorremediación.

ABSTRACT

Heavy metal pollution in Mexico is a problem due to its use and its production at different industrial activities. Tannery is the main source of chromium contamination in Guanajuato, due to the use of chromium salts for the skins processing. In this study, we evaluated the chromium tolerance capacity and the growth kinetics of a fungal isolate M008. The strain M008 was able to grow in the presence of chromium (800 µM-5mM), however, increasing the chromium concentration prolongs its adaptation phase to the medium. The isolate M008 is a good candidate to evaluate its tolerance and removal to chromium, in consortium and its possible application to bioremediation techniques.

Palabras clave: Tolerancia, remoción, hongos, metales pesados, cromo

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son contaminantes tóxicos para el ambiente por tener efectos nocivos a nivel de toda la cadena trófica, en especial el Cd, Cr y Hg son relevantes debido su persistencia y toxicidad (Beltrán & Gómez, 2016). La contaminación por metales pesados en México es un problema que va en aumento debido a la actividad antropogénica, específicamente la minería. Los metales contaminantes más importantes en México, dada su toxicidad y abundancia son: mercurio, arsénico, plomo y cromo (Covarrubias & Peña, 2017). Los organismos vivos se encuentran expuestos en la naturaleza a los metales pesados en sus formas ionizadas, mismos que ejercen efectos tóxicos sobre éstos. Dicha exposición a los metales selecciona y mantiene variantes microbianas capaces de tolerar sus efectos nocivos (Cervantes *et al.*, 2006). El cromo es un metal pesado que puede encontrarse en diferentes formas en la naturaleza, dependiendo de su estado de oxidación. Las formas químicas más comunes son el Cr (0), Cr (3+) y Cr (6+), siendo este último su forma más tóxica (ATSDR, 2012). Distintos mecanismos de resistencia a estos efectos tóxicos han sido identificados en especies bacterianas, protistas y en hongos (Cervantes *et al.*, 2006). En el presente trabajo se evaluó la capacidad de tolerancia a cromo y la cinética de crecimiento del aislado fúngico M008 de la colección del Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del ITESI, para su posterior aplicación en consorcio y evaluar la posible capacidad de remoción de cromo en medio líquido.

MÉTODOS Y MATERIALES

I. Preparación de soluciones stock

Se preparó una solución madre de dicromato de potasio a 0.5 M y posteriormente se esterilizó por filtración.

II. Cinética de crecimiento

Se prepararon frascos de vidrio con 30 mL de Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) con tres diferentes concentraciones de cromo (800 µM, 3 mM y 5 mM), 24 frascos por cada concentración de cromo, y se inocularon con el aislado

[1]Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. ocastillo206@gmail.com

[2]Coordinación de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carretera Irapuato-Silao km. 12.5 C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. valopez@itesi.edu.mx

M008, también se realizaron controles con inoculo y sin concentración de cromo y además tres controles de metal (uno por cada concentración de cromo) los cuales solo contenían CDS y cromo. Se dividieron los 24 frascos en 8 tiempos de medición, cada tiempo con su respectivo control y 3 réplicas. Las mediciones de biomasa se realizaron cada 48 horas, por la técnica de peso seco. Al termino de las 8 mediciones se graficaron los resultados de crecimiento de biomasa para observar la cinética de crecimiento del hongo con y sin estrés por cromo.

III. Técnica de Peso seco

Se pesaron 15 piezas de papel filtro con un diámetro de 6 cm y se realizó un promedio para hacer la diferencia de peso entre la biomasa y el papel filtro de las muestras. Las muestras se filtraron a vacío en un filtro con tamaño de poro estándar, después de ser filtradas se colocaron en una termobalanza y se puso en funcionamiento el equipo, se registró el peso de la muestra (peso seco).

RESULTADOS

A continuación, se muestra la cinética de crecimiento del aislado M008 en medio líquido con cromo 800 µM.

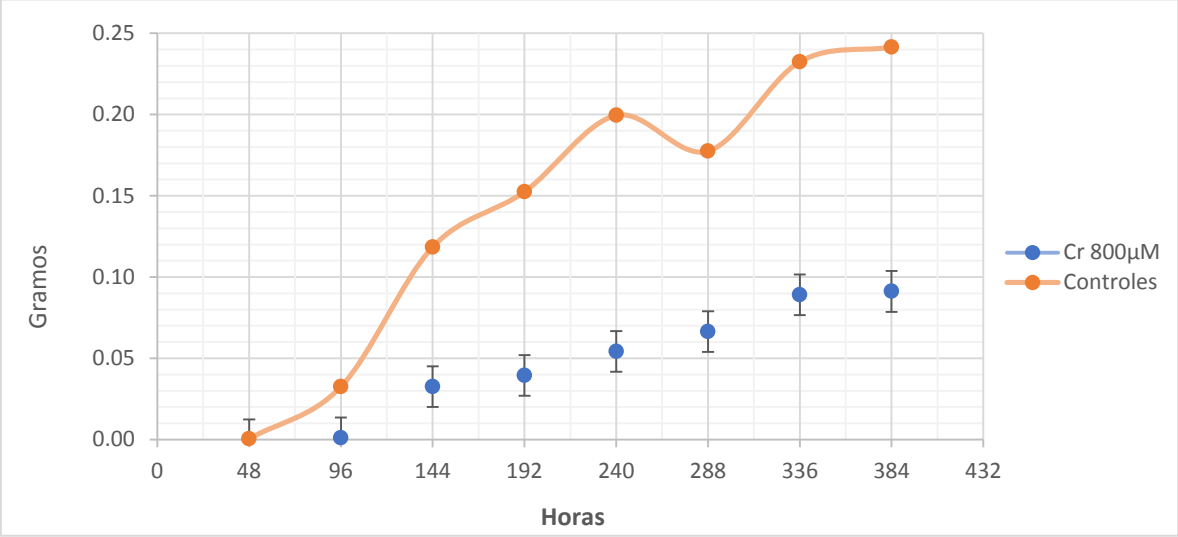


Figura 7. Cinética de crecimiento del aislado M008 en presencia de cromo 800 µM por técnica de peso seco

En la Figura 1, se observa la cinética de crecimiento de M008 por la técnica de peso seco, con 8 puntos de medición en intervalos de 48 horas, se observa que la fase exponencial en los controles comienza inmediatamente a las 48 horas de crecimiento, en cambio en los tratamientos con cromo esta fase comienza hasta las 96 horas, esto indica que la fase de adaptación es más amplia cuando existe cromo en el medio. El comienzo de la fase estacionaria se observa a las 336 horas en los controles y en los tratamientos con cromo, sin embargo, el punto 6 (288 horas) en los controles se desfaso y esto puede ser debido a un error de operación de la técnica. La fase de muerte no se aprecia en la Figura 1, por lo que son necesarios más puntos de evaluación.

La cinética de crecimiento de M008 por la técnica de peso seco se muestra en la Figura 2.

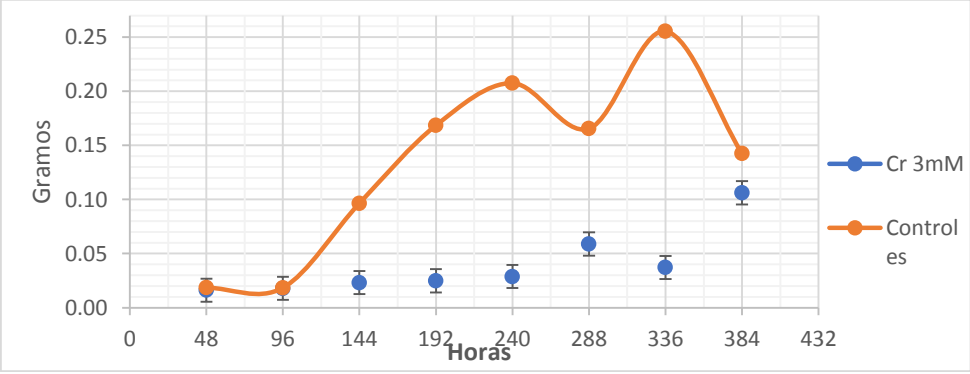


Figura 8. Cinética de crecimiento del aislado M008 en presencia de cromo 3 mM por técnica de peso seco

La cinética de crecimiento consta de 8 puntos de medición cada 48 horas, se observa que la fase exponencial en los controles comienza a las 96 horas de crecimiento, en cambio en los tratamientos con cromo esta fase comienza hasta las 240 horas, esto indica que la fase de adaptación es prolongada en presencia de cromo. El comienzo de la fase estacionaria en el medio sin metal se observa a las 288 horas de incubación, sin embargo, esto no puede ser aseverado debido a que este punto esta desfasado y esto pudo ser debido a un error de operación, en los tratamientos con cromo no se observa fase estacionaria debido a que el crecimiento de biomasa en presencia de cromo es menor en comparación con el control. Por otra parte, en el medio sin metal se observa que el inicio de la fase de muerte a las 336 horas de crecimiento y en los tratamientos no se aprecia este comportamiento, para lo cual, serían necesarios un mayor número de evaluaciones.

En la Figura 3 se muestra la cinética de crecimiento de M008 en presencia de cromo 5 mM por la técnica de peso seco,

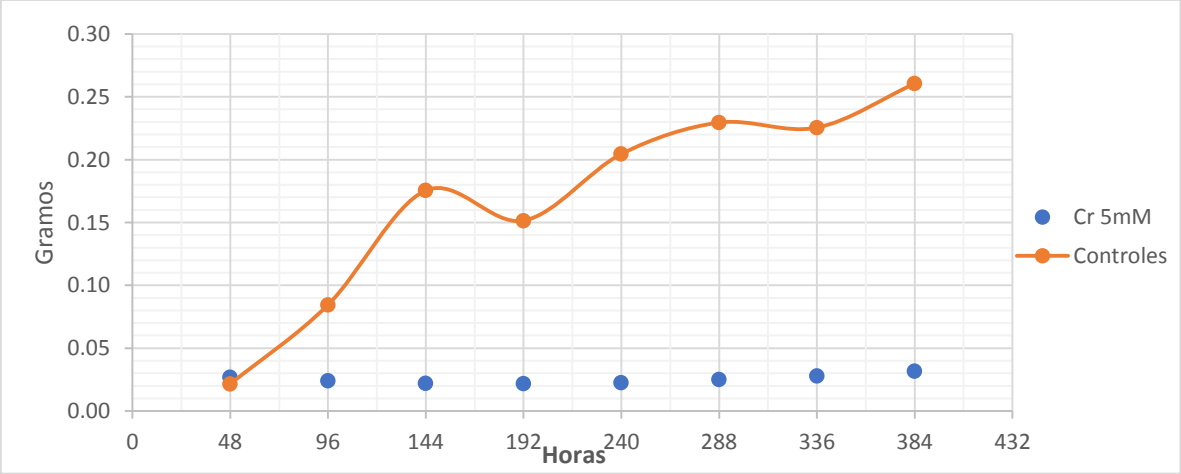


Figura 9. Cinética de crecimiento del aislado M008 en presencia de cromo 5 mM por técnica de peso seco

La cinética de crecimiento consta de 8 puntos de medición uno cada 48 horas, se observa que la fase exponencial en los controles comienza a las 48 horas de crecimiento, en cambio en los tratamientos con cromo esta fase no se observa, esto indica que la fase de adaptación es muy prolongada a 5 mM de cromo. El inicio de la fase estacionaria no se observa en presencia de cromo. El comportamiento de la cinética de los tratamientos con cromo puede deberse a la alta concentración de este metal en el medio, la cepa tolera esta concentración pero su crecimiento no es significativo.

DISCUSIÓN

La tolerancia a cromo y el empleo de aislados fúngicos para su remoción ha sido reportado previamente (García *et al.*, 2017), sin embargo, las concentraciones que se han empleado están por debajo de las empleadas (300-1000 µg/mL) en este trabajo (800 µM, 3 mM y 5 mM). La cepa M008 utilizada en este trabajo no fue aislado de un sitio contaminado a diferencia de las cepas reportadas por García *et al*. (2017), y presenta un gran potencial de tolerancia a este metal pesado. Por otra parte, Levinskaitė (2002) en su trabajo, reportó hongos aislados de suelo con capacidad de tolerancia a Cr^{6+} [0.2-2 mM], de los géneros *Acremonium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rizhopus sp.*, *Talaromyces sp.* y *Trichoderma sp*. Los diferentes mecanismos descritos para explicar la tolerancia de los hongos frente Cr^{6+}, involucran mecanismos extracelulares, intracelulares, biosorción, reducción directa e indirecta, biotransformación, transporte y bioacumulación. Por su parte, Beltran & Goméz (2016) sugieren que la quelación puede ser un mecanismo alternativo de algunos aislados para tolerar Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg). En nuestro caso, es probable que el aislado M008 presente algunos de estos mecanismos frente a estrés por cromo, la determinación del tipo de mecanismo involucrado se propone para posteriores estudios con este aislado, así como la aplicación de técnicas de Espectroscopía de Absorción Atómica y análisis de ICP-masas para determinar y poner de manifiesto si este aislado remueve el cromo del medio y determinar si dicho proceso lo realiza por algún mecanismo en específico como bioacumulación, quelación o reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} y puntualizar su aplicación en biorremediación.

CONCLUSIONES

La cepa M008 tolera y es capaz de crecer en concentraciones de 800 µM, 3 y 5 mM, sin embargo, conforme aumenta la concentración de cromo en el medio su metabolismo se ve afectado y esto se refleja en la cinética de crecimiento por peso seco al prolongarse la fase de adaptación. Este fenómeno es más evidente comparando la cinética de crecimiento a 800 µM con la de 5 mM dado que en la concentración de 5 mM todas las mediciones recaen en fase de adaptación. La evaluación del mecanismo por el cuál el aislado M008 es capaz de desarrollarse en presencia de metales pesados sera objeto de nuevos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

ATSDR (2012). ToxFAQs for Chromium. Agency for toxic substances and disease registry [en línea]. http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts7.pdf (fecha de consulta: 05/08/2018)

Beltrán M. y Gómez A. (2016). "Biorremediación de metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: una revisión, 1900-4699" *en Facultad de Ciencias Básicas*, Núm. 2, Vol. 12, [pp 172-197]. DOI: 10.18359/rfcb.2027

Cervantes C., Espino A., Acevedo F., León I., Rivera M., Rodríguez M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez J., Rodríguez J., Moreno R. (2006). "Interacciones microbianas con metales pesados" *en Revista Latinoamericana de Microbiología*, Núm. 2, Vol. 48, Abril - Junio. [pp. 203 – 210].

Covarrubias S. & Peña J. (2017). "Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación" *en Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol.33, [pp 7-21]. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.01

García M., Villareal J. & Garza M. (2017). "Metallophilic fungi research: an alternative for its use the biorremediation of hexavalent chromium, 2023-2038" *en Intrnational Journal of Environmental Science and Technology*, Núm. 9 , Vol. 14 , [pp 2023-2038]. DOI: 10.1007/s13762-017-1348-5

Levinskaitë L. (2002). "Response of soil fungi to chromium (VI), 0235-7224" *en Ekologija* Núm.1, [pp 10-13].

DETECCIÓN DE *Listeria spp.* Y *Salmonella enterica* EN FRESAS DE IMPORTACIÓN PROVENIENTES DE ESTADOS UNIDOS DE AMERICA EN MÉXICO

Osvaldo Castañeda Martínez[1] y Dr. Gerardo Manuel Nava Morales[2]

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de *Salmonella enterica* y *Listeria* spp. en fresas importadas de EE.UU. y expedidas en centros comerciales de Querétaro, México. *S. enterica* es uno de los patógenos más importantes causantes de gastroenteritis por vía alimentaria. Por otro lado, *Listeria* spp causa una zoonosis poco frecuente en humanos, pero extremadamente grave. El muestro de fresas se realizó en la Cd. de Querétaro en 10 diferentes supermercados. Para el aislamiento de los patógenos se utilizaron medios de pre-enriquecimiento, enriquecimientos y agares selectivos. Se detectó la presencia de *S. enterica* y *Listeria* spp. en las muestras analizadas. Estos resultados indican que las fresas importadas de EE.UU. son una potencial fuente de estos patógenos para los consumidores mexicanos.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the presence of *S. enterica* and *Listeria* spp. in commercial strawberries produced in the USA, imported and retailed in Querétaro, Mexico. *S. enterica* is an important pathogen and causes the most common intestinal infections transmitted by food. On the other hand, *Listeria* spp causes Listeriosis, a rare zoonosis in humans, but extremely serious disease. The microbiological analysis of strawberries was carried out in Querétaro city, in 10 different supermarkets. Pre-enrichment, enrichments and selective media were used to determine the presence these pathogens. *S. enterica* and *Listeria* spp was detected in strawberries imported from USA and retailed in Mexico. These results indicate that imported berries could represent an important source of these pathogens.

Palabras clave: Fresas, *Salmonella, Listeria,* Contaminación

INTRODUCCIÓN

Los Miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han expresado su preocupación por mejorar la inocuidad de los alimentos (FAO/WHO, 2004). Más de 200 enfermedades conocidas son transmitidas mediante alimentos (FL., 1982). Las causas de las enfermedades transmitidas por los alimentos incluyen virus, bacterias, parásitos, toxinas, metales y priones, y los síntomas de las enfermedades transmitidas por alimentos van desde gastroenteritis leves hasta síndromes neurológicos, hepáticos y renales potencialmente mortales. En los EE.UU., se estima que las enfermedades transmitidas por los alimentos causan entre 6 y 81 millones de enfermedades y hasta 9,000 muertes cada año (Archer DL, 1985).

Entre las principales bacterias patógenas se encuentra *Listeria monocytogenes* bacteria Gram-positiva intracelular que ha sido implicado en la última década en varios brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. La listeriosis, con una tasa de mortalidad de alrededor del 24%, se encuentra principalmente en mujeres embarazadas, sus fetos y personas inmunodeprimidas, con síntomas de aborto, muerte neonatal, septicemia y meningitis (Peterkin, 1991). Otro patógeno importante es *S. enterica* el cual constituye un género de bacterias, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, integrado por células en forma de bacilo, no esporuladas y habitualmente móviles mediante flagelos perítricos. Son bacterias Gram-negativas, de metabolismo anaerobio facultativo, que reducen los nitratos a nitritos y que fermentan la glucosa produciendo ácido y gas (León-Velarde, 2012). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que *S. enterica* causa 1 millón de enfermedades transmitidas por los alimentos cada año en los Estados Unidos. Durante los últimos años, los brotes de la enfermedad de *S. enterica* se han

[1]Universidad Autónoma de Aguascalientes. Departamento de Química. Av.Universidad #940, Ciudad Universitaria, CP:20131, Aguascalientes, Ags. México. Email: Osvi1901@gmail.com
[2]Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas, Centro Universitario, C.P.76010, Querétaro, Querétaro, Email:gerardomnava@gmail.com

relacionado con pepinos, pollo, huevos, pistachos, atún crudo, brotes y muchos otros alimentos contaminados (CDC, 2018). Entre ellos se encuentra la fresa, siendo un alimento perecedero que recibe un procesamiento nulo o mínimo (Hazards, 2014). Las bacterias entéricas pueden aparecer en la superficie de las frutas en determinadas circunstancias, especialmente si ha habido una exposición directa o indirecta reciente a la contaminación microbiana (Carlos A. Gomez Aldapa, 2017). Las fresas frescas se han asociado con enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por *E. coli* O157: H7 y *S. enterica* (Carlos A. Gomez Aldapa, 2017). Por lo tanto, es fundamental conocer la calidad microbiológica de las fresas que se expenden en México. El objetivo del presente estudio fue investigar la presencia de *S. enterica* y *Listeria* spp en fresa de importación proveniente de EE. UU. en supermercados locales en estado de Querétaro, México.

MÉTODOS Y MATERIALES

Recolección de fresas: Fresas, frescas y maduras empaquetadas importadas de EE.UU. fueron adquiridas en 10 supermercados locales en Querétaro (2 muestras por local). Las fresas fueron manejadas en condiciones asépticas y transportadas al laboratorio el mismo día de la compra.

Aislamiento de *S. enterica*: Se utilizaron fresas completas pesando 200±2g por duplicado de cada muestra después colocándolas en 200 mL de agua peptonado bufferada (BWP) como caldo de pre enriquecimiento en bolsas estériles, incubadas durante 18-24 hrs. Posteriormente se inoculo 1ml y 0.1ml de BWP, en caldo Tetrationato con Novobiocina y Rappaport-Vassiliadis con Novobiocina como caldos de enriquecimiento, incubados a 42°C±2°C y 35±2°C respectivamente por 18-24 hrs. Se cultivó en agar XLD y Hektoen como medios selectivos, se incubaron a 37°C±2°C durante 18 hrs. Finalmente se recolectaron las colonias, en el agar Hekton se observaron colonias verdes claras, convexas y con precipitado negro por la producción de sulfuro de hidrógeno, mientras que en el agar XDL se observaron colonias rojas con centro negro. A continuación se transfirieron a Caldo Soya Tripticaseina y se incubaron a 35±2°C por 24 horas. Finalmente se almacenaron los aislamientos con glicerol para posteriores análisis mediante métodos moleculares.

Aislamiento de *Listeria* spp: Se utilizaron fresas completas pesando 200±2g por duplicado de cada muestra después colocándolas en 200 mL de agua peptonada bufferada (BWP) como caldo de pre enriquecimiento en bolsas estériles incubadas durante 18-24 hrs. Se procedió posteriormente a inocular en caldo Fraser más 15g de agar por litro y se incubaron a 37°C±2°C durante 18-24 hrs. Finalmente se recolectaron las colonias color azul-verdoso con halo opalescente, a continuación se transfirieron a Caldo Soya Tripticaseina y se incubaron a 35±2°C por 24 horas. Finalmente se almacenaron los aislamientos con glicerol para posteriores análisis mediante métodos moleculares.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Al llevar a cabo el muestreo en los diferentes supermercados se observó que de las 40 muestras seleccionadas, 2 muestras fueron positivas a *S. enterica*, representando una prevalencia del 5.0%. En el caso de *Listeria* spp, 7 muestras resultaron positivas al patógeno, lo que representa una prevalencia del 17.5%. La presencia de estos organismos se puede deber a que las plantas de fresas pueden cultivarse en suelos o cultivos sin suelo en entornos protegidos o en campos abiertos, además son usualmente cosechados manualmente y, para evitar daños mecánicos, se pueden recoger directamente y colocar en su final embalaje (EFSA,2014).

En el caso de *S. enterica* esta se desarrolla en rangos de temperatura de 7°C-45°C, pH 4.5-9.5 y a una actividad acuosa de 0.94-1.00 (D'Aoust, 1997), dado que la fresa contiene un pH ligeramente ácido no es común la presencia de *S. enterica*. Una investigación llevada a cabo por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), detectó la presencia de *S. enterica* en uno de 143 muestras de fresas importadas, lo cual representa un 0.6% de prevalencia. En general, la prevalencia *de S. enterica* en las frutillas es baja; sin embargo, los resultados deben interpretarse con precaución ya que solo se ha probado un número limitado de muestras.

Por otro lado *Listeria* spp se encontró con mayor prevalencia en la fresas esto ha sido relacionado a estudios recientes donde se ha demostrado la presencia de *Listeria* spp en alimentos, un ejemplo se observó en estudio realizado por Sánchez y colaboradores reportaron la presencia de L. *monocytogenes* en 2% de las muestras de alimentos preparados de una planta congeladora en Nuevo León (Sánchez FJ, 2006). Un aspecto de importancia para el crecimiento de L. *monocytogenes* es que el rango de temperaturas de -1.5°C-45°C, así como en un rango de pH que es de 4.0-9.6, por otra parte parece ser relativamente tolerante a las condiciones ácidas (Lado B, 2007) además así mismo Flessa y colaboradores demostraron que la supervivencia de *L. monocytogenes* en las superficies de las fresas es generalmente

mejorado cuando las temperaturas de almacenamiento son reducido a 10°C- 8°C (Flessa S., 2004); también se ha visto que *Listeria* spp tiene la facultad de adherirse a las superficies, formando biopelículas para protegerse de la acción de los tratamientos antimicrobianos (Muñoz, 2011) ya que la fresa se encuentra en constante refrigeración y pasa por un mínimo proceso de desinfección esto aumenta la probabilidad de crecimiento de *Listeria* spp.

En base a los resultados obtenidos se hace referencia a que algunos factores involucrados en la contaminación en frutillas son las condiciones climáticas particulares, el uso de aguas residuales contaminadas agua agrícola, ya sea para riego o para la aplicación de productos químicos agrícolas tales como fungicidas y contaminación así como por contaminación cruzada por cosechadores, manipuladores de alimentos y equipo en la cosecha o después de la cosecha (EFSA, 2014). Ya que existen estos problemas de contaminación han surgido una variedad de brotes en frutillas durante los últimos años como se observa en la siguiente tabla.

Bayas	**Forma**	**Lugar de origen**	**Patógeno**	**Año**	**Localización del brote**	**Número de casos (muertes)**	**Aislamientos/ detectados en el producto**
Arándano	Fresca	Nueva Zelanda	Hepatitis A	2002	Nueva Zelanda	43 (1)	Si
Arándano	Fresca	NR	*Salmonella Muenchen*	2009	Estados Unidos	14 (0)	NR
Arándano	Fresca	Estados Unidos	*Salmonella Newport*	2010	Estados Unidos	6 (0)	NR
Frambuesa	Fresca	Guatemala	*C.cayetanesis*	1996	Estados Unidos	850 (0)	No
Frambuesa	Fresca	Guatemala	*C.cayetanesis*	1997	Estados Unidos	1012 (0)	No

Tabla 4 Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas con bayas comunes como vehículo alimenticio, (M. Palumbo, 2013)

Dado que los alimentos importados pasan por estrictas normas de salubridad se esperaría que no estuvieran contaminados; sin embargo como se determinó en el presente estudio los agentes patogénicos se encontraron presentes debió a esto es importante realizar este tipo de estudios para determinar la prevalencia de organismos patógenos en los alimentos y aplicar acciones correctivas para la disminución de los mismos.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró la presencia de agentes patológicos como son *S. enterica* y *Listeria* spp en fresas importadas de EE.UU, dados los resultados obtenidos se puede hacer mención que las fresa es una importante fuente de transmisión de estos patógenos, además es de importancia realizar este tipo de estudios ya que nos brinda información acerca de dónde pueden surgir brotes e identificar el sitio de origen de donde previenen de igual nos ayuda a la realización de actividades preventivas en contra de brotes que puedan surgir posteriormente.

AGRADECIMIENTOS

Al comité organizador del 20° Verano Regional de la Ciencia Región Centro por la oportunidad y la beca otorgada. A la Universidad Autónoma de Querétaro por aceptar mi participación en el 20° VCRC. Al Dr. Gerardo Manuel Nava Morales por la atención y por permitirme trabajar en el laboratorio. A Lupita y Fernanda por su ayuda, paciencia, tiempo y atención recibida a lo largo del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Archer DL, K. J. (1985). Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States . *Food Protect* , 94.

Carlos A. Gomez Aldapa, E. R. (2017). Survival of foodborne bacteria on strawberries and antibacterial activities of Hibiscus sabdariffa extracts and chemical sanitizers on straberries. *Journal of Food Safety*, 1-8.

CDC. (18 de 07 de 2018). *Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades* . Obtenido de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades : https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/salmonella/index.html

D'Aoust, J. (1997). *Salmonella species spp. In Food Microbiology: Fundamental and Frontiers.* USA: ASM press.

Dergal, S. B. (2006). *Quimica de los Alimentos.* Mexico: Pearson Educación.

FAO/WHO. (2004). Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods. Interpretative summary. *M ICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT SERIES 4*, 13-18.

FL., B. (1982). Diseases transmitted by foods. *Atlanta Centers for Disease Control* .

Flessa S., D. M. (2004). Survival of Listeria monocytogenes on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbology*, 255-262.

Gro S. Johannessen, K. F. (2015). Occurrence of Escherichia coli, Campylobcter, Salmonella and Shiga-Toxin Producing E.Coli in Norwegian Primary Strawberry Production . *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6919-6932.

Hazards, E. P. (2014). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries). *European Food Safety Authority, 12*, 29-31.

Lado B, Y. A. (2007). *Listeria, listeriosis and food safety.* CRC Press Taylor & Francis Group.

León-Velarde, O. J. (2012). *Salmonella Detection Methods for Food and Food Ingredients, Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen.* InTech.

M. Palumbo, L. J. (2013). Outbreaks of Foodborne Illness Associated with. *Food Science and Human Nutrition Department*.

Muñoz, I. M. (2011). Presencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessende supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomedica*, 428- 439.

Peterkin, J. M. (1991). Listeria monocytogenes, a Food-Borne Pathogen. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 476-511.

Sánchez FJ, M. V. (2006). Incidencia de especies de Listeria en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL* , 51-56.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN POR HONGOS ENDÓFITOS EN PLANTAS DE PHASEOLUS VULGARIS

Rafael Cano Segura y Adán Topiltzin Morales Vargas

RESUMEN

Los hongos endófitos son microorganismos que viven en asociación con plantas la mayor parte o todo su ciclo de vida, desarrollándose dentro de los tejidos internos sin causar algún síntoma de enfermedad. Los hongos endófitos confieren ciertos beneficios a la planta huésped y son responsables de la adaptación de las plantas frente a diferentes tipos de estrés tanto biótico como abiótico. El objetivo del proyecto fue inocular y recuperar distintos hongos endófitos en plantas de *Phaseolus vulgaris*. Se evaluó el efecto del hongo sobre las plantas midiendo: cantidad de hojas, altura y diámetro del tallo. Para comprobar que hubo colonización en la planta y que fuera el mismo hongo que se inoculó, se hizo un tratamiento microbiológico para recuperar el hongo de raíz y hoja, colocando trozos de estos en medio PDA y así observar crecimiento y morfología del hongo, para posteriormente compararlo con el que se inoculo. El experimento se llevó a cabo en las áreas verdes de la Universidad de Guanajuato campus Celaya Salvatierra, sede mutualismo. Se adaptó el espacio utilizando malla sombra y delimitando la zona para protegerlo de las lluvias. Como diseño experimental se empleó bloques al azar con 6 repeticiones por cada Hongo endófito. El análisis indicó que el hongo H-9 tuvo mayor efecto sobre la altura y trifolios en contraste, H-mov2 tuvo la menor altura y diámetro, los demás no tuvieron diferencias significativas con el control. Se comprobó que hubo colonización con los mismos hongos que se inocularon.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live in association with plants for most or all their life cycle, developing inside the internal tissues without causing any symptoms of disease. Endophytic fungi confer certain benefits to the host plant and are responsible for the adaptation of plants to different types of stress, both biotic and abiotic. The objective of the project was to inoculate and recover different endophytic fungi in plants of Phaseolus vulgaris. The effect of the fungus on the plants was evaluated by measuring: number of leaves, height and diameter of the stem. To evaluated that there was colonization in the plant and that it was the same fungus that was inoculated, a microbiological treatment was done to recover the root and leaf fungus, placing pieces of these in PDA medium and thus observe growth and morphology of the fungus, for later compare it with the one that was inoculated. The experiment was carried out in the green areas of Universidad de Guanajuato campus Celaya Salvatierra, sede mutualismo. The space was adapted using shade cloth and delimiting the area to protect it from the rains. As an experimental design, random blocks were used with 6 repetitions for each endophyte fungus. The analysis indicated that the fungus H-9 had greater effect on height and contrasting trifolium, H-mov2 had the lowest height and diameter, the others had no significant differences with the control. It was found that there was colonization with the same fungi that were inoculated.

Palabras Clave: endófito, inoculación, *Phaseolus vulgari*s, colonización**.**

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza todo organismo vivo está en interacción con distintas comunidades de diferente especie, por ello existen distintas asociaciones inter-específicas, estas asociaciones forman parte de las estrategias de los seres vivos para sobrevivir. Las plantas están en contacto, con diversas comunidades de hongos y bacterias, por lo que han desarrollado distintas asociaciones, el tipo de interacción depende de las condiciones en las que se encuentre el organismo y su capacidad de colonizar los tejidos (Abello y Kelemu, 2007). El termino endófito se refiere a todo hongo y/o bacteria capaz de colonizar los tejidos de la planta y pasar la mayor parte de su ciclo vital sin causar daño visible a la planta. Se conocen dos tipos de transmisión de los hongos endófitos en base a su forma de vida: transmisión vertical y transmisión horizontal (Saikkonen et al., 1998). La más común es la transmisión horizontal, sucede mediante la producción de esporas externas y su consiguiente dispersión en el aire para colonizar otras plantas. Con menor frecuencia se produce la transmisión vertical, cuando la semilla es colonizada por el hongo y de esta manera se transmite a la nueva planta. Los hongos endófitos tienen diversos efectos sobre la planta: como inducir factores relacionados con procesos de resistencia a plaga y estrés abiótico, mejora de crecimiento y protección ante otros patógenos.

1.-Universidad de Guanajuato, División de ciencias de la salud e ingenierías; Mutualismo 303, colonia .suiza, C.P:38060, Celaya, Gto, rafael_cano_segura@hotmail.com
2.-Universidad de Guanajuato, División de ciencias de la salud e ingenierías; Mutualismo 303, colonia .suiza, C.P:38060, Celaya, Gto,adan.tops@gmail.com.
Estos microorganismos pueden pasar la mayor parte de su vida dentro del tejido de las plantas sin causar daño visible, pero un cambio en las condiciones puede volver al hongo patógeno para la planta. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diversos hongos endófitos sobre plantas de *Phaseolus vulgaris*.

MÉTODOS Y MATERIALES

Selección de semillas: Se utilizaron semillas de frijol pinto villa, se procuró seleccionarlos por tamaño uniforme y que visualmente no presentaran daños. Para asegurar su viabilidad, se coloraron en un vaso de precipitado de 1 litro con 700 ml de agua, las semillas que flotaban fueron descartados ya que presentaban daño.

Tratamiento de semillas e inoculación: Para asegurar la inoculación las semillas de frijol estas fueron sumergidas en un vaso de precipitado de 1 L con una solución de hipoclorito de sodio al 6% por un minuto y posteriormente colocados en una hoja de aluminio para secarse. Para el proceso de inoculación se usaron los siguientes materiales: solución de sacarosa al 30% m/v, tubos de plástico de 50 ml, Espátula drigalskyde, hojas de aluminio de 5 cm x 5cm, vaso precipitado de 50 ml, mechero, alcohol. Todo el material fue esterilizado con calor húmedo en una autoclave a una presión de 15 libras lo que permite que la cámara alcance una temperatura de 121ºC. El tiempo de esterilización fue de 15 minutos. El procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar para asegurar las condiciones estériles. Se colocó 30 ml de sacarosa a cada tubo de 50 ml para que cada tubo tuviera la cantidad necesaria para posteriormente esparcir al medio de cultivo la solución de sacarosa con el hongo endófito. Con la espátula drigalskyde se mezcló la sacarosa con las la superficie del medio de cultivo, asegurando que en la solución quedaran atrapadas el mayor número posible de esporas. Se vertió la sacarosa con esporas al tubo de 50 ml, con ayuda de pinzas estériles se colocaron seis semillas de frijol en él y se mezcló. Se retiró el sobrenadante dejando solo las semillas. Se colocaron las semillas en una hoja de aluminio y se hicieron dobleces para dar estructura de bolsa, el proceso se repite para cada hongo y al finalizar se dejaron secar las semillas inoculadas por 24 horas.

Esterilización de sustrato y macetas: Para el experimento se utilizó sustrato peat moss Para asegurar la inocuidad al sembrar, se esterilizó dentro de bolsas cerradas de plástico en una autoclave a 121 ° C y 15 libras de presión por 15 minutos. Se usaron macetas de plástico con capacidad de 1 litro y fueron lavadas con jabón comercial, después de enjuagarlas se rociaron con hipoclorito de sodio al 6%.

Tratamientos y diseño experimental: Se sembraron seis semillas inoculadas por tratamiento en macetas de plástico a 1.5 cm de profundidad. Se regó cada 3 días. Después de 4 semanas se midió la altura de la planta de base al ápice con ayuda de un flexómetro, para el diámetro de tallo se utilizó un vernier y se contabilizaron los trifolios. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar para analizar los datos.

Análisis estadístico: Las variables respuesta: altura, diámetro y trifolios, estos datos fueron analizados mediante el uso del software estadístico Infostat, para evaluar diferencias estadísticas entre tratamientos.

Procesamiento de la planta para recuperar el hongo endófito: Para este procedimiento se usó: tarja de plástico, frascos de vidrio de 50 mL estériles, pinzas, bisturí, vaso precipitado de 50 ml, placa de vidrio de 30 cm x 20 cm, alcohol al 70%, hipoclorito de sodio al 6%, agua destilada estéril, medio PDA con antibiótico (cloranfenicol 0.1%), vaso precipitado de un litro, mechero y pipeta de 100 ml. Después de 21 días después de la siembra de las semillas se separó la planta de la maceta, y se limpió la raíz con agua para retirar el exceso de suelo, posteriormente se hizo un corte para separar la parte aérea de la raíz. El procedimiento para tejido de raíz y hoja es similar; pequeñas cantidades de muestra de raíces y hojas fueron sumergidas secuencialmente en solución de hipoclorito de sodio al 2.5% (5 min), etanol al 70% (5 min) y posteriormente sumergidas en tres lavados de agua destilada estéril. Las raíces y hojas desinfectadas fueron cortadas en pequeños segmentos (aproximadamente de 5 x 5 mm para hoja y 5 mm de largo para raíces) en área estéril y se colocaron en cajas Petri por separado en medio PDA. Para el control del procedimiento y técnica se manejaron 3 controles diferentes en medio PDA: 1. Control del ultimo lavado con agua destilada estéril (200 µL de muestra de agua de lavado). 2. Impresión del envés de la hoja en medio Sabouraud y 3. Las placas inoculadas fueron incubadas a 28°C. Las placas fueron monitoreadas día con día para observar el crecimiento de los

hongos endófitos de raíces y hojas. Después del tiempo de incubación los hongos que crecieron sobre los cortes de raíces y hojas fueron transferidos en nuevas placas con medio PDA.

RESULTADOS

Análisis estadístico de las variables: diámetro, altura y trifolios

La figura 1 recopila el análisis de varianza y comparación de medias en un histograma. Se aprecia que el tratamiento H-111 tuvo mayor efecto sobre el diámetro de la planta ya que como se planteó, los hongos endófito estimulan elicitores y compuesto que afectan al crecimiento de la planta, también hubo diferencia significativa entre H-112, H-15, H-3.H-9, H-32 respecto a H-MOV2 que al contrario de los demás tratamientos hizo que el diámetro de la planta fuera menor que la del control.

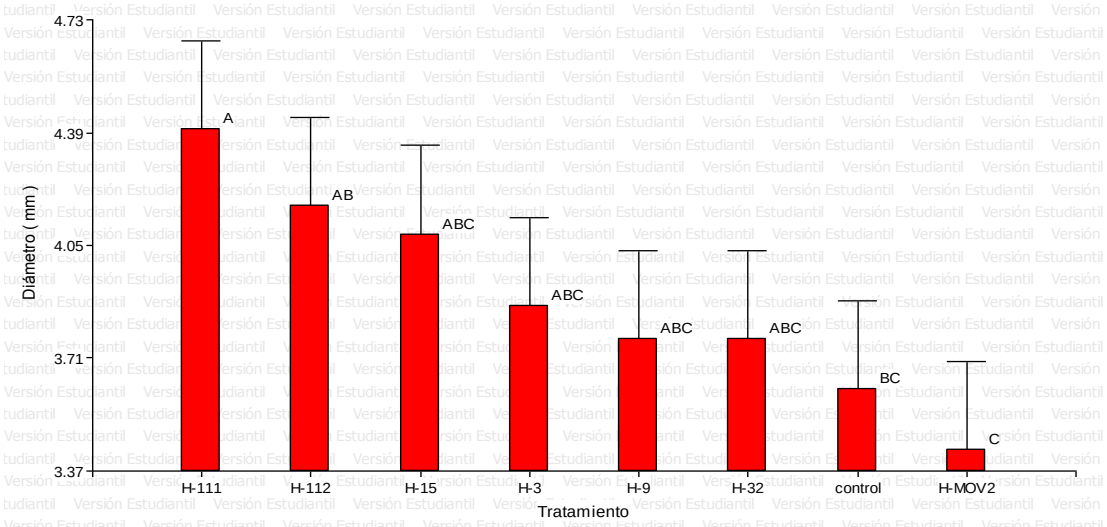


Figura 1. Histograma del análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos. Test de Duncan con (p>0.10).

En el histograma de la figura 2 se observa que el tratamiento H-9 y H-15 tuvieron diferencia significativa respecto al control en contraste con la figura 1, estos tratamientos no obtuvieron diferencias significativas en su diámetro. El tratamiento H-32 tuvo el menor número de trifolios.

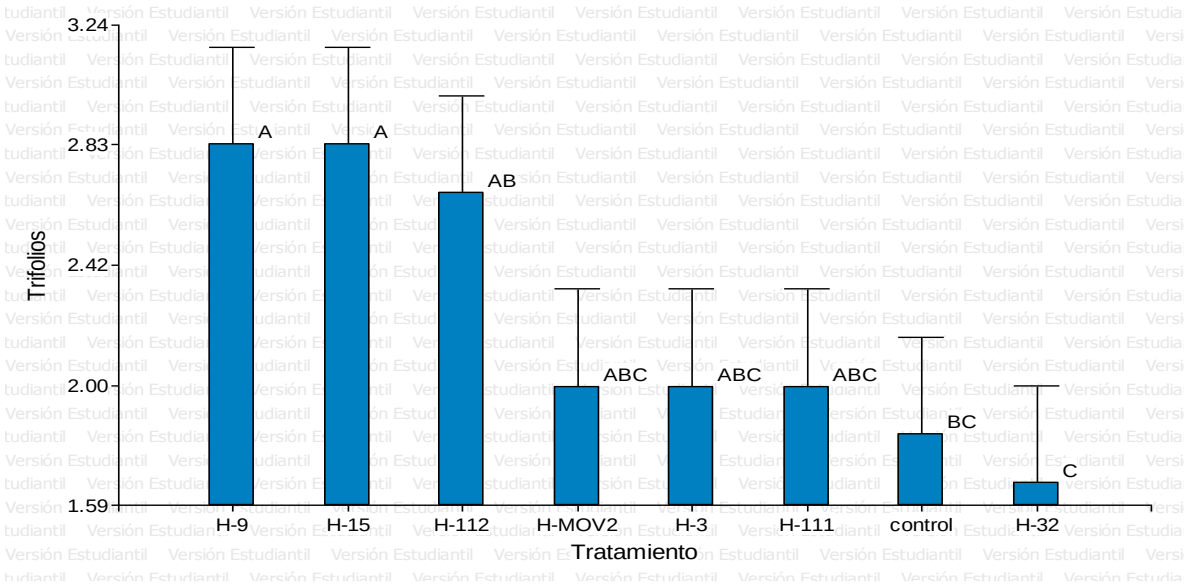


Figura 2. Histograma del análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos. Test de Duncan con (p>0.10).

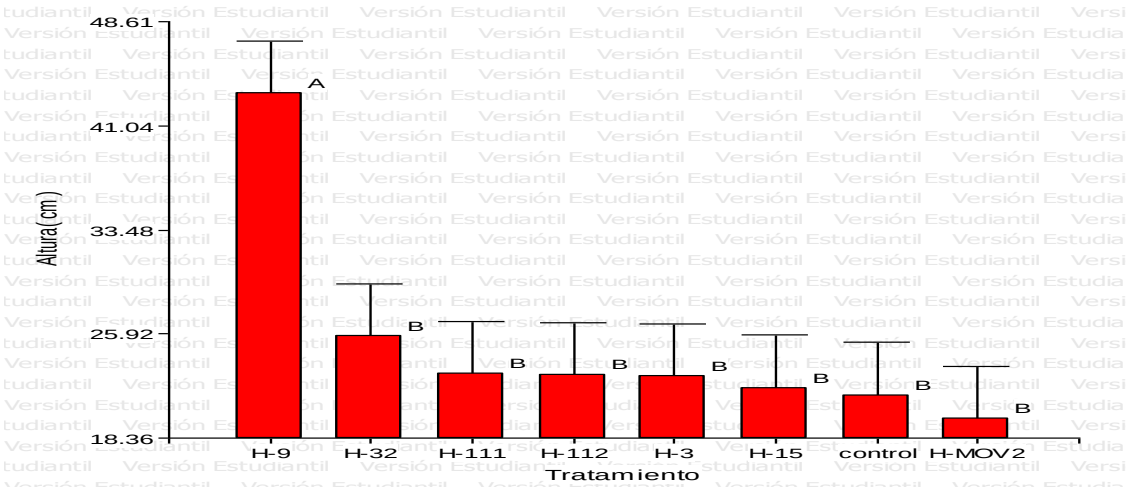


Figura 3. Histograma del análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos. Test de Duncan con ($p>0.10$).

La figura 3 indica que el tratamiento H-9 fue el único con diferencia significativa respecto a los demás tratamientos, obteniendo la mayor altura y en comparación con las otras variables obtuvo el mayor número de trifolios. El tratamiento con H-MOV2 demostró tener efecto contrario a los demás tratamientos ya que se obtuvieron alturas y diámetros menores al control. El tratamiento H-111 tuvo solo efecto en el diámetro pero no en la altura ni número de trifolios, cada hongo tuvo efecto diferente sobre alguna de las variables.

Comparación de hongos inoculados con los recuperados

La figura 4 muestra la comparación para verificar que sea el mismo hongo que se inoculó, se aprecia que las tonalidades y textura algodonosa del H-111 son similares. La tonalidad de H-114 que se inoculó es diferente al recuperado debido al tiempo y condiciones a las que se sometieron.

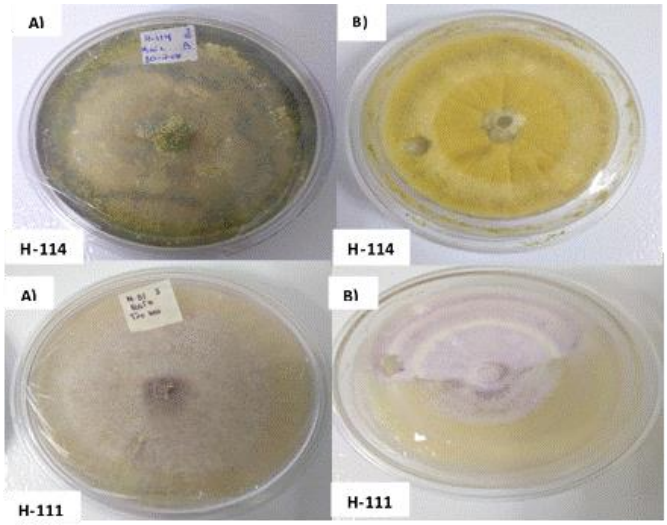


Figura 4. Características morfológicas de los hongos endófitos en medio PDA (A: recuperado, B: inoculado).

CONCLUSIONES

Los hongos endófitos tuvieron diversos efectos sobre la planta, siendo la colonización con H-9 y H-15 los más efectivos.H-9 y H-15 deberán ser caracterizados para su posible posterior estudio.

Cada hongo tuvo un efecto similar pero no igual entre ellos, destacando que algunos tenían poca altura pero diámetro y trifolios numerosos, o poco diámetro y altura pero número de trifolios mayores al control

La asociación resultó ser beneficiosa para la planta, a pesar de que las condiciones climáticas eran muy húmedas y favorables para el hongo, estos no se volvieron patógenos para la planta

BIBLIOGRAFÍA

Schulz,B.,Boyle,C.,& Siebrer,T.. (2004). Soil Biology Series. Alemania: Ajit Varma.

Recco,M,.Molina,G.,Paula,A.,Maróstica,M,P.,& Pastore,M,G.. (2010, Agosto 9). "The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process,". *Biotechnology Research International*, vol. 2011, 11. 2018,agosto 12, Hindawi.

Xiang,S & Liang-Dong, G (2012) Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, Mycology, 3:1, 65-76.

Abello, J. F., & Kelemu, S. (2007). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, *7*(2), 55-57. https://doi.org/10.21930/rcta.vol7_num2_art:70

BIOENSAYO CON CULTVO DE FRIJOL (PHASEOLUS VULGARIS) PARA LA EVALUACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

Nuñez Quintanilla Sandra Guadalupe[28] y Alcalá Jáuregui Jorge Alonso[29]

RESUMEN

Para determinar el impacto ambiental por medio de un bioensayo e indicadores de la calidad del suelo, se evaluaron los parámetros de temperatura, pH, conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales en suelo contaminado con Aceite vegetal, Aceite automotriz y Detergente. El análisis estadístico demostró que los tratamientos tienen un efecto sobre los indicadores de calidad, siendo el detergente el de mayor influencia en la mayoría de estos. La conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales fueron los parámetros con mayor variación. El agua residual derivado del tratamiento térmico y lavado del suelo no tuvieron efecto estadísticamente significativo sobre las variables agronómicas del cultivo debido a la baja concentración de contaminantes en el agua residual.

ABSTRACT

To determine the environmental impact by means of a bioassay and indicators of soil quality, the parameters of temperature, pH, electrical conductivity and total dissolved solids in soil contaminated with Vegetable oil, Automotive oil and Detergent were evaluated. The statistical analysis showed that the treatments have an effect on the quality indicators, being the detergent the most influential in most of these, where the electrical conductivity and total dissolved solids were the parameters with the greatest variation. The residual water derived from the thermal treatment and soil washing had no statistically significant effect on the agronomic variables of the crop due to the low concentration of pollutants in the wastewater.

Palabras clave: Calidad de suelos, Indicadores de calidad de suelos, Bioensayo.

INTRODUCCIÓN

La degradación de los suelos conlleva una disminución en la productividad y obtención de bienes afectando la calidad ambiental y estabilidad ecológica. (FAO). En México existen regiones donde la calidad del suelo se ve afectado, entre otros, por la degradación química del suelo a causa de la introducción de contaminantes provenientes de la actividad humana (SEMARNAT 2015). La calidad de suelo está definida según la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA, por sus siglas en inglés) como "la capacidad de un suelo para funcionar dentro de los límites del ecosistema para mantener la productividad biológica, mantener la calidad ambiental y promover la salud de las plantas y los animales", de igual manera la calidad de suelo es un indicio para determinar la salud de este y/o sus aplicaciones (Bautista et al., 2004). Para determinar la calidad de suelos, existen una gran variedad de indicadores que se basan en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (SQI 1996), sin embargo, hacer uso de los indicadores más representativos permite evaluar de manera rápida y costeable el análisis y el monitoreo de suelos (Estrada et al., 2017), especialmente de aquellos que tienen valor socioeconómico o que se ven afectados por la introducción de contaminantes derivados de la actividad industrial. Los indicadores de calidad de suelo dependen del uso que se le da, (SQI 1996) un cambio en los valores normales puede indicar riesgo asociado a la degradación de este recurso y/o a la influencia de contaminantes. Es importante determinar las características del suelo por medio de indicadores de calidad ya que dan un panorama amplio de la dinámica del agua y la interacción que tiene con la planta y los microorganismos (disponibilidad de nutrientes y agua), de igual manera, permite identificar el comportamiento del suelo cuando ha sido contaminado, lo que ayuda para elegir el mejor método de control y tratamiento.

Además de los análisis físicos y químicos, los bioensayos pueden ser de gran utilidad para determinar el impacto ambiental de los contaminantes. Los bioensayos son pruebas que determinan la influencia que tienen los contaminantes en la población o en la morfología de determinados organismos y son ampliamente usados en el monitoreo ambiental de suelos y aguas (Contero et al., 2006). Las plantas por lo general suelen ser los primeros

[28] Universidad de Guanajuato, Departamento de Agroindustrial, Av. Mutualismo Esq. Prol. Río Lerma S/N, 38060 Celaya, Gto., sandra.nu97 @gmail.com

[29] Universidad autónoma de San Luis potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Ejido Palma de la Cruz. C.P. 78321, San Luis Potosí, S.L.P. jorge.alcala @uaslp.mx

indicadores a usar especialmente cuando se encuentran en las primeras etapas de crecimiento debido a que en bajas concentraciones del contaminante o cuando estos se encuentran disueltos, tienen la capacidad de inhibir la germinación o bien la prolongación radicular (Torres 2003). El Frijol, de nombre científico *Phaseolus vulgaris*, es una especie perteneciente a la familia fabácea subfamilia papilionoideae (Singh et al., 1999). Se trata de una especie de gran valor socioeconómico, altamente adaptable y con crecimiento rápido, puede cultivarse en prácticamente todos los tipos de suelo (Sangerman et al., 2010) por lo que puede ser un buen bioindicador en la evaluación del impacto ambiental en suelos contaminados.
El presente trabajo tuvo como objetivo determinar, por medio de un bioensayo e indicadores de calidad de suelo, el impacto ambiental de los suelos contaminados.

MÉTODOS Y MATERIALES

Caracterización suelo agrícola. Se tomaron muestras de suelo agrícola dentro de las instalaciones de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad autónoma de San Luis Potosí; se secó durante 48 h al aire libre y se tamizó en un poro de 841 micrones. Para caracterizar el suelo, se midió Temperatura y pH con el equipo HACH modelo HQ40. En el suelo se determinaron los parámetros de sólidos disueltos totales (SDT) con unidades de ppm y conductividad eléctrica (CE) en unidades de μScm^{-1} con el equipo multiparámetro HANNA modelo HI99300, para ello se hizo una pasta de saturación con 250gr de suelo y 100 ml de agua el cual fue almacenado durante 24 h a 3°C y posteriormente filtrado por succión para analizar el líquido filtrado. El suelo fue analizado en crisoles a peso constante con 4 repeticiones con 25gr de suelo, en estos se determinó porcentaje de materia orgánica (%MO) y porcentaje de cenizas (%C) en base a la metodología marcada por LIU (2015). Por último, la densidad aparente (ρ_a) se determinó al colocar 100gr de suelo previamente tamizado en una probeta de 100 ml. La ecuación para obtener la densidad aparente esta dada por:

$$\rho_a = Ms/Vs \quad (1)$$

Donde la masa de suelo está representada por Ms y el volumen ocupado por el suelo por Vs.

Suelos contaminados. Se colocó 1 g de suelo en crisoles a peso constante y se secaron en estufa a 25°C durante 24 h, se tomaron 5 repeticiones por tratamiento los cuales fueron Control (C), Aceite vegetal (Av), Aceite automotriz (Aa) y Detergente (D). A cada tratamiento se le colocó 0.5 ml de su respectivo contaminante (0.5 ml de agua de riego agrícola para el caso de C) y se disolvieron en 20 ml de agua de riego agrícola; se determinaron los parámetros físicos y químicos de la mezcla inicial (Temperatura, pH, CE y SDT). Los crisoles fueron sometidos a 450°C durante una hora; a los residuos se les determinó nuevamente los parámetros físicos y químicos (Temperatura1, pH1, CE1 y SDT1) al ser diluidos en 20ml de agua agrícola y al ser aforados a 100 ml (Temperatura2, pH2, CE2 y SDT2) después de ser filtrados en papel cualitativo grado 1 con poro de 11µm a peso constante y lavado 3 veces. Los matraces fueron almacenados y refrigerados en condiciones de temperatura de condiciones de 3° C.

Variables agronómicas. Se tomaron 20 vasos de unicel con capacidad de 250 ml y se perforaron en la base con 13 agujeros de aproximadamente 2 mm equidistantes entre ellos con una distancia de 1 cm. A cada vaso se le colocó 60 g de suelo agrícola previamente tamizado. En cada vaso se colocaron 2 semillas de *Phaseolus vulgaris* previamente remojados durante una hora teniendo un total de 40 semillas, una vez colocadas y en condiciones de invernadero, las semillas se les regó inicialmente con 20 ml de agua agrícola. Posteriormente los riegos fueron diarios durante 5 días con 10 ml de agua obtenida del análisis de los suelos contaminados. Las variables a evaluar en el caso de las plántulas fueron altura inicial (Ai), altura final (Af), longitud de raíces (R) y número de hojas (H).

RESULTADOS

Caracterización del suelo agrícola. En la caracterización de suelos agrícola que involucro 4 repeticiones, se reporta según lo marcado en NOM-021-SEMARNAT-2000 el suelo es del tipo arcilloso (ρ_a=1.11gcm^{-3}) muy ligeramente salino (CE=1.62dSm^{-}1, SDT=810ppm) con pH medianamente alcalino (pH=7.5) y un alto porcentaje de materia orgánica (%MO= 6.1).

Suelos contaminados. Antes de ser sometidos las mezclas de suelos a la temperatura de 450°C el promedio de la Temperatura estuvo entre los valores de 25.02±0.28°C en el tratamiento D y 26.18 ±0.08°C en el tratamiento C. En el caso del pH, los datos oscilaron entre valores de 8.07±0.02 en D y 8.19±0.05 en Aa. En cuanto a CE el promedio

estuvo dentro del intervalo de 518.20±2.59µScm^{-1} en Aa y 2228.60 ±206.60µScm^{-1} en D. De la misma forma, los valores de SDT oscilaron ente 258.40±1.67ppm en suelo con Aa y 1114.20±103.70 ppm en D. Después de ser sometidos a la temperatura de 450° y ser diluidos en 20 ml de agua agrícola, el valor promedio de la Temperatura1 se dio entre los valores de 26.58±0.26°C en Av y 27.46±0.06°C en D. El promedio para pH1 osciló entre los valores 8.08±0.14 en el tratamiento Av y 8.90±0.19 en el tratamiento D. En el caso de CE1 tuvo un promedio dentro de los valores de 438.40±37.10µScm^{-1} en Av y 840.80±98.70µScm^{-}1 en D. Por otro lado, el promedio de SDT1 se mantuvo dentro del intervalo de 216.00±13.89ppm en Av y 419.20±47.80ppm en D. Los tratamientos al ser filtrados y aforados a 100 ml mantuvieron un promedio general en la Temperatura2 entre los valores de 26.74±0.15°C en C y 27.86±0.18°C en D. Del mismo modo, el promedio en el pH2 oscilo entre los valores de 8.43±0.06 en suelo con Av y 8.71±0.38 en suelo con Aa. En cuanto a los valores de CE2 el promedio se mantuvo dentro de los valores de 368.60±11.46 µScm^{-1} en Aa y 485.80±39.50 µScm^{-1} en D. Por último, para la variable SDT2 el promedio osciló entre 183.80±5.93ppm en suelos con Aa y 242.00±20.70ppm en D.

De 66 interacciones de la matriz de correlaciones, el 39.39% presentan correlaciones positivas mayores a $r^{2=}0.70$. De estos resultados destacan las relaciones entre las variables CE y SDT con valor más alto con r^2 =1.00. Las variables con correlación similar son CE1 y SDT1 junto con CE2 y STD2, ambos grupos tienen un valor r^2=0.99. Por otra parte, existe una correlación grande entre la variable SDT1 con las variables CE 2 (r^2=0.94) y SDT 2 (r^2=0.94). Un comportamiento similar se encuentra con la variable CE1 al tener una correlación grande con las variables CE2 (r^2=0.94) y SDT2 (r^2=0.94). Por último, existe también una correlación grande entre la variable SDT con CE2 (r^2=0.89) y SDT2 (r^2=0.88) al igual que CE con las variables CE2 (r^2=0.89) y SDT2 (r^2=0.88).

El análisis de varianza realizado en la evaluación de suelos contaminados, demuestra que hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la influencia de los contaminantes y todas las variables de respuesta (antes del tratamiento térmico a 450°C y después de ser diluidos a 20ml y aforados a 100ml), exceptuando la variable de pH 2. Esta relación de tendencias se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de varianza en la evaluación del efecto de los contaminantes en las variables de respuesta Temperatura, pH, SDT, CE, Temperatura 1, pH 1, SDT 1, CE 1, Temperatura 2, pH 2, SDT 2 y CE 2.

	Temperatura			**pH**			**SDT**			**CE**		
Tratamiento	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P
Control	26.18	0.07	0.00*	8.08	0.02	0.00*	272.00	23.20	0.00*	545.00	46.22	0.00*
A. vegetal	26.10	0.07		8.09	0.02		272.00	23.20		554.00	46.22	
A. auto	25.62	0.07		8.19	0.02		258.40	23.20		518.20	46.22	
Detergente	25.02	0.07		8.07	0.02		1114.20	23.20		2228.6	46.22	
	Temperatura 1			pH 1			SDT 1			CE 1		
Tratamiento	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P
C	26.82	0.09	0.00*	8.78	0.11	0.00*	221.80	11.49	0.00*	443.00	24.35	0.00*
A. vegetal	26.58	0.09		8.08	0.11		266.00	11.49		438.40	24.35	
A. auto	27.06	0.09		8.42	0.11		221.20	11.49		442.20	24.35	
Detergente	27.46	0.09		8.90	0.11		419.20	11.49		840.80	24.35	
	Temperatura 2			pH 2			SDT 2			CE 2		
Tratamiento	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P	Mean	SE Mean	P
C	26.74	0.15	0.00*	8.58	0.09	0.16Ns	192.60	5.18	0.00*	385.80	9.92	0.00*
A. vegetal	27.12	0.15		8.43	0.09		197.40	5.18		394.80	9.92	
A. auto	26.92	0.15		8.71	0.09		183.80	5.18		368.60	9.92	
Detergente	27.86	0.15		8.67	0.09		242.00	5.18		485.80	9.92	

Significativo (*) p>0.05, No significativo (Ns) p < 0.5.

La prueba de Tukey para evaluar el efecto de tratamiento sobre variables de respuesta indicó que el tratamiento D tuvo el mayor efecto estadísticamente significativo para la mayoría de las variables, los resultados se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Prueba de Tukey para el efecto de los tratamientos D, Av y Aa.

Tratamiento	Variable	Media	Grupo	Variable	Media	Grupo	Variable	Media	Grupo
Control	Temperatura	26.18	a	Temperatura 1	26.82	b c	Temperatura 2	26.74	b
A. vegetal	p=0.00*	26.10	a	p=0.00*	26.58	C	p=0.00*	27.12	b
A. automóvil		25.62	b		27.06	B		26.92	b
Detergente		25.02	c		27.46	A		27.86	a
Control	pH	8.08	b	pH 1	8.78	a b	pH 2	8.58	a
A. vegetal	p=0.00*	8.09	b	p=0.00*	8.08	C	p=0.16Ns	8.43	a
A. automóvil		8.19	a		8.42	b c		8.71	a
Detergente		8.07	b		8.90	A		8.67	a
Control	CE	545.40	b	CE 1	221.80	b	CE 2	385.80	b
A. vegetal	p=0.00*	544	b	p=0.00*	216	b	p=0.00*	394.80	b
A. automóvil		518	b		221.20	b		368.60	b
Detergente		2228.6	a		419.20	a		485.80	a
Control	SDT	272	b	SDT 1	221.80	b	SDT 2	192.60	b
A. vegetal	p=0.00*	272	b	p=0.00*	216	b	p=0.00*	197.40	b
A. automóvil		258.40	b		221.20	b		183.80	b
Detergente		1114.2	a		419.20	a		242	a

Valores con letra igual son estadísticamente similares (Tukey, $p \leq 0.05$). Significativo (*) p>0.05, no significativo (Ns) p < 0.5.

El análisis de componentes principales permitió identificar que el CP1 (CE y SDT en todos los tratamientos) explicó el 66 % de la variabilidad de los datos y el CP2 (pH, Temperatura 1 y pH2) explicó el 13%. En la Figura 2 se observa la dispersión de puntos correspondiente a las variables evaluadas en suelos contaminados con D, Av y Aa distinguiéndose en una distancia considerable del eje central el grupo de datos correspondiente a D. De la misma forma, en la Figura 3, el análisis de similaridad indica el grado de similitud entre las variables antes de ser incineradas a una temperatura de 450 °C (Temperatura, pH, CE y SDT), después del tratamiento térmico diluidas a 20 ml (Temperatura 1, pH 1, CE1, SDT1) y al ser filtradas y aforadas a un volumen de 100 ml (Temperatura 2, pH 2, CE2 y SDT2). Las variables con mayor similitud fueron los SDT y CE con un 100%, las variables de CE1 y SDT1 presentaron una similitud del 99.96% al igual que CE 2 y SDT2.

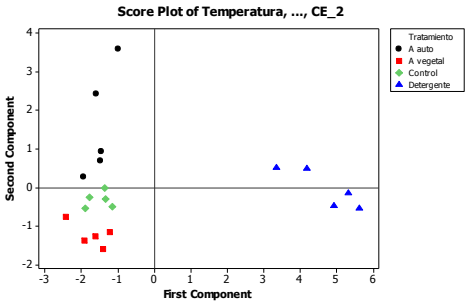


Figura 1. Dispersión puntos derivados del análisis de componentes principales en suelos contaminados

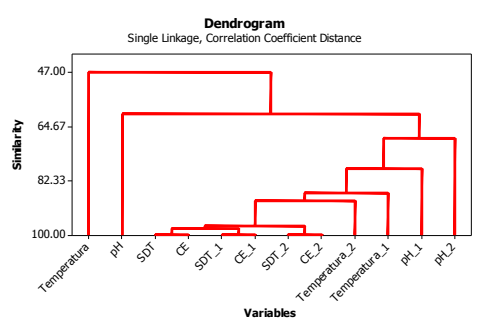


Figura 2. Dendograma derivado del análisis de similitud entre variables indicativos de la calidad de suelos contaminados.

Variables agronómicas. Del total de 40 semillas plantadas, el experimento tuvo un porcentaje de germinación del 87.5%. El número de plantas analizadas fueron en total 35 plántulas de *Phaseolus vulgaris* promediando 8.75 para cada tratamiento en donde las variables a evaluar fueron Ai, Af, H y R. De las variables analizadas el promedio de Ai se presentó entre los valores de 12.9±4.5cm en C y en D con 16.0±5.3cm, con respecto a Af el promedio general se mantuvo entre 22.1±11.1cm en D y 29.6±20.1cm en Av, R tuvo un promedio general entre los intervalos de

10.7±1.3cm en Aa y 12.5±3.2cm en Av, por último, el promedio general de H se dio entre los valores de 3.5±1.6hojas/planta en Aa y 4.1±0.6hojas/planta en Av.
El análisis de correlación presentó 6 interacciones entre las variables evaluadas de las cuales destacan Ai y Af con una r^2=0.78, Af con H con un valor r^2=0.54, Ai con H con r^2=0.50 y Af con R con un valor de r^2=0.48. Con el análisis de varianza se determinó que las dosis de agua obtenida a partir de los tratamientos D, Av y Aa no tuvieron efecto significativo ($p \leq 0.05$) con las variables agronómicas Ai (p=0.61), Af (p=0.65), R (p=0.21) y H (p=0.81), esto puede ser debido a la baja concentración de contaminantes presentes en el agua.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del bioensayo realizado para evaluar el impacto ambiental de 3 contaminantes diferentes (Detergente, Aceite automotriz y Aceite vegetal) en el cultivo de *Phaseolus vulgaris* se centran en tres apartados principales: caracterización de suelo, determinación de suelos contaminados y variables agronómicas.
En la caracterización del suelo se determinó que el suelo es arcilloso, ligeramente salino con pH moderadamente alcalino y contiene una gran de materia orgánica. Para el análisis de suelos contaminados en donde se evaluaron las variables de Temperatura, pH, CE, SDT antes y después del tratamiento térmico (diluidos a 20 y a 100 ml de agua), mostraron que en la mayoría, los valores más altos eran hallados en los tratamientos que incluían como contaminante el Detergente. De 66 interacciones de la matriz de correlaciones entre las variables evaluadas en los suelos contaminados el 39.39% presentan correlaciones positivas con valores de r^2>0.7 en donde las variables de CE, SDT, CE1, SDT1, CE2 y SDT2 destacan por su gran correlación. El análisis de varianza mostró que los tratamientos tienen un efecto significativo entre las variables evaluadas ($p \leq 0.05$); con la prueba de Tukey se determinó que el tratamiento con Detergente presentó mayor variación en la mayoría de las medias de las variables analizadas. El análisis de componentes principales demostró que CP1 explicó el 66% de la variabilidad de los datos y el CP2 explico el 13% además de que la dispersión de datos fue del tipo agregado para los tratamientos, en donde el Detergente fue el más alejado del centro seguido del Aceite automotriz. En las variables agronómicas, las dosis de agua provenientes de los tratamientos con suelos contaminados no mostraron tener efecto significativo entre las variables Ai (0.61), Af (0.65), R (0.21) y H (0.81), esto se debió a la baja concentración de contaminantes ya que en el tratamiento térmico se volatilizaron una gran cantidad de compuestos presentes en el suelo.

BIBLIOGRAFIA

BAUTISTA, A., ETCHEVERS, J., CASTILLO, R., GUTIERREZ, C. (2004). "La calidad del suelo y sus indicadores" en Ecosistemas, Núm. 2, Vol. XIII, Mayo-Agosto, [pp. 813-831].

CONTERO, R., & FELICITA, O, (2005). "Utilización de bioensayos para la determinación de contaminación en agua de riego en la cuenca del río granobles" en LA GRANJA, Revista de Ciencias de la Vida. Núm. 4, [pp. 38-42].

ESTRADA, I., HIDALGO, C., GUZMAN, R., ALMARAZ, J., NAVARRO, H., Etchevers, J. (2017). "Indicadores de calidad de suelo para evaluar su fertilidad" en Agrociencia, Núm. 8, Vol. LI, Noviembre-Diciembre, [pp. 90-97].

FAO (2018) "Degradación del suelo" en el portal de suelos de la FAO. Consultada en http://www.fao.org/soils-portal/soil-degradation-restoration/es/ (fecha de consulta 17-07-2018).

LIU, L., BELDA M., FORNES, F. (2015). *Desarrollo de nuevos sustratos a base de compost y biochar para la propagación y producción de Rosmarinus officinalis L. en vivero profesional* (tesis de pregrado). Universidad politécnica de Valencia, Valencia.

"Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis". Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002

SANGERMAN, ACOSTA, SHWENSTESIUS DE RINDERMAN, DAMIÁN LARQUÉ, (2010). "Consideraciones e importancia social en torno al cultivo del frijol en el centro de México" en Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Núm. 3, Vol. I, Julio-Septiembre, [pp. 363-380].

SINGH, S. P., TERAN, C. G. MUNOZ Y J.C. TAKEGAMI, (1999). "two cycles of recurrent sellection for seed yield in common bean" en crop Sience, Núm. 2, Vol. XXXIX, [pp.391-397].

SEMARNAT (2015) "Informe de situación del medio ambiente en México", pp. 153-190. Consultada en http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/index.html (fecha de consulta 17-07-2018).

SQI (1996) "Indicators for Soil Quality Evaluation" en USDA Natural Resources Conservation Service, pp. 1-2 Consultada en https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_053149.pdf (fecha de consulta 17-07-2018).

SSSA. Glossary of Soil Science Terms. Consultada en https://www.soils.org/publications/soils-glossary. (fecha de consulta 17-07-2018).
TORRES, M. (2003). “Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales” en Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, n.2-3, Vol. XLI, Mayo-Diciembre, [pp. 0-0].

CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS EN *PHASEOLUS VULGARIS*

Regalado Mora Soledad Sarahí[1] y Mejía Teniente Laura[2]

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la capacidad de colonización y actividad endofítica de ocho hongos en plantas de *Phaseoulus Vulgaris.* Para el desarrollo del proyecto, se inocularon las semillas de frijol con los distitntos hongos endófitos, se plantaron, y se midieron las variables agronómicas al término de la tercera semana posterior a la germinación de la semilla, esto para demostrar la actividad endofítica de los hongos. En cuanto a la capacidad de colonización de cada hongo, se demostró que solo los hongos H-114 y H-111 colonizaron satisfactoriamente a la planta. Sin embargo, el análisis de las variables agronómicas arrojó que las plantas tratadas con el hongo H-9 presentaron un mayor crecimiento con respecto a los demás tratamientos.

ABSTRACT

In this work, the colonization capacity and endophytic activity of eight fungi in *Phaseoulus Vulgaris* plants were evaluated. For the development of the project, bean seeds were inoculated with the different endophytic fungi, planted, and agronomic variables were measured at the end of the third week after germination of the seed, this to demonstrate the endophytic activity of the fungi . Regarding the colonization capacity of each fungus, it was shown that only fungi H-114 and H-111 successfully colonized the plant. However, the analysis of the agronomic variables showed that the plants treated with the fungus H-9 presented a greater growth with respect to the other treatments.

Palabras Clave: endófitos, *Phaseolus vulgaris*, colonización, simbiosis, patógeno.

INTRODUCCIÓN

Los principales tratamientos usados en la agricultura para fomentar el crecimiento de los cultivos y el control de plagas se basan en el uso de sustancias químicas, las cuales contaminan suelos y agua, además de que pueden ser dañinas para los seres humanos. Por ello se han buscado alternativas para sustituir estas sustancias y de esta manera disminuir el impacto ambiental, una de estas alternativas es el uso de hongos endófitos.

La palabra 'endófito' etimológicamente significa 'dentro de la planta' (endon: dentro, phyton: planta). Como su nombre lo indica, los hongos endófitos son microorganismos capaces de colonizar el tejido de las plantas, pero sin causar ninguna enfermedad a su hospedero. Los hongos endófitos establecen una asociación mutualista con la planta hospedera, en la que la planta le proporciona protección y nutrientes necesarios para su supervivencia, el hongo a su vez le brinda adaptación ante agentes abióticos como la salinidad del suelo, estrés hídrico, estrés oxidativo; así como también produce enzimas y metabolitos secundarios para la protección contra factores bióticos como lo son ciertos patógenos o insectos. Asimismo, se ha reportado que la relación planta-endófito es tan fuerte que puede llegar a estar involucrada en la resistencia sistémica inducida (Waller et al., 2005).

Todos estos mecanismos conducen a una mayor habilidad competitiva en las plantas pues le permiten expresar su máximo potencial genético, exhibir altas tasas de germinación, mayor densidad, más biomasa en los tejidos y mejor producción de semilla, en comparación con las plantas libres de endófitos (Vila-Aiub et al., 2003).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad colonizadora de distintos hongos endófitos en la planta de *Phaseolus Vulgaris* para su posible uso en la industria agrícola.

1.-Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Agroindustrial; Mutualismo 303, Colonia Suiza, C.P:38060, Celaya, Gto, ss.regaladomora@ugto.mx
2.-Universidad de Guanajuato Departamento de Ingeniería Agroindustrial; Mutualismo 303, Colonia Suiza, C.P:38060, Celaya, Gto, Laura.mejia@ugto.mx

MÉTODOS Y MATERIALES

Esterilización de suelo y macetas

Se esterilizó el sustrato peat moss en bolsas plásticas dentro de una autoclave a 121 ° C y 15 libras de presión por 15 minutos.

La esterilización de macetas se realizó mediante un lavado con jabón, posteriormente un lavado con cloro y por último un lavado con agua. Todo esto para evitar la interferencia de otro microorganismo que hiciera diferir los resultados.

Selección de semillas

Se seleccionaron diez semillas de tamaño igual para cada tratamiento, para asegurar su viabilidad se colocaron en un vaso de precipitado con agua, en el que todas las semillas que flotaron fueron desechadas ya que son semillas que no germinan.

Inoculación de la semilla

Las semillas previamente seleccionadas se desinfectaron en una solución de cloro al 60% durante un minuto, después se lavaron con agua, y se dejaron secar en sobres de papel aluminio.

La inoculación de las semillas se realizó dentro de una campana de flujo laminar para mantener las condiciones estériles. Para la inoculación se tenían previamente medios de cultivo (PDA con antibióticoen cajas Petri con los hongos a utilizar, a cada medio de cultivo se le agregó sacarosa al 30% con un tubo falcon de 50 ml, se procedió a raspar el medio con una Espátula Drigalski esterilizada en mechero para evitar la contaminación de los hongos, se esterilizó nuevamente la espátula, y la sacarosa resultante con el hongo se transfirió al tubo falcon de 50 mL en el que se agregaron 10 semillas.

Para cada uno de los hongos se realizó el mismo procedimiento con diez semillas por hongo. Posterior a la inoculación las semillas se retiraron de la solución y se colocaron en sobres de papel aluminio, siendo un sobre para cada tratamiento.

Adecuación del espacio

Se adaptó un espacio con malla sombra en el que se colocaron todas las macetas para los diferentes tratamientos con los hongos endófitos, se separaron seis macetas para cada tratamiento a las que se les adicionó ¾ partes de su capacidad con el peat moss esterilizado y humedecido, se regó cada maceta y se dejaron reposar una noche par que el nivel de agua en cada una fuera uniforme.

Plantación de las semillas

Se plantaron las semillas a una profundidad de 3 cm en cada una de las macetas, en total se usaron seis semillas por cada hongo endófito y se regaron.

Medición de las variables agronómicas

Al término del tratamiento con una duración de 3 semanas, se hizo la medición de las variables agronómicas. En primer lugar, se hizo la medición de la altura de la planta con un flexómetro siendo esta desde la base del tallo hasta el ápice del tallo, después se midió el grosor del tallo con un vernier, finalmente se registró el número de trifolios bien establecidos y numero de trifolios en desarrollo de cada planta.

Recuperación de los hongos

Después de hacer las mediciones agronómicas de cada una de las plantas se evaluó la capacidad de colonización de los hongos utilizados. Se seleccionaron dos plantas de cada tratamiento, estas plantas se lavaron con agua para eliminar toda la tierra que estas tuvieran, procurando no dañar las raíces. Una vez limpias las plantas, se efectuó el proceso dentro de una campana de flujo laminar, en el que se desinfectó la planta dos minutos en una solución con

cloro al 60%, seguidamente se pasó a la solución de alcohol al 70% en la que dejo por un minuto y por último se le realizo dos lavados con agua destilada. Luego de la desinfección de las plantas se cultivó en tres cajas Petri (con medio PDA y antibiótico), el tejido, la impresión y el agua ya sea de las hojas o raíz. Para el tejido, se cortaron en pequeños pedazos lo que se decidió utilizar hoja o raíz y se colocaron nueve trozos del tejido en una caja Petri, para la impresión se tomó el tejido sin cortar y se impregnó por unos segundos en otra de las cajas Petri, para finalizar se coloca un ml del agua del ultimo enjuague indicado en el proceso de desinfección en la ultima caja Petri.

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza y comparación de medias en el software Infostat.

RESULTADOS

Variable: Altura de la planta.

Los resultados de la Figura 1 indican que la media del tratamiento H-9 es significativamente diferente a las medias de los demás tratamientos y el control, por lo que se supone que en la planta actúa el hongo H-9 lo que le ayuda a fomentar su crecimiento y generar una mayor competitividad con respecto a las otras plantas.

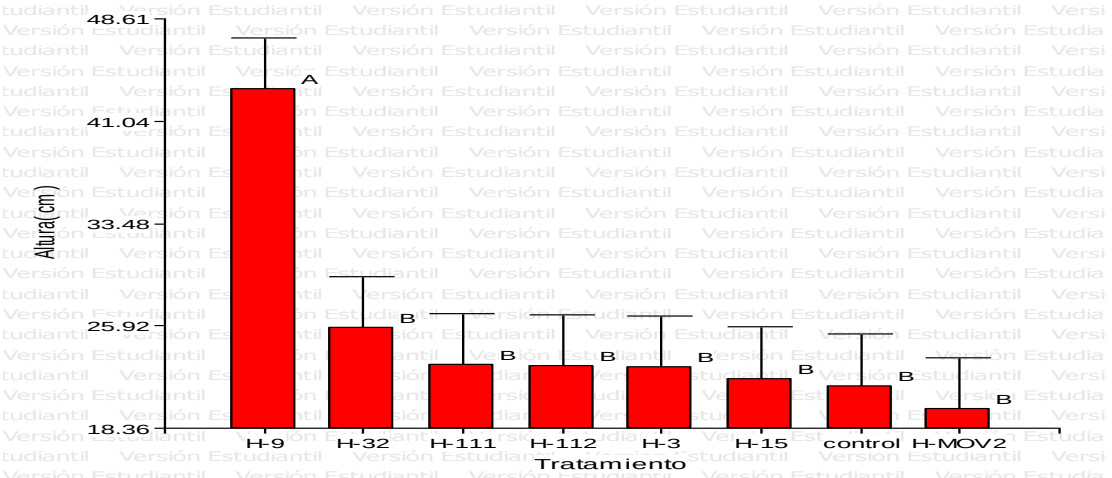


Figura 1. Histograma del análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos para la Altura de la planta. Test de Duncan con (p>0.10).

Variable diámetro:

En el caso del diámetro de las plantas podemos observar en la Figura 2 que el tratamiento que generó más diferencia entre las medias fue el tratamiento H-111.

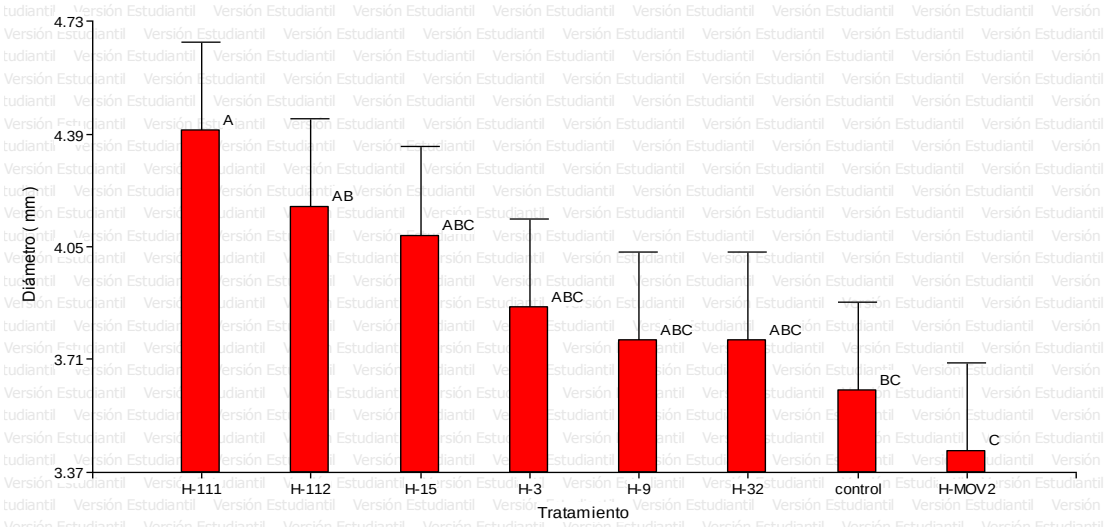


Figura 2. Histograma del análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos para el diámetro del tallo. Test de Duncan con (p>0.10).

Variable: Numero de trifolios.

En la figura 3 se indica que las plantas tratadas con el hongo H-9 Y H-15 fueron los que presentaron un mayor número de trifolios con respecto a las demás, deduciendo así que estas plantas tienen una mayor cantidad de biomasa. De igual manera que en la altura de la planta y el diámetro del tallo, el tratamiento con el hongo H-MOV2 genera resultados negativos, lo cual nos indica que en lugar de actuar como un endófito para la planta puede haberse establecido como un patógeno, por lo que no es viable su utilización para este propósito.

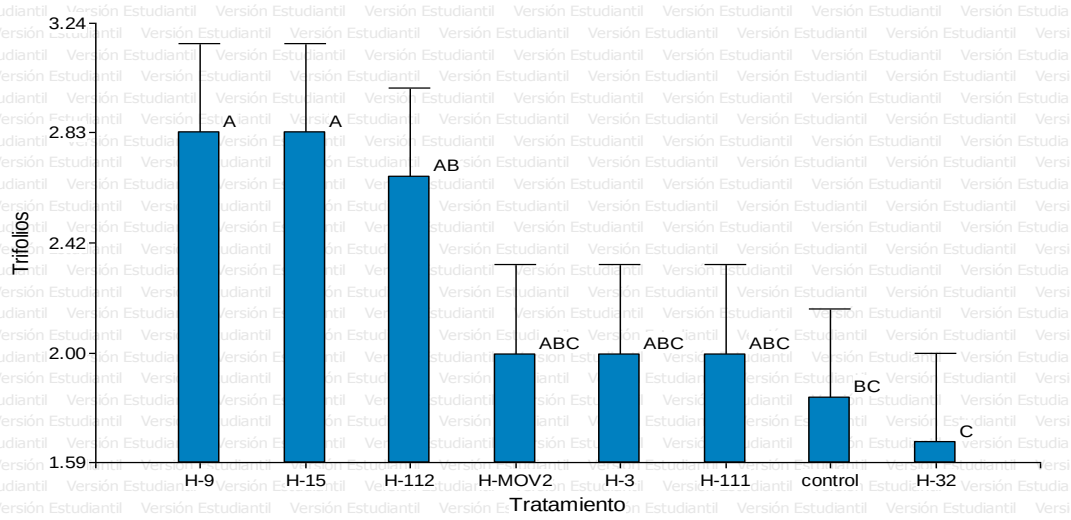


Figura 3. Histograma del análisis de varianza y comparación de medias entre tratamientos para el numero de trifolios. Test de Duncan con (p>0.10).

Analizando las tres variables definimos que el hongo endófito H-9 es el que produce metabolitos secundarios que crean las condiciones necesarias para una mejor protección y adaptabilidad de la planta.

Evaluación de la colonización de los hongos:

En las figuras 4 a 7 se observan los hongos inoculados en las semillas de *Phaseoulus Vulgaris* y los que se lograron recuperar de las plantas tratadas.

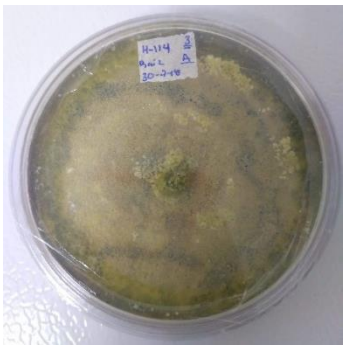


Figura 4. Hongo H-114 utilizado para la inoculación de las semillas.

Figura 5. Hongo H-114 recuperado de planta tratada.

Figura 6. Hongo H-111 utilizado para la inoculación de las semillas.

Figura 7. Hongo H-111 recuperado de planta tratada.

Solo dos de los hongos el H-114 Y H-111 fueron recuperados satisfactoriamente de las plantas durante la tercera semana del tratamiento, por ello se puede decir que estos hongos lograron colonizar con éxito a la planta, en cambio para los demás hongos utilizados no fue posible su aislamiento, en consecuencia, no es demostrable su actividad de colonización.

CONCLUSIONES

Los hongos endófitos son una alternativa factible para mejorar la producción de los cultivos y disminuir el uso de agentes químicos que dañan el medio ambiente.

La evaluación en la capacidad de colonización puede verse afectada por las condiciones ambientales, la utilización de un medio de cultivo que no es favorable para el crecimiento del hongo o la manipulación en laboratorio, ya que una planta inoculada con el hongo endófito puede presentar un mayor crecimiento, pero no demostrar la actividad colonizadora del hongo.

Un hongo endófito puede presentar actividad patógena para la planta si los factores climáticos no resultan ser los adecuados para mantener una asociación en equilibrio con la misma.

BIBLIOGRAFIA

Sánchez-Fernández, R.E, Sánchez-Ortiz, B.L, Sandoval-Espinosa, Y.M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M.C, & Macías-Rubalcava, M.L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP*, *16*(2), 132-146. doi: 10.1016/s1405-888x(13)72084-9

Bonilla Páez, M. (2012). INOCULACIÓN Y ESTABLECIMIENTO ENDOFÍTICO DE CEPAS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae Y Lecanicillium lecanii EN PLANTAS DE FRÍJOL (Phaseolus vulgaris). *Universidad Del Valle*.

Abello, J., & Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Carpoica- Ciencia Y Tecnología Agropecuaría*, *7*(2), 55-57.

Waller F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hück-elhoven, C. Neumann, D. Wettstein, P. Franken y K. Kogel. 2005. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease re-sistance, and higher yield. PNAS 102 (38): 13386-13391

Vila-Aiub M.M., M. Martínez-Ghersa y C. Ghersa. 2003. Evolution of herbicide re-sistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. Evo-lutionary Ecology 17: 441-456

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES

Bueno González, Yuridia Sarahí[1] y Veloz García, Rafael Alejandro[2]

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de la especie vegetal Trompeta (*Angelica archangelica)* empleando dos solventes: cloroformo y agua, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* incubado a 35°C, durante 6 días. Cada tratamiento constó de tres repeticiones usando 50 µg/ml y 50 mg/ml de extracto en Agar-Papa-Dextrosa respectivamente con base en la técnica alimento envenenado. Los resultados muestran que a altas concentraciones del extracto en agua se promueve el desarrollo del hongo, sin embargo el crecimiento del micelio no es el característico cuando se encuentra en condiciones adecuadas. Las cepas presentaron problemas de desarrollo en los tratamientos empleados por lo que es difícil concluir respecto a la actividad antifúngica del extracto.

ABSTRACT

We evaluated the antifungal activity of the extracts obtained from the species Trumpet (*Angelica archangelica*) plant using two solvents: chloroform and water, in the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* incubated at 35 ° C, for 6 days. Each treatment consisted of three replicates using 50 µg / ml and 50 mg / ml extract in Potato-Dextrose-Agar respectively based on the poisoned culture medium. The results show that at high concentrations of the extract in water the development of the fungus is promoted, however the growth of the mycelium is not the characteristic when it is in adequate conditions. The strains presented development problems in the treatments used, so it is difficult to conclude regarding the antifungal activity of the extract.

Palabras Clave: *Fusarium oxysporum*, *Angelica archangelica*, agua, cloroformo.

INTRODUCCIÓN

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y postcosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo estos responsables de pérdidas económicas cuantiosas; el daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005). Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en una variedad de productos, siendo las más comunes especies de *Alternaria, Botrytis, Diplodia, Monilia, Penicillium, Colletotrichum, Phomopsis, Fusarium, Rhizopus y Mucor* (Rivera, 2008).

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Las enfermedades de la plantas causadas por especies del género *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y tallos, pudrición de frutos, granos y semillas. *Fusarium oxysporum* es un hongo que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas *Gimnospermas* y *Angiospermas*, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988).

La especie *Fusarium oxysporum* ataca diversos tipos de plantas económicamente importantes en distintos países y en diferentes regiones, causando marchitamientos vasculares y muerte de las plantas. En hortalizas se registran atacando entre otras plantas al tomate, apio, pepino cohombro, cebolla, repollo, espárrago y remolacha. En frutales se ha registrado en banano, cítricos, melón, guayaba y vid. En leguminosas de grano en frijol, soya, alverja, lenteja y garbanzo. En plantas productoras de aceite ajonjolí y en palma africana. En ornamentales en clavel, crisantemo,

[1]Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Huasteca Sur, Km 5, Carretera Tamazunchale-San Martin, C.P: 79960, Tamazunchale S.L.P. México, yuriz_4ever@hotmail.com
[2]Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Agroindustrial; Privada Arteaga S/N, Col. Centro, C.P: 38000, Salvatierra, Guanajuato, México, alejandroveloz@ugto.mx

delfinio y gladiolo. En plantas aromáticas se ha observado en albahaca. En plantas productoras de lino y en cáñamo. En plantas forrajeras se ha registrado en trébol, alfalfa y lupino. En árboles en eucalipto y en algunas coníferas.

Según Senasica (2012), una subespecie de *F. oxysporum* causa pérdidas del 10% a 53% del cultivo de papa en el mundo, y la literatura no refiere condiciones ambientales que limiten el desarrollo de este patógeno en las zonas productoras de México, por lo que es considerado de alto riesgo. Además, especies de *Fusarium* como *F. oxysporum* y *F. solani* se han reportado como unos de los principales agentes causales de marchitez en Chile y en México desde 1967, junto a géneros *como Phytophthoraspp., Rhizoctoniaspp., Phytiumspp*., entre otros, que han sido considerados como un complejo fitopatogénico, que en condiciones favorables causan la enfermedad y provocan pérdidas económicas devastadoras al afectar del 60% al 100% de la superficie cultivada. (Villa y colaboradores, 2015)

Con base en literatura se tiene que en México algunos cultivos de importancia económica son afectados por *Fusarium oxysporum*, por ejemplo: El garbanzo (*Cicerarietinum*) es uno de ellos. En Sinaloa, México, el cultivo de garbanzo es importante porque genera divisas al exportar casi toda su producción, sin embargo, un factor que limita el éxito de la producción de este cultivo, es la fusariosis vascular ocasionada por *Fusarium oxysporum*. Las pérdidas causadas por el hongo van de 10 a 40% de la cosecha anual, y puede devastar por completo al cultivo en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. (Oliva y colaboradores, 2017)

En cultivos como el maíz (*Zea mays*) de acuerdo a Figueroa María y colaboradores en su artículo "Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México" publicado en el 2010, se tiene que México cultiva en promedio 7 millones de ha, con una producción de 17.5 millones de toneladas. Los estados con mayor producción de maíz son Jalisco, el estado de México y Chiapas. Guanajuato se encuentra ubicado en el octavo lugar de producción. En México, la superficie dedicada al cultivo de maíz se ha reducido en los últimos años, con pérdidas de alrededor del 30%, siendo uno de los factores limitantes del rendimiento las enfermedades causadas por patógenos producidas por el género *Fusarium*.

El esfuerzo de los productores por manejar esta problemática los ha conducido a la búsqueda de alternativas de manejo, debido al bajo control que presenta el uso de productos agroquímicos sintéticos. Sumado a esto, las múltiples aplicaciones de dichos agroquímicos pueden acarrear diferentes problemas. (Ochoa y colaboradores, 2012)
El control de los organismos fitopatógenos del suelo es de los más difíciles de lograr; para ello se han desarrollado prácticas culturales, control biológico y control químico, siendo este último el más utilizado por ser económico y eficaz, en comparación con otras medidas. (Rubio y otros, 2008). Las enfermedades de las plantas causadas por este tipo de hongos se hallan entre los factores más importantes que aumentan las pérdidas y afectan los rendimientos de los cultivos. (Villa y colaboradores, 2015)

En el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium spp*. y otros hongos se utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en este grupo se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. (Agrios, 2005). Sin embargo, es probable que estos fungicidas sean agentes mutagénicos de las plantas, así como que pudieran incrementar el grado de resistencia de los patógenos ante su efecto. (Agrios, 2005). Dane y Dalgic (2005) demostraron el efecto genotóxico del benomil (Metil–1–(butilcarbomoil) benzimidazol– 2il–carbamato) en raíces de cebolla (*Allium cepa*) al ser tratadas con diferentes dosis de este fungicida y haber observado algunas anomalías, en la interfase y en las divisiones mitóticas de las células meristemáticas. Debido a la problemática que presenta el uso indiscriminado de los fungicidas sintéticos, es necesario desarrollar alternativas naturales para el control de enfermedades. (Bravo y colaboradores, 2000)

Angelica archangelica conocida vulgarmente como "trompeta" es la única planta de utilidad con origen nórdico (Galambosi 1994). Se ha usado en los países nórdicos como una planta medicinal desde la antigüedad y viajó al sur con los monjes cuando Escandinavia se cristianizó (KarlssonStrese 2008) alrededor de las 829-830 a. C. hasta las 1100 a. C. (Gräslund 1994). Su actividad farmacológica no ha sido muy estudiada. Clásicamente se considera una droga aperitiva, digestiva y carminativa. También se ha usado como expectorante y anticatarral. La Comisión E alemana reconoce las actividades antiespasmódica, colagoga y estimulante de secreciones gástricas. Se ha comprobado experimentalmente su actividad antibacteriana y antifúngica, antimutagénica, antiinflamatoria, antiulcerogénica, antiespasmódica, bloqueante de canales de calcio, hepatoprotectora (relacionada con su actividad antioxidante), antiproliferativa, antitumoral y citotóxica. (Carretero, 2018)

Por ello, el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto del extracto de *Angelica archangelica* sobre el crecimiento micelial *de Fusarium oxysporum* mediante cultivo in vitro empleando la técnica de alimento envenenado con dos disolventes (Cloroformo y agua) en el extracto para la obtención de un biofungicida.

MÉTODOS Y MATERIALES

Colección de especies vegetales y obtención del fitopatógeno: La recolección de especies secas vegetales de *Angelica archangelica* se llevó a cabo en el cerro de Lobo en la comunidad de Las Cruces perteneciente al Municipio de Salvatierra, Guanajuato, de donde se obtuvo la semilla de interés.

Fitopatógenos: Cepa de *Fusarium oxysporum* resembrada en Agar-Papa-Dextrosa ajustado a pH de 3.5, previamente purificada e identificada.

Obtención de extractos vegetales: El extracto evaluado fue extraído de la semilla de la planta, dichos extractos fueron obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Guanajuato sede Salvatierra, se utilizó agua y cloroformo como solventes en donde las semillas secas se maceraron en un baño ultrasónico a alta frecuencia durante 15 minutos cada 24 horas durante 3 días, las cantidades empleadas fueron 100 g de semilla por litro de solvente. Posteriormente cada mezcla obtenida se filtró con papel filtro. Finalmente se separó el extracto de la semilla y el disolvente en un rotavapor y una bomba de vacío Buchi a 50°C, 5-6 rpm y 0.8 mmbar de presión. Los extractos puros fueron envasados en frascos viales de 20 ml y colocados en refrigeración (4°C) para su conservación.

Evaluación de los extractos vegetales (Ensayo de alimento envenenado): Se evaluaron los dos extractos obtenidos sobre *Fusarium oxysporum*, para ello se utilizó la metodología de alimento envenenado. Debido al estado sólido de los extractos después de la refrigeración se colocaron en baño maría durante 30 minutos previó a su adición al medio Agar Papa-Dextrosa (PDA) para facilitar su manipulación. Se prepararon medios con 2 concentraciones para cada extracto, las cuales fueron 50 µg/mL del extracto en Agar Papa-Dextrosa sólido y 50 mg/mL respectivamente. Se hicieron tres repeticiones para cada tratamiento. Como control se elaboraron dos cajas con PDA. Después de dos días de la elaboración de los medios se verificó que estos no presentaran desarrollo microbiano y se procedió a sembrar el fitopatógeno con una espátula cortando cuadros de medio centímetro de lado y se colocaron sobre las placas con los diferentes tratamientos, se incubó a 35°C durante 6 días. El diámetro del micelio se midió diariamente con una regla tomando cuatro medidas del diámetro en diferentes posiciones y se obtuvo un promedio de las mismas. Los resultados fueron análisis con el programa estadístico Minitab 16 empleando el Análisis de Varianza y el Método Dunnet.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colección de especies vegetales y obtención de extractos vegetales:
Se obtuvo la semilla de las especies vegetales secas de trompeta colectadas en el cerro de El lobo (ver Figura 1). Las cantidades logradas fueron 7 g de extracto en agua de los 100 g/L de solvente y 1.5 g de extracto en cloroformo de los 100 g/L de solvente (ver Figura 2).

Figura 1. Semilla obtenida de trompeta (Angelica archangelica) previo a la maceración.

Figura 2. Viales con extracto de trompeta (*Angelica archangelica*) en agua y cloroformo respectivamente.

Al emplear dos solventes de diferente naturaleza química como el agua y el cloroformo, se permite que aquellas moléculas que sean de naturaleza similar a los solventes usados se disuelvan en ellos logrando así que cada extracto tenga diferente composición. El agua al ser un componente polar formará puentes de hidrógeno con aquellos compuestos polares, mientras que el cloroformo se unirá a aquellos compuestos no polares. Hay que mencionar que en el presente trabajo no se evaluó la composición de cada uno de los extractos, sin embargo se hace énfasis en la importancia de conocer la misma de cada uno para tener mayor información que permita analizar mejor el fenómeno

ocurrido durante el desarrollo del hongo. Los extractos vegetales y aceites esenciales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber varios con propiedades antifúngicas. (Montes, 2009)

Evaluación de los extractos vegetales

Los resultados obtenidos del extracto de trompeta en agua y cloroformo se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Crecimiento promedio micelial (cm) de Fusarium oxysporum en los diferentes tratamientos durante 6 días.

	Día	Tratamientos				
		Control	**50 mg/mL Extracto en $CHCl_3$ - PDA**	**50 mg/mL Extracto en H_2O - PDA**	**50 ug/mL Extracto en $CHCl_3$ - PDA**	**50 mg/mL Extracto en H_2O - PDA**
Diámetro del micelio (cm) / día	1	1.15 ± 0.11	0.73 ± 0.8	0.91 ± 0.01	0.9 ± 0.08	0.89 ± 0.03
	2	1.15 ± 0.11	0.73 ± 0.8	0.91 ± 0.01	0.9 ± 0.08	0.89 ± 0.03
	3	1.15 ± 0.11	0.73 ± 0.8	1.56 ± 0.12	0.9 ± 0.08	0.89 ± 0.03
	4	1.15 ± 0.11	0.73 ± 0.8	2.23 ± 0.14	0.9 ± 0.08	0.89 ± 0.03
	5	1.15 ± 0.11	0.73 ± 0.8	2.87 ± 0.02	0.9 ± 0.08	0.89 ± 0.03
	6	1.15 ± 0.11	0.73 ± 0.8	3.43 ± 0.04	0.9 ± 0.08	0.89 ± 0.03

Fuente: Elaboración propia

Se obtuvieron 5 cajas Petri de la resiembra de *Fusarium oxysporum* previo a la evaluación para mantener viable la cepa, se observó desarrollo al tercer día después de la misma, sin embargo el crecimiento de la especie fue lento (ver Figura 3). Los resultados muestran que el hongo no se desarrolló durante los 6 días de evaluación (ver figuras 4, 5, 7 y 8), con excepción del tratamiento correspondiente a 50 mg/mL Extracto en Agua-PDA (ver figura 6), el extracto en agua promovió el desarrollo de *Fusarium oxysporum* a partir del segundo día de la siembra, sin embargo, las características del micelio no eran propias de la especie cuando se desarrolla en las condiciones adecuadas, por lo que se puede intuir que en el medio se encontraba algún otro compuesto que impedía su desarrollo óptimo.

Figura 3. Resiembra de *Fusarium oxysporum* en PDA, día 13.

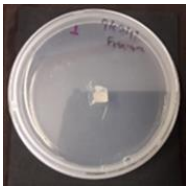


Figura 4. Caja 1 correspondiente al control, día 6.

Figura 5. Caja 1 correspondiente al tratamiento 50 mg/mL Cloroformo-PDA, día 6.

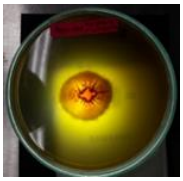


Figura 6. Caja 1 correspondiente al tratamiento 50 mg/mL Agua-PDA, día 6.

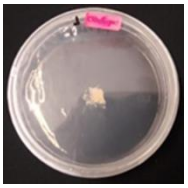


Figura 7. Caja 1 correspondiente al tratamiento 50 ug/mL Cloroformo-PDA, día 6.

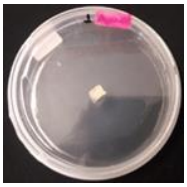


Figura 8. Caja 1 correspondiente al tratamiento 50 ug/mL Agua -PDA, día 6.

Realizando el análisis de varianza (ver tabla 2) se comprueba que el extracto si ejerce efecto sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, aunque no el que se esperaba. Es importante señalar que el error experimental es mayor en comparación con el del tratamiento, por lo que se puede asegurar que algún otro factor no considerado está influyendo

sobre la variable respuesta. Con el método Dunnet (ver tabla 3) se observa que el tercer tratamiento es el único que presenta diferencia significativa estadísticamente respecto al control empleado. En comparación con otros estudios realizados como Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de Fusarium spp. Por Ochoa y colaboradores (2012) las cepas empleadas de *Fusarium oxysporum* presentan crecimientos normales de acuerdo a las concentración de extracto empleado y evaluando la metodología empleada, se observa que la temperatura empleada para la incubación de los mismos es de 25°C, a su vez algunos otros autores reportan 28°C como la temperatura ideal para su desarrollo. (Morel Diffusion, 2012). De lo anterior se podría considerar este como uno de los posibles factores que pudieran estar influyendo.

Tabla 2. Análisis de varianza una sola vía, diámetro en cm frente al tratamiento.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P
Tratamiento	6.012	4	1.503	6.93	0.001
Error	5.423	25	0.217		
Total	11.435	28			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3. Agrupación de información empleando el método de Dunnett

Nivel	N	Media	Grupo
Control	6	1.1500	A
50 mg/mL Extracto en $CHCl_3$ - PDA	6	0.7300	A
50 mg/mL Extracto en H_2O - PDA	6	1.9850	
50 ug/mL Extracto en $CHCl_3$ - PDA	6	0.9000	A
50 mg/mL Extracto en H_2O - PDA	6	0.8900	A

Fuente: Elaboración propia

CONCLUSIONES

No se puede concluir con exactitud sobre la actividad antifúngica de los extractos de la trompeta, ya que la caja Petri Control no presento desarrollo alguno además de que no se pudo evaluar la actividad de los compuestos del extracto en cloroformo sobre la cepa, por lo que se puede considerar que la cepa posiblemente no se encontraba totalmente viable para su uso o que alguna condición relacionada con su medio no relacionada con el extracto no era favorable, lo que sí es concreto es que el extracto en agua posee compuestos que en concentraciones altas promueven el desarrollo del hongo. Se sugiere la identificación de compuestos de ambos extractos y estudiar a mayor detalle las condiciones óptimas de desarrollo de *Fusarium oxysporum*.

BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. (2005). *Plant pathology.* Nueva York: Elsevier Academic Press.

BOSLAND, P. (1988). Fusarium oxysporum a pathogen of many plant species. *Advances in plant pathology, 6*, 281-289.

Bravo, L., Bermúdez, T., & Montes. (2000). Inhibición de Fusarium moniliforme mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas*(57), 29-34.

CARRETERO, M. E. (S.A.). *Angelica archangelica.* Recuperado el 9 de Julio de 2018, de https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2012/10/15/53369.pdf

OCHOA, Y., CERNA, E., LANDEROS, J., HERNÁNDEZ, S., & DELGADO, J. (2012). Evaluación in vitro de la evaluación antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de Fusarium spp. Revista internacional de botánica experimental, 69-73.

OLIVA, L., VELÁZQUEZ, T., SOSA, R., PARTIDA, L., DÍAZ, T., ARCINIEGA, J., & LÓPEZ, C. (2017). Control de la fusariosis vascular del garbazo (Cicer arietinum L.) por microorganismos nativos de Sinaloa, México. *AGROCIENCIA*, 683-695.

RIVERA, J. (ENERO DE 2008). Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. *Fundación Hondureña de Investigación Agrícola*, 1-4.

RUBIO, R. G.; BALTODANO S. F.; ABANTO C. L.; WILSON K. J.; Y MUÑOZ R. M. 2008. Resistencia in vitro de Rhizoctonia solani y Fusarium oxysporum a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex–T y Homai– WP. *Revista Biológica de la Universidad de Trujillo*, Perú. 28 (2), 34–46.

MONTES, B. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos patógenos. *Revista Mexicana de Micología* (29), 73-82.
MOREL DIFFUSION. (07 DE 2012). CYCLAMEN. Recuperado el 02 de Agosto de 2018, de https://www.cyclamen.com/pdf/jY3aVsPA/fusarium_es.pdf
VILLA, A., PÉREZ, R., MORALES, H., BASURTO, M., SOTO, J., & MARTÍNEZ, E. (2015). Situación actual en el control de Fusarium spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales . *Acta Agronómica*, 194-205