

- Shimizu, M.; Bueno, L.; Rodrigues, R.; Sallowicz, F.; Sawaya, A.; Marques, M. 2006. **Essential oil of *Lithraea molleoides* (Vell.): chemical composition and antimicrobial activity.** Brazilian Journal of Microbiology; volumen 37, número 4, páginas 556-560.
- SIB (Sistema de Información de Biodiversidad) http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*schinus*molle#_MISIONES. Consultado 26/07/2011.
- Stahinger de Caramuti, O. 2006. **Integración y cooperación en el gran chaco trinacional: Articulación entre el espacio y sus actores.** Revista del Centro de Investigaciones en Ciencias Sociales, Vol 3 (2006). [<http://www.cartapacio.edu.ar>, visita: 21 de junio de 2011].
- Steibel, P.; Troiani, H. 2008. **La identidad de *Schinus fasciculatus* var. arenicola y rehabilitación de *S. sinuatus* (Anacardiaceae).** Bol. Soc. Argent. Bot. 43 (1-2): 157 - 166.
- Tortorelli, L.A. 1956. **Maderas y bosques Argentinos.** Ed. ACME, S.A.C.I. Buenos Aires, 910 pp.
- Toursarkissian, M. 1980. **Plantas medicinales de la Argentina - Bs. As., Ed. H. Sur,** 54 - 178 pp.
- Tvalchrelidze, N. 2009. **Oportunidades de Mercado para Productos de las Especies Forestales del Chaco Paraguayo.** Red de Inversiones y Exportaciones. 45 pags.
- Valdivia, P. 2010. **Desarrollo sustentable para el Chaco Argentino: Un Debate Urgente. 4º Seminario Tierra Agua y Bosque: Vida para la Región Chaqueña. 20 al 22 de octubre, Universidad Nacional de Córdoba.** 3 pags.
- VMABCC-BIOVERSITY. 2009. **Libro Rojo de Parientes Silvestres de Cultivos de Bolivia.** PLURAL Editores. La Paz. 344 p.

Ing. Agr. (Dra) Claudia Verónica Luna

Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)-Investigadora Adjunta CONICET. Cátedra de Silvicultura, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Sgto. Cabral 2131 W3402BKG, Corrientes. ARGENTINA. Correo electrónico: cluna@agr.unne.edu.ar

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*)

Blanca Estela Gómez-Luna; Alejandro Hernández-Morales; Carlos Hernán Herrera-
Méndez; Gabriela Arroyo-Figueroa; Lorena Vargas-Rodríguez; Víctor Olalde-Portugal

Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3

Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 97-102.



e-revist@s

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*)

ISOLATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA OF GUAVA PLANTS (*Psidium guajava*)

Blanca Estela **Gómez-Luna**¹; Alejandro **Hernández-Morales**¹; Carlos Hernán **Herrera-Méndez**¹; Gabriela **Arroyo-Figueroa**¹; Lorena **Vargas-Rodríguez**¹; Víctor **Olalde-Portugal**².

¹Profesor Investigador, Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Departamento De Ingeniería Agroindustrial, Privada de Arteaga S/N, Zona Centro CP 38900, Salvatierra Guanajuato. bgomezl2000@yahoo.com.mx. ²Investigador, Cinvestav-IPN Unidad Irapuato, Libramiento Norte Km. 9.6 Carretera Irapuato-León, Irapuato Guanajuato.

RESUMEN

La producción de guayaba para el 2008 en el estado de Guanajuato fue de 177 Ha de superficie sembrada e igual número de superficie cosechada, producción en 1,130.80 Ton. En las prácticas agrícolas tradicionales se ha hecho un uso excesivo de fertilizantes minerales, los que, si bien es cierto, garantizan una buena producción son costosos y llegan a causar desequilibrios en los agroecosistemas por la contaminación del suelo, agua, y de los alimentos. En este trabajo se evaluó el efecto de cepas de *Bacillus subtilis* como promotora de crecimiento de plantas en plantas de guayaba en condiciones de invernadero. Se utilizaron tres cepas, se inocularon en maceta con la planta de guayaba. Se midió la altura, número de ramas y hojas. De 2 huertos de guayaba se tomaron muestras de suelo para el aislamiento y caracterización de rizobacterias. Se utilizó un medio selectivo con 1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano y se seleccionaron las bacterias con la actividad de ACC desaminasa. A los aislados se les determinó resistencia a antibióticos, confrontación con hongos fitopatógenos, pruebas de crecimiento de plantas in vitro y perfiles metabólicos BIOLOG. Se encontraron 30 de aislados con actividades ACC, 7 tienen efecto de control biológico y 5 presentaron efecto en el desarrollo de la raíz in vitro. El uso de rizobacterias promotoras de crecimiento son una excelente alternativa de mejora de la producción de guayabas, cultivo del que se conoce muy poco de la microflora asociada a su rizósfera y del papel ecológico que tienen en suelo.

Palabras clave: Frutales, Rizósfera, *Psidium guajava*

SUMMARY

Guava production for 2008 in the state of Guanajuato was 177 ha in area planted and the same number of area harvested, production in 1,130.80 Ton. In traditional farming practices have made excessive use of mineral fertilizers, which, if it is true, ensure a good production are expensive and come to cause imbalances in agroecosystems by contamination of soil, water, and food. In this work we evaluated the effect of *Bacillus subtilis* strains as plant growth promoter rhizobacteria in guava plants under greenhouse conditions. We used three strains were inoculated potted plant with guava. We measured the height, number of branches and leaves. Guava orchards of 2 then display of soil were taken for the isolation and characterization of rhizobacteria. Selective medium was used with 1 - carboxylic acid, -1 - aminocyclopropane and selecting bacteria with ACC desaminase activity. For the isolates were determined antibiotic resistance, confrontation with fungal pathogens, plant growth tests in vitro and BIOLOG metabolic profiles. We found 30 isolates with ACC activities, 7 have the effect of biological control and 5 had effect on root development in vitro. The use of growth promoting rhizobacteria are an excellent alternative for improving the production of guavas, growing very little is known of the microflora associated with the rhizosphere and the ecological role they have in the ground.

Key words: Fruit, Rhizosphere, *Psidium guajava*

INTRODUCCIÓN

La guayaba (*Psidium guajava*) es un árbol frutal cultivado en las regiones tropicales de América, Asia y Oceanía, cuyos frutos son consumidos por su agradable sabor y valor alimenticio, aportando nutrimentos tales como flavonoides, carotenoides, vitaminas A, B y C, terpenoides, compuestos volátiles y fibra, los cuales son importantes para la dieta humana gracias a sus propiedades como antioxidantes, antidiarreicos, antimicrobianos, entre otras (Vargas-Alvarez, 2006). En México, la guayaba se cultiva en huertos en una superficie mayor a 22,000 hectáreas, distribuidas en los estados productores: Michoacán, Aguascalientes, Zacatecas, Estado de México, Querétaro, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Tabasco, Durango, Guanajuato, Colima, Puebla, Veracruz, Chiapas, Querétaro, Hidalgo, Sinaloa, Morelos y Baja California Sur, los cuales en conjunto generan 48,800 empleos directos, una producción de 225,000 toneladas anuales con un costo aproximado de 830

millones de pesos, constituyendo una de las actividades económicas importantes del país (SAGARPA, 2011). La demanda del fruto fresco es en mayor proporción en las centrales de abastos, supermercados y establecimientos de las principales ciudades del país: México, Guadalajara, Monterrey, Tijuana, Mexicali y la zona de La Laguna, en el Estado de Coahuila (INIFAP, 2008). Además la industria alimentaria, demanda frutos de calidad para la elaboración de jugos, néctar, ates, mermeladas, entre otros productos para el consumo nacional (SAGARPA, 2011).

En el estado de Guanajuato la producción anual de guayaba es de 1,131 toneladas, cantidad representativa a nivel nacional que lo ubica entre los 10 estados con mayor producción (SAGARPA, 2008). Dentro del estado, el municipio de Salvatierra cuenta con las condiciones climáticas y de suelos adecuados para el desarrollo de diferentes variedades de guayaba, los cuales durante mucho tiempo han sido utilizados en la elaboración de dulces y conservas para sustento económico de los pobladores. Sin embargo en los últimos años la producción de guayaba ha disminuido drásticamente por diversos factores tales como las sequías, mala calidad del agua de riego, los altos costos de servicio de agua, las enfermedades y plagas que merman la calidad del fruto (Reyes-Barrera *et al.*, 2011). Dada esta problemática es necesario establecer estrategias biotecnológicas que permitan mejorar la calidad y apariencia del fruto para hacerlo más atractivo al consumidor e incrementar la demanda del producto.

En el suelo existe gran diversidad de microorganismos benéficos para el desarrollo y producción de las plantas, entre los que se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas PGPR por su acrónimo en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (Kloepper *et al.*, 1978; Glick, 1995; Glick, 1999); las cuales constituyen excelentes alternativas biotecnológicas para mejorar el rendimiento de cultivos de importancia agronómica. Las PGPR ejercen efectos benéficos en las plantas a través mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. La promoción directa ocurre cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la toma de ciertos nutrimentos a partir del ambiente (Glick, 1995; Glick, 1999; Jiménez-Delgado, 2004); mientras que el mecanismo indirecto se lleva a cabo cuando las PGPR disminuyen o previenen el efecto deletéreo de fitopatógenos mediante control biológico (Glick, 1995; Glick, 1999). Las PGPR han sido ampliamente utilizadas en algunos cultivos de importancia agrícola donde se ha demostrado que incrementan el rendimiento y la calidad de frutos (Pulido *et al.*, 2003); así como la vida de anaquel como en el caso del tomate (Mena-Violante, 2007). Sin embargo, en el caso de árboles frutales las PGPR han sido poco estudiadas; en lo que respecta a árboles de guayaba se desconoce la diversidad de bacterias rizosféricas y sus efectos promotores del crecimiento (Ramírez *et al.*, 2003). Por lo que en este trabajo se propuso el aislamiento y caracterización de la diversidad microbiana asociada al cultivo de guayaba con el fin de seleccionar una cepa que sea factible para aplicación como un biofertilizante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento en invernadero con cepas de *Bacillus subtilis*.

Se utilizaron tres cepas de *Bacillus subtilis* denominadas DN, MZ y BH del laboratorio de Bioquímica Ecológica a cargo del Dr. Víctor Olalde Portugal del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Se inocularon las plantas de guayaba (diez macetas por cepa) con cada una y un control solo con riego por 7 meses con dos inoculaciones durante ese período. Se evaluaron la altura, número de ramas y de hojas de cada planta de guayaba.

Muestreo de suelo de huertos de Guayaba.

Se seleccionaron dos huertos de guayaba ubicados en el municipio de Salvatierra Guanajuato, de los cuales se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de cinco puntos en cada huerto. Las muestras de

suelo se almacenaron en bolsas de plástico y se guardaron a 4 °C hasta su análisis. El muestreo se realizó en el mes de mayo 2011, correspondiente a la temporada de sequía.

Aislamiento y caracterización de rizobacterias con actividad de ACC desaminasa.

Las muestras de suelo se utilizaron para aislar rizobacterias en medio selectivo para actividad de la enzima ACC (1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano) desaminasa. El medio de cultivo contiene por litro 4 g KH_2PO_4 , 6 g NaHPO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 1 mg FeSO_4 , 10 μg B_12 , 10 μg MnSO_4 , 50 μg CuSO_4 , 50 μg MoO_3 , 50 μg ZnSO_4 , glucosa 0.2%, ac. glucónico 0.2%, ac. cítrico 0.2%, agar bacteriológico al 2% y 1- ácido carboxílico, -1- aminociclopropano (SIGMA) estéril de 3mM como única fuente de nitrógeno (Penrose y Glick, 2003). Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de las diferentes muestras de suelo en una dilución 1:100 utilizando el equipo *Automated Spiral Plater* 4000. A los aislados obtenidos se les realizó la tinción de Gram y se prosiguió con su caracterización.

Resistencia a antibióticos.

Los aislados de las rizobacterias se crecieron en agar nutritivo y se colocaron multidiscos combinados BIO-RAD. Las placas se incubaron a 28 °C por 24 h; transcurrido el período de incubación se determinó la sensibilidad a los antibióticos midiendo el diámetro del halo de inhibición.

Perfiles metabólicos.

Se utilizaron microplacas BIOLOG que contienen 95 fuentes de carbono distintas, las placas GN2 se utilizaron para la caracterización de los aislados Gram negativos, mientras que las GP2 para los aislados Gram positivos. Los aislados seleccionados se cultivaron en el medio BUG por 24 h a 28°C de la compañía BIOLOG. Se prepararon 20 ml de solución de NaCl al 0.85% estéril, se tomó muestra de la cepa inoculada en el medio BUG en NaCl hasta una transmitancia de 52% GN y 20-30% GP ± 3 %, se inocularon en las microplacas BIOLOG Gram positivas o Gram negativas según el aislado, de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las microplacas se incubaron a 28°C y se les tomó lectura de absorbancia a las 24 h con el lector de microplacas Biolog y el software ML3420, para determinar los perfiles metabólicos y la identificación de la cepa.

Efecto de antibiosis de las rizobacterias contra hongos fitopatógenos.

Se seleccionaron algunos aislados de rizobacterias y se confrontaron contra diversos hongos fitopatógenos: *Sclerotium sp*, CPH8 *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Rhizoctonia sp* CPH1 del chile poblano, *Bipolaris sp* y *Colletotrichum sp* IR-MZ-LR del cepario del Laboratorio de Bioquímica Ecológica del Cinvestav-IPN Unidad Irapuato. Las pruebas de antibiosis se realizaron en medio PDA a 28°C por 24 h.

Efecto de germinación y promoción de crecimiento de las rizobacterias en plantas.

Para la evaluación del efecto en la germinación; los aislados seleccionados se inocularon en 25 ml de extracto de papa, se agregaron 15 semillas de pepino al cultivo y se agitaron por 20 min, como control un grupo de semillas se agitaron en caldo estéril sin inóculo. Las semillas se colocaron en cajas Petri con papel húmedo estéril, se incubaron a 28°C por 20 h y se calculó el % de germinación. Para evaluar el efecto promotor de crecimiento, se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* en medio de Murashige-Skoog al 20% suplementado con sacarosa al 1% y agar al 1%, se colocaron semillas en placas con el medio e incubaron en cámara de crecimiento a 24°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad por 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *Bacillus subtilis* tuvieron un mayor crecimiento con respecto al control, pero las cepas DN y MZ tuvieron más del doble, como se indica Figura 1.

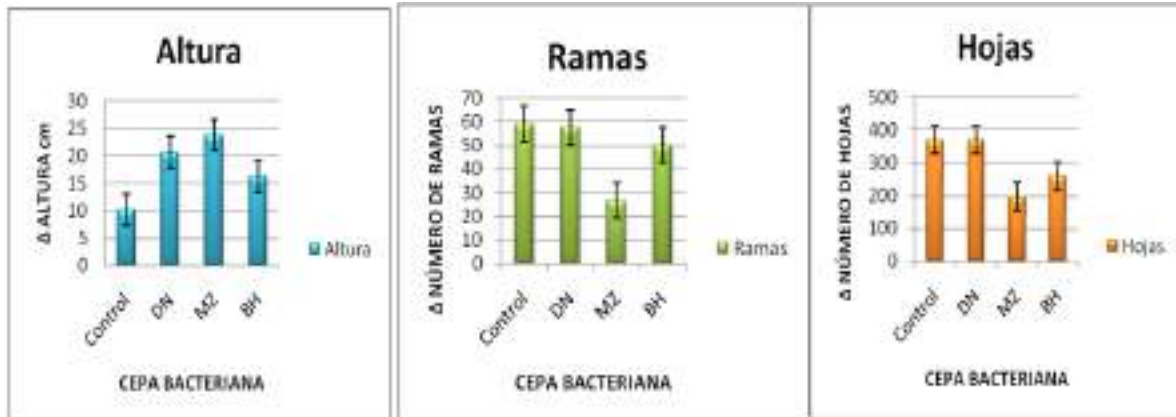


Figura 1. Efecto de cepas de *Bacillus subtilis* DN, MZ y BH sobre el desarrollo de plantas de guayaba en altura, número de ramas y hojas. Las barra indica el error experimental.

En el número de ramas, la cepas de *Bacillus subtilis* no mostraron diferencia significativa con el control a excepción de la cepa MZ tuvo el menor número de ramas como se indica figura 2. Con respecto al número de hojas, la cepa DN y el Control tuvieron los mismos resultados figura 3.

Del suelo de los huertos de guayaba muestreados se obtuvieron 30 aislados con actividad de ACC desaminasa, los cuales se caracterizaron por tinción de gram, se encontró que 20 aislados fueron gram positivos y 10 aislados fueron gram negativos. Los resultados de los antibiogramas dieron un grupo de 7 aislados sensibles a todos los antibióticos y el resto dieron patrones diferentes de sensibilidad y resistencia, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Determinación de la resistencia/sensibilidad de los aislados bacterianos a antibióticos.

Cepa	Gram	Antibiótico											
		AK	AM	CF	CRO	CL	DC	ENX	E	GE	NET	PE	SXT
A2b	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2d	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2c	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A3d	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A3.1d	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A3a	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A2.1a	-	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R
A3.1c	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
A6a	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R

AK amikacina (30 μ g), AM ampicilina (10 μ g), CF cefalotina (30 μ g), CRO ceftriaxona (30 μ g), CL cloranfenicol (30 μ g), DC dicloxacilina (1 μ g), ENX enoxacina, E eritromicina (15 μ g), GE gentamicina (10 μ g), NET netilmicina (30 μ g), PE (10 U), SXT trimetoprin-sulfametoxazol (25 μ g). R resistente, S sensible.

La identificación de los aislados por perfiles metabólicos BIOLOG de los aislados gram negativos dieron porcentajes de similitud a los géneros: *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*; los aislados gram positivos dieron identificación de hasta 96% de similitud del género *Bacillus* y varias especies entre ellas *cereus*, *thuringensis*, *mycoides*, *megaterium*. Los perfiles metabólicos además indicaron que, de los aislados gram positivos el A2d es la presente

mayor capacidad metabólica al utilizar más fuentes de carbono con un 68 % y de los aislados gram negativos el aislado A2c fue de mayor capacidad metabólica con un 14 %. De las pruebas de antibiosis, 7 aislados detuvieron el crecimiento de hongos fitopatógenos: *Sclerotium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Bipolaris sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* De la eficiencia en germinación de semillas de pepino, la cepa A2c dio un 100% de germinación en 20 h comparado con el control con un 46%. En la prueba de desarrollo de la raíz, la cepa A3a dio el mayor desarrollo en longitud de la raíz y formación de la roseta en *Arabidopsis thaliana* hasta tres veces más comparado con el control, cuadro 2.

Cuadro2. Efecto de Germinación, Promoción de Crecimiento y antibiosis.

Cepa	% Germinación	Desarrollo de la Raíz (cm)	Antibiosis
A2.1a	67	1	S, R, A
A2d	93	1	B
A2c	87	2.7	R, B, C
A2b	80	1	R, F
A3d	73	2.7	F
A3.1c	80	3	S, R
A3a	100	2.6	C, F
A3.1d	87	2.7	NE
A6a	93	2.8	R
Control	47	1	NE

A) *Alternaria sp.*, B) *Bipolaris sp.*, C) *Colletotrichum sp.*, F) *Fusarium sp.*, R) *Rhizoctonia sp.*, S) *Sclerotium sp.*, NE no hay efecto.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos indican la necesidad de explorar la microflora de suelo de frutales que pueden ser utilizados como herramientas benéficas en la producción de plantas de guayaba. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas aisladas de suelos de guayaba demostraron ser una excelente opción para formular un biofertilizante específico para la producción de guayaba y con esto contribuir al desarrollo del municipio en Salvatierra, Gto., mejorando la producción de materia prima para la producción de dulces tradicionales de guayaba.

LITERATURA CITADA

- Glick, B.R., 1995. **The enhancement plant growth free-living bacteria.** Can. J. Microbiol. 41:109-117.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, O., Penrose, D.M. 1999. **Biocontrol Mechanism. Chapter 7. In Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria.** Ontario Canada. Imperial Collage Press pp. 215-248.
- INIFAP, F. G. 2008. **Transferencia de tecnología para la optimización de la producción frutícola en pequeña escala en Guanajuato (SIFP: 11-2005-2461).** Guanajuato: INIFAP, FGP: 1-18.
- Jiménez-Delgadillo, M.R. 2004. **Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** Tesis de Doctorado en Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. México.
- Mena-Violante, H.G, Olalde-Portugal, V. 2007. **Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs.** Scientia Horticulturae, 113:103–106.
- Penrose D., Glick B. 2003. **Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria.** Physiologia plantarum. 118:10-15.

- Pulido, L.E., Medina, N., Cabrera, A. 2003. **La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y Cebolla (*Allium cepa* L.). I. Crecimiento vegetativo.** Cultivos Tropicales. 24(1):15-24.
- Ramírez, A., Cruz, N., Franchialfaro, O. 2003. **Uso de Bioestimuladores en la reproducción de guayaba (*Psidium guajava* L.). Mediante el enraizamiento de esquejes.** Cultivos Tropicales. 24(1):59-63.
- Reyes Barrera, D. M., Gómez Luna, B. E. 2011. **Estudio Socioeconómico de la Guayaba en el Municipio de Salvatierra, Gto.** Memorias del Verano de la Investigación Científica UG. 2103-2112.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura y Recursos Pecuarios. 2011. **Crece Producción de Guayaba Destinada a Exportación.** México: 1-3.
- Vargas-Alvarez, D., Soto-Hernández, M., González-Hernández, V.A., Engleman, M., Martínez-Garza, A. 2006. **Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.).** Agrociencia, 40:109-115.

Dra. Blanca Estela Gómez Luna

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. Correo electrónico: bgomezl2000@yahoo.com.

Dr. Alejandro Hernández Morales

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dra. Gabriela Arroyo Figueroa

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dra. Lorena Vargas Rodríguez

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Víctor Olalde Portugal

Investigador Titular. Laboratorio de Bioquímica Ecológica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

ANTAGONISMO IN VITRO DE AISLADOS BACTERIANOS DE FRESA COMERCIAL Y SILVESTRE VS. *Botrytis cinerea* Y *Rhizopus stolonifer*

Rosa I. Plascencia-Tenorio; Víctor Olalde-Portugal; Hortencia G. Mena-Violante; Luis
F. Ceja-Torres; José Venegas- González; Guadalupe Oyoque- Salcedo y
M. Valentina Angoa- Pérez

Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3
Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 103-110.



e-revist@s

ANTAGONISMO IN VITRO DE AISLADOS BACTERIANOS DE FRESA COMERCIAL Y SILVESTRE VS. *Botrytis cinerea* Y *Rhizopus stolonifer*

ANTAGONISM IN VITRO OF BACTERIAL ISOLATES FROM COMERCIAL AND WILD STRAWBERRY VS. *Botrytis cinerea* AND *Rhizopus stolonifer*

Rosa I. Plascencia-Tenorio¹; Víctor Olalde-Portugal²; Hortencia G. Mena-Violante¹; Luis F. Ceja-Torres¹; José Venegas-González¹; Guadalupe Oyoque-Salcedo¹; M. Valentina Angoa-Pérez¹.

¹CIIDIR IPN Michoacán. Justo Sierra No. 28, col centro, CP 59510, Jiquilpan, Michoacán, México. ²Investigador titular, CINVESTAV IPN Irapuato. Carretera Irapuato-León, Km 9.6. Libramiento norte, CP 36000, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

La fresa es una fruta no climatérica, con una vida postcosecha muy corta. La pérdida de calidad del fruto puede deberse, entre otros factores a daños ocasionados por fitopatógenos. Entre los más comunes se encuentran los hongos causantes del moho gris (*Botrytis cinerea*), y podredumbre blanca (*Rhizopus stolonifer*) dos fitopatógenos de gran impacto por su velocidad de crecimiento la cual les permite colonizar la superficie de los mismos ocasionado importantes pérdidas económicas. Una alternativa para el control de los daños por patógenos en frutos postcosecha es el uso de antagonistas microbianos que pueden estar presentes en la planta o el fruto pero en densidades bajas. En este estudio se aislaron bacterias de tejido foliar y frutos de fresa silvestre (*Duchesnea indica* Andr. Fock) y comercial. Se seleccionaron aquellos aislados que presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de ambos fitopatógenos *in vitro*. Se aislaron un total de 32 cepas de las cuales 15 provinieron de fresa silvestre y 24 de fresa comercial. Se obtuvieron solo nueve cepas con potencial biocontrolador para uno o ambos patógenos. Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial oscilaron entre 67.1% y 81.7% para *Botrytis cinerea* y 45.5% a 73.2% para *Rhizopus stolonifer*. Estos fueron obtenidos por cuatro aislados dos obtenidos de fresa silvestre y dos de comercial, todos ellos con capacidad para controlar a ambos fitopatógenos.

Palabras clave: Biocontrol Postcosecha, moho gris, podredumbre blanca, frutillas

SUMMARY

Strawberry is a non-climacteric fruit, with a short postharvest life. The loss of fruit quality may be due, among other factors to damage caused by pathogens. Among the most common fungi are causing gray mold (*Botrytis cinerea*) and white rot (*Rhizopus stolonifer*) two phytopathogenic impact on their growth rate which allows you to colonize the surface of these caused major economic losses. An alternative to control damage in fruit postharvest pathogens using microbial antagonists may be present in the plant or fruit, but at low densities. In this study bacteria were isolated from leaf tissue and wild strawberry fruit (*Duchesnea indica* Andr. Fock) and comercial strawberry. Those isolates that were selected had the highest percentages of inhibition of mycelial growth of both pathogens *in vitro*. We isolated a total of 32 strains of which 15 came from wild strawberry and 24 comercial strawberry. Only nine strains were obtained with biocontrol potential for one or both pathogens. The highest percentages of mycelial growth inhibition ranged from 67.1% and 81.7% for *Botrytis cinerea* and 45.5% to 73.2% for *Rhizopus stolonifer*. These were obtained from four isolates two of them from wild strawberry and the others from comercial strawberry, all with ability to control both pathogens.

Key words: Biocontrol postharvest, gray mold, white rot, berries

INTRODUCTION

La fresa (*Fragaria x ananassa*), es quizás uno los frutos más apetecibles por su exquisito sabor (Howard *et al.*, 1992) y al igual que otras frutillas, posee alto valor nutricional. Es fuente importante de fibra dietética, vitaminas y minerales además de compuestos fitoquímicos esenciales para mantener la salud humana (Cai *et al.*, 2006; Cheel *et al.*, 2007; García *et al.*, 2004; Yildiz y Eyduran, 2009). Como resultado de estas propiedades nutraceuticas, en años recientes su demanda ha incrementado. México es uno de los países productores de fresa, colocando más del 90 % de sus exportaciones de fruta fresca en Estados Unidos (SAGARPA, 2010). En México, la producción de esta frutilla tiene un lugar relevante en la agroindustria, ya que genera empleos y divisas.

Debido a que se trata de un fruto no climatérico, y altamente sensible al daño mecánico, lo cual la hace muy susceptible a la invasión de algunos organismos patógenos posee una vida postcosecha muy corta. Entre las causas de pérdida de calidad de los frutos de fresa se encuentra su sensibilidad al deterioro por ataque de hongos fitopatógenos, entre los que se encuentran

Botrytis cinerea y *Rhizopus stolonifer*, los cuales ocasionan importantes pérdidas post-cosecha (SAGARPA 2008).

B. cinerea es también conocido como podredumbre gris, debido a que produce una gran cantidad de micelio gris de apariencia polvosa; el hongo produce esclerocios que son estructuras de resistencia planas duras y de color negro, que permiten que el organismo se mantenga latente en el suelo, desarrollándose sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Puede propagarse en las semillas infectadas con esclerocios y germina en climas húmedos a temperaturas entre los 18°C y 23°C, produciendo la infección (INFOAGRO, 2002), aunque puede crecer a bajas temperaturas de almacenamiento (Espinosa, 2006). Este patógeno afecta a más de 235 especies de plantas como ornamentales, frutales, hortalizas, por mencionar algunas y puede atacar desde la semilla, bulbos, tallos, hojas, flores, raíces y frutos postcosecha. Se estima que alrededor del 20% de la cosecha mundial, es afectada por *B. cinerea* ocasionando una inversión de billones de euros anuales para su control (Genoscope, 2005).

Rhizopus stolonifer por su parte, es agente causal de la enfermedad conocida como pudrición blanda, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas; puede crecer y desarrollarse a temperaturas que van desde los 10 hasta los 33°C y humedades relativas variables, se ve seriamente afectado por temperaturas menores a los 5°C (Pontón, 2002). Es un hongo que se encuentra como saprófito sobre pedazos de fruta o cualquier material orgánico, su micelio es aéreo, se puede reproducir sexual y asexualmente por medio de dos estructuras morfológicamente similares, el resultado de esta fusión es la formación de una zigospora, la cual tiene paredes gruesas que le dan resistencia para poder mantenerse latentes en el suelo por varios meses, soportando condiciones de escases de agua y altas temperaturas, hasta que encuentra las condiciones necesarias para desarrollarse (Adaskaveg *et al.*, 2002; Rivera, 1999). Durante muchos años, estos patógenos han sido controlados por aplicación de fungicidas sintéticos (Zhao *et al.*, 2010). Sin embargo, existen reportes de que dada su alta eficacia y facilidad de uso (Jaramillo *et al.*, 2007) han provocado el uso inmoderado de tales agroquímicos, lo cual ha traído como consecuencia un riesgo potencial para la salud humana y de manera adicional el desarrollo de resistencia de los patógenos a dichos productos (Dufour *et al.*, 2011; Bardas *et al.*, 2010). En México, se han aplicado plaguicidas desde fines del siglo XIX (Sertox, 2004). Por otro lado, sus efectos dañinos se han extendido a diversos ecosistemas (Jaramillo *et al.*, 2007).

Por lo anterior, es necesario buscar alternativas naturales que permitan el control de los patógenos postcosecha permitiendo al mismo tiempo reducir el uso de agroquímicos. En este sentido el control biológico se perfila como una opción (Sharma *et al.*, 2009). Uno de los grupos de microorganismo evaluados como controladores de patógenos en postcosecha de frutas y vegetales, han sido las bacterias antagonistas (Abraham *et al.*, 2010; Arrebola *et al.*, 2010). Destacan las pertenecientes al género *Pseudomonas*, debido a su capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios tóxicos a hongos y bacterias fitopatógenos, como los antibióticos (Hernández *et al.*, 1999). En este sentido existen reportes del uso de microorganismos como biocontroladores de *Botrytis cinerea* como: *Actinobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Pseudomonas ssp.* en uva, además de *Gliocladium roseum* para combatir *Botrytis* en fresa (Chaves y Wang, 2004); en lo que respecta a *Rhizopus stolonifer*, microorganismos como *Trichoderma harzianum*, *Trichosporon pullulans*, *C. laurentii* entre otros demostraron ser excelentes biocontroladores de este patógeno (Guédez *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). Debido a los efectos positivos antes mencionados, la necesidad de buscar alternativas amigables con el medio ambiente, que no afecten la salud del consumidor, así como por la importancia de este fruto a nivel nacional y mundial, el uso de bacterias antagónicas aisladas de frutos de fresa silvestres y de fresa comercial pudiera ser una opción a considerar para el control de dos de las enfermedades de mayor importancia a nivel postcosecha. Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar bacterias de tejidos de fresa tanto silvestre como comercial con potencial biocontrolador hacia *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en ensayos in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de fitopatología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán y en el Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV Irapuato.

Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*

De frutos infectados con *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*, se tomó 1 cm³ de tejido enfermo con micelio, el cual se colocó en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA), las cuales se incubaron a 18 °C, para el caso de *B. cinerea* y 26 °C para *R. stolonifer* durante 48 h. Una vez desarrollado el micelio, se tomaron muestras de ambos organismos realizando improntas con cinta adhesiva en un portaobjetos, y sobre estas se colocó una gota de azul de tripano. Las preparaciones fueron observadas al microscopio con la finalidad confirmar la presencia de *Botrytis cinerea*, usando las claves reportadas por Barnett y Hunter, (1988) y para *Rhizopus stolonifer* las claves reportadas por Mass, (1988) y Schipper, (1984). Una vez confirmada la identidad de ambos patógenos, se tomó 1 cm³ de micelio de cada uno, se colocó en placas con PDA y se incubó a 18 °C y 26 °C por 48 h. La purificación de ambos fitopatógenos se realizó por corte de punta de hifas, las cuales se colocaron en medio PDA, incubándose a 18 °C y 26 °C durante 48 h respectivamente.

Prueba de patogenicidad

Para confirmar la virulencia de las cepas *B. cinerea* y *R. stolonifer* se utilizaron frutos de fresa comercial previamente lavados con agua destilada y desinfectados con hipoclorito de sodio al 6 %; los frutos se enjuagaron nuevamente con agua destilada y se secaron con toallas de papel estériles. Los frutos fueron colocados en recipientes desechables estériles a los cuales se aplicó por aspersión 1 ml de una suspensión 7x10⁵ esporas ml⁻¹, y 4.7 x 10⁵ esporangios ml⁻¹ del hongo correspondiente (*Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*) y se incubaron a 18 °C y 26 °C respectivamente por 5 días, con observaciones diarias para verificar la virulencia del patógeno. Cada charola con 10 frutos fue considerada una unidad experimental y se hicieron 3 réplicas por patógeno. La severidad de la infección se determinó utilizando una escala de severidad con 4 grados de daño con base en las siguientes categorías: 1=0-24%, 2=25-49%, 3=50-74%, 4=75-100%, de daño visual por fruto. El índice de severidad de la infección se determinó con la ecuación descrita por Pérez *et al.* (1995):

Donde:

Xi=Número de frutos enfermos por cada grado de daño

1, 2, 3, 4: grado de daño en la escala manejada

N= Número total de frutos por unidad experimental

Aislamiento de bacterias antagónicas

El aislamiento se realizó tanto de plantas de fresa comercial, colectadas en un campo de cultivo de Zamora, Michoacán como de una especie silvestre (*Duchesnea indica* Andr. Fock) colectada en la localidad de Cherán, Michoacán.

El material vegetal se enjuagó con agua corriente, se desinfectó por inmersión en hipoclorito de sodio al 3% por 1 min, se enjuagó con agua destilada estéril y se secó con toallas estériles. Una parte del tejido foliar fue cortado en trozos de 1 cm² aproximadamente, los cuales se colocaron en cajas petri con PDA e incubaron a 26°C, hasta el desarrollo de las colonias; otra parte del tejido se colocó en un homogenizador estéril y se molió con 9 ml de agua peptonada al 2%; del extracto se tomaron 0.5 mL, los cuales fueron colocados en cajas petri con PDA. Posteriormente se tomaron muestras de igual volumen para realizar diluciones 10¹, 10², 10³, 10⁴, las cuales también fueron sembradas en placas con PDA y se incubaron a 26 °C por 72 h. En el caso del fruto se hicieron improntas del mismo en placas petri e incubaron a 26 °C por 72 h. Una vez

obtenido el desarrollo bacteriano, las colonias se picaron con palillos estériles y se pasaron a cajas con PDA las cuales se incubaron a 26°C por 48 h.

Evaluación de la Actividad antagónica in vitro

La evaluación de la actividad antagónica de los aislados bacterianos obtenidos de fresa comercial y silvestre hacia los dos patógenos estudiados se realizó mediante una prueba de confrontación dual en PDA. Cubos de 1 cm³ de micelio de *B. cinerea* y *R. stolonifer* fueron colocados en el centro de placas Petri, alrededor de las cuales se inocularon los distintos aislados bacterianos obtenidos usando un palillo estéril. Se hicieron tres repeticiones por placa. Las placas se incubaron a 18 °C por cuatro días. La zona de inhibición del crecimiento micelial (cm) fue medida con ayuda de un vernier cada 24 h tomando la distancia del diámetro del halo entre la bacteria y el hongo. Placas con PDA inoculadas solo con el patógeno correspondiente fueron utilizadas como controles. El crecimiento micelial fue expresado como diámetro promedio (cm). La actividad antagónica fue calculada como porcentaje de inhibición usando la fórmula reportada por Singh (2003):

Donde:

R1= Crecimiento radial del patógeno en la placa control

R2= Crecimiento radial del patógeno con la bacteria

El experimento se realizó dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto *Botrytis cinerea* como *Rhizopus stolonifer* son causantes de enfermedades postcosecha en muchos frutos y vegetales. Los resultados obtenidos de la identificación de los aislados coinciden con los reportados en otros trabajos para estos patógenos (Mass, 1998; Barnett y Hunter, 1998).

Características de *Botrytis cinerea*

El hongo presentó un micelio de color gris característico, el micelio creció al ras del medio de cultivo, también presentó esclerocios de forma irregular y de color negro en cultivos con un tiempo de dos semanas de desarrollo. La velocidad de crecimiento fue de 96 h de incubación para cubrir toda la placa petri. El micelio presentó conidióforos altos, septados, hialinos y ramificados, sobre los cuales se desarrollaron los conidios con forma ovoide generalmente y agrupados con aspecto de racimo de uvas. Estas características morfológicas coinciden con las reportadas por Barnett y Hunter (1998).

Características de *Rhizopus stolonifer*

Este hongo desarrolló un micelio de color blanco muy ramificado y aéreo, que posteriormente se tornó de color gris; también se pudieron observar a simple vista los esporangios de color negro. Su crecimiento fue más rápido que el de *Botrytis cinerea*, pues cubrió la placa petri en 48 h. El micelio produjo hifas cenocíticas, rizoides agrupados de 3 a 5 esporangióforos originados a partir de estolones, sobre los cuales se desarrollaron los esporangios que presentaron forma esférica a partir de los cuales se encontraron las esporangiosporas de color oscuro que al liberarse permitieron la observación de la columela. Estas características concuerdan con las reportadas por Maas, (1998).

Aislamiento de cepas bacterianas

Se aislaron un total de 39 cepas bacterianas de distintas áreas de la planta tanto silvestre como comercial, de las cuales 15 provinieron de tejido de fresa silvestre y 24 de tejido de fresa comercial, cuadro 1.

Cuadro 1. Aislados bacterianos procedentes de distintas áreas de plantas de fresa silvestre y comercial

Planta	Área de la cual se obtuvo el aislado	No. Total de aislados
Silvestre	Hoja	7
	Raíz	4
	Fruto	4
Comercial	Hoja	15
	Raíz	5
	Fruto	4

Evaluación de la Actividad antagónica in vitro

Es importante usar diferentes alternativas para controlar el proceso de infección en frutos de fresa. En este sentido, en este trabajo pudo observarse el efecto antagónico presentado por distintos aislados bacterianos contra uno o ambos patógenos in vitro.

De los 39 aislados bacterianos probados contra *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* en placa, nueve de ellos presentaron potencial biocontrolador para uno o ambos patógenos (Figura 1). De los nueve aislados cuatro mostraron una significativamente mayor actividad antagónica contra alguno de los patógenos evaluados ($p \leq 0.05$); dos procedentes de de tejido foliar de fresa comercial (FC4 y FC5) y una de tejido de fresa silvestre (FS3) mostraron un poder inhibitorio sobre *B. cinerea* en tanto que los aislados FC4 (de fresa comercial) y FS2 (obtenido de tejido de fresa silvestre) mostraron mayor biocontrol sobre *R. stolonifer*.

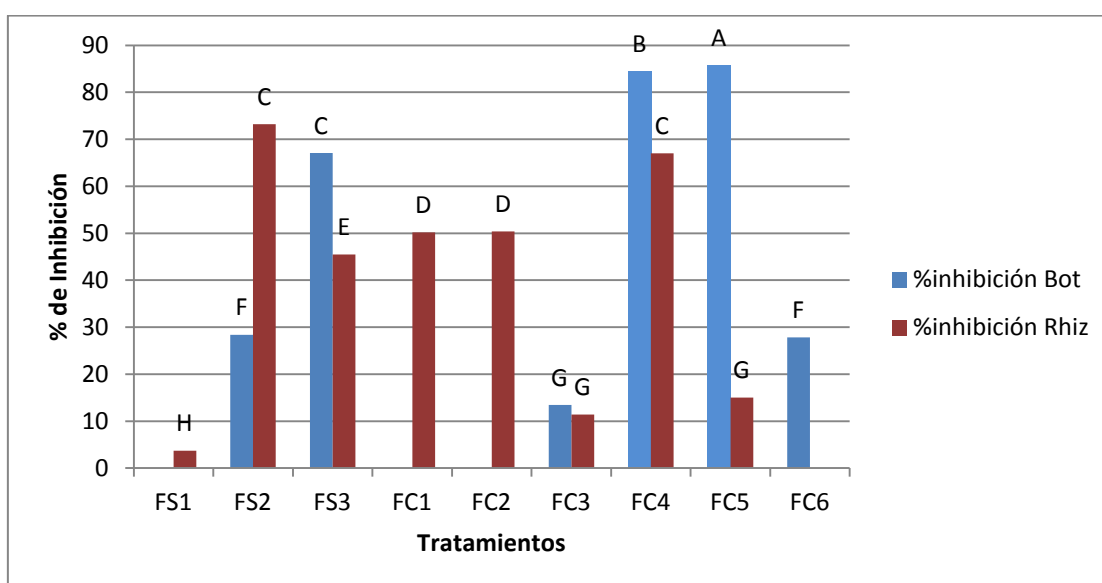


Figura 1. Cepas bacterianas con poder antagónico vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Se excluyó la cepa FC3 debido a que el diámetro presentado fue el menor en los dos patógenos mientras que en los demás el diámetro es mayor.

En general existen reportes que de que los mecanismos empleados por distintos microorganismos controladores de patógenos es a través de la producción de diversos metabolitos antifúngicos que contribuyen a la inhibición del crecimiento (Leelasuphakul et al., 2008; Abraham et al., 2010). Entre otros, la producción de sideróforos (Shanmugam et al., 2011), la liberación de antibióticos, la producción de enzimas líticas, el parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, y la inducción de resistencia (Janisiewicz y Korsten, 2002). Señalando que no siempre es un solo mecanismo el que utilizan, sino que en algunos casos pueden presentarse varios mecanismos.

Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial oscilaron entre 67.1% a 81.7% para *Botrytis cinerea* y 45.5% a 73.2% para *Rhizopus stolonifer*. Estos resultados coinciden e incluso superan a los reportados por Toledo *et al.*, (2002), quienes reportaron el potencial biocontrolador de una cepa de *Burkholderia cepacia* contra dos razas de *Fusarium sp*, encontrando que la cepa bacteriana produjo un 50.07% de inhibición de crecimiento de la raza 1 de *Fusarium sp*, mientras que para la raza 2, produjo un 48% de inhibición. Los autores atribuyeron el potencial biocontrolador a la producción de sustancias antifúngicas y sideróforos. Como puede verse los porcentajes de inhibición del 67.1% a 81.7% para *Botrytis cinerea* superaron con creces los reportados y del caso de *Rhizopus stolonifer* (45.5% a 73.2%) los igualaron y superaron para *Rhizopus stolonifer*, mostrando con ello el potencial de las cepas bacterianas obtenidas.

Por otro lado Mateluna (2006), en un estudio realizado con 42 cepas potencialmente biocontroladoras versus 5 cepas *Acetobacter aceti*, encontró que 14 de ellas permitieron porcentajes de 20,40 y 60% de inhibición al crecimiento y solo 2 manifestaron un control total del desarrollo de las cepas confrontadas. Los autores atribuyeron dicho potencial biocontrolador a la liberación de compuestos antibióticos. Estos porcentajes de inhibición fueron menores a los obtenidos en este trabajo. De igual manera, superan los porcentajes de inhibición reportados por Arrebola *et al.* (2010), usando aislados del género *Bacillus* para controlar a *Penicillium crustosum*, con un 33% de inhibición *in vitro* del patógeno a las 72 h de haber realizado el bioensayo. Finalmente, los resultados obtenidos son semejantes a los reportados por Leelasuphakul *et al.* (2008), quienes reportaron porcentajes de inhibición del micelio de *Penicillium digitatum* que fueron de 42% hasta 76% por producción de volátiles, y desde 84% hasta 99% al usar los extractos crudos de metabolitos de *B. subtilis* después de 72 h de incubación, esto de manera *in vitro*. Se propone que el uso de los extractos permitió el control gracias a la producción de antibióticos.

Por otro lado, no se descarta la posibilidad de que las cepas con mayor potencial biocontrolador obtenidas en este trabajo pudieran deber tal efecto al establecimiento de competencia por nutrientes, ya que *B. cinerea* es dependiente de los nutrientes, sus esporas requieren de ciertos nutrimentos para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas (Fernández-Larrea, 2001).

CONCLUSIÓN

Los nueve diferentes aislados bacterianos obtenidos tanto de tejidos de fresa comercial como silvestre exhibieron un alto porcentaje de actividad antagonica contra *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* o ambos en los ensayos in vitro, lo cual indica su potencial para ser usadas como biocontroladoras de dichos patógenos, no obstante hace falta realizar pruebas in vivo para confirmar dicha hipótesis.

LITERATURA CITADA

- Abraham, A., Laing, M.D., Bower, J.P., 2010. **Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit.** Biol Control. 53, 32-38.
- Adaskaveg, J.E., Förster, H., y Sommer, N.F. 2002. **Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops.** In: A. Kader (ed) Postharvest Technology of horticultural Crops. University of California. Oakland, California, USA. Pp 163-195.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Korsten, L., 2010. **Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus.** Biol Control. 53, 122-128.
- Bardas, G.A., Veloukas, T., Koutita, O., Karaoglanidis, G.S. 2010. **Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups.** Pest Manag Sci. 66, 967-973.
- Barnett, H.L y Hunter, B.B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi.** Fourth edition. The American Phytopathological Society. 218 pp.
- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. 2006. **Structure- radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants.** Life Sci. 78: 2872 – 2888

- Chaves N. y Wang A. 2004. **Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum***. Agronomía costarricense. 28:73-85.
- Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez JA, Caligari P, Schmeda-Hirschmann G. 2007. **Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler**. Food Chem. 102:36-44.
- Dufour, M.C., Fontaine, S., Montarry, J., Corio-Costet, M.F. 2011. **Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays**. Pest Manag Sci. 67, 60-69.
- Espinosa, M. 2006. **Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea***. Tesis para obtener grado de Doctor en Universidad de Cádiz. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Microbiología, Medicina preventiva y Salud pública. Fisiología y Genética. 223 pp.
- Fernández-Larrea V. O. 2001. **Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario**. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 62:96-100
- García A. M., de Pascual T. S., Santos B. C. (2004). **Evaluation of the Antioxidant Properties of Fruits**. Food Chem. 84:13-18
- Genoscope. 2005. **Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions**. <http://genoscope.cns.fr>.
- Guédez C., Cañizález L., Castillo C. y Olivar R. 2009. **Efecto antagonístico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp*)**. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 29:34-38.
- Hernández, A.N. y Santander J. L. 1999. **Producción, purificación y diagnóstico de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-1443**. Cultivos Tropicales. 20(1):21-25.
- Howard, C., J. Mass, C. Chandler y E. Albrechts. 1992. **Anthraco-nose of strawberry caused by *Colletotrichum complex* in Florida**. Plant Diseases. 76:976-981.
- INFOAGRO 2002. <http://www.infoagro.com/abonos/botrytis2.htm>
- Janisiewicz W y Korsten L. 2002. **Biological control of postharvest diseases of fruits**. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 411-441.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V.P., Guzmán, M., Zapata, M y Rengifo, T. 2007. **Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas**. Gobernación de Antioquía, MANA, CORPOICA, Centro de Investigación "La Selva". FAO 2007.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S. 2008. **Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit**. Postharvest Biol Technol. 48,113-21.
- Maas, J.L. 1998. **Compendium of strawberry diseases**. Second edition. The American Phytopathol Soc. (41), 98.
- Mateluna E. R. 2006. **Estudio de actividad antibacteriana de potenciales biocontroles sobre bacterias acéticas involucradas en la pudrición ácida de la uva**. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas. Memoria para Obtener título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile
- Pérez, M.N., flores, P.J., García, V.L, y Lozano, V.C. 1995. **Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marin, Nuevo León, México**. Revista Mexicana de Fitopatología. 13:1-9.
- Qin, G., Shiping, T., y Xu, Y. 2004. **Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeast in different storage conditions**. Postharvest Biol Technol. 31:51-58.
- Rivera Coto G. 1999. **Conceptos introductorios a la fitopatología**. Primera reimpression: editorial universidad estatal a distancia san José Costa Rica, 2007. 44-45 pp.
- SAGARPA, (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). 2008. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). 2010. **Abonos**. <http://www.sag.gob.hn/infoagro/cadenas/fichas/frutas/Ficha%20Tecnica%20Fresa.pdf>. Fecha de recuperación: 9 de noviembre del 2010, 2:46.
- Schipper, M.A. 1984. **A Revision of the Genus *Rhizopus***. Studies in Mycology. Serie No. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baam, The Netherlands. 34 P.
- Sertox. 2004. Revista de Toxicología en línea. <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf>
- Shanmugam, V., Atri, K., Gupta, S., Kanoujia, N., Singh Naruka, D. 2011. **Selection and differentiation of *Bacillus spp*. Antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici and *Alternaria solani* infecting Tomato**. Folia Microbiol. 56, 170-177.

- Sharma, R. R., Sing, D., Sing, R. 2009. **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review.** Biol Control. 50, 205-221
- Singh, G. 2003. **Studies on essential oils. Chemical and biocidal investigations on Tagetes erecta leaf volatile oil.** Flavour and Fragrance J. 18:62-65.
- Toledo, Y., Hernández, A., Alvarez, M., Martín, G. y Márquez R. 2002. **Determinación del efecto antagónico de una biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium sp.* en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus sp.*).** Cultivos tropicales. 23: 1-5.
- Yildiz, Ö., Peral-Eyduran, S. 2009. **Functional components of berry fruits and their usage in food technologies.** African J Agric Res. 4, 422-426.
- Zhao, Y., Tu, K., Tu, S., Liu, M., Su, J., Hou, Y., 2010. **A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi.** Int J Food Microbiol. 137, 106-110.
- Zhang, H., Zheng, X., y Yu, T. 2007. **Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*.** Food Control. 18:287-291.

M. en C. Rosa Isela Plascencia Tenorio

Egresada del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable del Centro Interdisciplinario de investigación para el Desarrollo Integral regional IPN Unidad Michoacán.

Dr. Víctor Olalde Portugal

Investigador Titular. Laboratorio de Bioquímica Ecológica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Investigador Titular. Centro Interdisciplinario de investigación para el Desarrollo Integral regional IPN Unidad Michoacán.

Dr. Luis Fernando Ceja Torres

Investigador Titular. Centro Interdisciplinario de investigación para el Desarrollo Integral regional IPN Unidad Michoacán.

Dr. José Venegas González

Investigador Titular. Centro Interdisciplinario de investigación para el Desarrollo Integral regional IPN Unidad Michoacán.

M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo

Investigador Asociado. Centro Interdisciplinario de investigación para el Desarrollo Integral regional IPN Unidad Michoacán.

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Investigador Titular. Centro Interdisciplinario de investigación para el Desarrollo Integral regional IPN Unidad Michoacán. valeangoa@hotmail.com

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *Heliopsis longipes* A.

Gray Blake, UNA PLANTA ENDÉMICA DEL ESTADO DE GUANAJUATO

Alejandro Hernández-Morales; Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez; Blanca Estela Gómez-Luna; Enrique Ramírez-Chávez; María del Rosario Abraham-Juárez; Gerardo Martínez-Soto y Jorge Molina-Torres

Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3

Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 111-118.



e-revist@s

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, UNA PLANTA ENDÉMICA DEL ESTADO DE GUANAJUATO

DETERMINATION OF INSECTICIDAL ACTIVITY OF *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, AN ENDEMIC PLANT OF GUANAJUATO STATE

Alejandro **Hernández-Morales**¹; Jackeline Lizzeta **Arvizu-Gómez**²; Blanca Estela **Gómez-Luna**¹; Enrique **Ramírez-Chávez**²; María del Rosario **Abraham-Juárez**³; Gerardo **Martínez-Soto**³ y Jorge **Molina-Torres**².

¹Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. Privada de Arteaga S/N, Zona Centro, CP 38900 Salvatierra Guanajuato. ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, CP 36500, Irapuato Guanajuato. ³Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Ex-Hacienda el Copal Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, AP 483, CP 36500, Irapuato Guanajuato.

RESUMEN

Los mosquitos constituyen la principal vía para la transmisión del paludismo que afecta la salud humana y ocasiona un impacto negativo en la economía dado que los tratamientos son costosos e imposibilitan laboralmente a los individuos enfermos. Una de las estrategias para minimizar la transmisión de esta enfermedad lo constituye el uso de insecticidas químicos los cuales a pesar de ser excelentes métodos para disminuir la población de insectos, ocasionan efectos adversos en el ser humano y en el medio ambiente. Por esta razón es necesario explorar otras alternativas, de bajo costo y amigables con el medio ambiente, como el uso de extractos de plantas, los cuales son fuente potencial de insecticidas de origen natural. En este trabajo se determinó el efecto insecticida de una planta endémica del estado de Guanajuato, *Heliopsis longipes* A. Gray Blake contra el mosquito *Anopheles albimanus*, vector del paludismo. Los resultados obtenidos demuestran que *H. longipes* A. Gray Blake tiene potencial insecticida para ser utilizada como una alternativa en el control el insecto-vector del paludismo.

Palabras clave: *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, Alcamidas, Insecticidas naturales.

SUMMARY

Mosquitoes are involved in transmission of infectious diseases like malaria which affect human health, causing economic losses due to expensive treatments and job incapacity of patients. Strategies to minimize transmission of this disease are the employ of chemical insecticides that are excellent methods to reduce insect populations; however it causes deleterious effects on human health and environmental damage. Therefore is necessary to explore harmless alternatives, such as plant extracts which are potential source of natural insecticides. In this work we evaluated insecticidal properties of *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against third instar larvae of *Anopheles albimanus*, malaria vector. Results showed that *H. longipes* A. Gray Blake has insecticide properties to control insect involved in malaria transmission.

Key words: *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, Alcamides, Natural insecticides.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos constituyen un problema de salud pública debido a que actúan como vectores para la transmisión de enfermedades infecciosas como el paludismo, el dengue y la filariasis; además de ser plaga causante de respuestas alérgicas como reacción cutánea local y reacciones sistémicas como angioedema y urticaria en los seres humanos (Sen-Sung *et al.*, 2003). En México los mosquitos hembra de *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. quadrimaculatus* y *A. aztecus* son los principales transmisores del paludismo, afectando regiones con abundante vegetación, terrenos cenagosos, zonas inundadas y valles pantanosos, entre otras regiones favorables para el desarrollo del vector; en donde no ha sido posible erradicar la enfermedad (Velázquez-Monroy *et al.*, 2003). Las estrategias de las instituciones de salud pública para el control del paludismo consisten en la aplicación de insecticidas químicos del tipo organofosforados y piretroides, los cuales a pesar de disminuir la población del insecto-vector, representan un riesgo potencial para la salud del hombre y un grave problema para el medio ambiente debido a que afectan la biodiversidad de los ecosistemas (Anónimo, 2008). Por otro lado, el uso continuo de estos productos ha ocasionado el desarrollo de resistencia en los mosquitos, lo cual dificulta el control del vector y conlleva a la

recurrencia de la enfermedad. Por estas razones surge la necesidad de explorar otras alternativas para controlar la población de insectos, minimizando los efectos adversos en el medio ambiente (Hay *et al.*, 2002; Maharaj *et al.*, 2011).

Las plantas representan una excelente alternativa para la búsqueda de insecticidas de mayor eficacia, rentabilidad y amabilidad con el medio ambiente; debido a que constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos, algunos de los cuales se ha demostrado que pueden actuar como insecticidas contra los estadios larval y adulto de los mosquitos; o bien como insectostáticos, inhibiendo el desarrollo normal de los insectos, minimizando así la población del vector. Dentro de las plantas con propiedades insecticidas se ha demostrado que el piretro, extraído de las flores de crisantemo *Chrysanthemum cinerariaefolium*, es eficaz para el control de insectos plaga (Casida, 1980); el árbol de neem *Azadirachta indica*, utilizado para tratar una amplia gama de enfermedades en el hombre y el ganado, posee actividad mosquitocida por lo cual se ha empleado para erradicar insectos-vectores de diferentes enfermedades (Shaan *et al.*, 2005). Por otro lado, especies del género *Tagetes* han mostrado ser efectivas como insecticidas contra los estadios larval y adulto de mosquitos; así mismo *Eclipta paniculata* muestra actividad larvicida; mientras que *Polyalthia longifolia* ambos efectos, larvicida e inhibidor del crecimiento de los mosquitos (Mittal *et al.*, 2003).

En México se estima que existen 300,000 especies vegetales siendo uno de los países con mayor riqueza florística en el mundo y uno de los más arraigados al uso de las plantas medicinales para el tratamiento de diferentes padecimientos (Toledo, 1994). Dentro de la diversidad de plantas del país, se ha demostrado que los extractos de la higuera *Ricinus communis*, el floripondio *Datura candida*, el poleo *Satureja laevigata*, el romero *Rosmarinus officinalis* y la ruda *Ruta graveolens* controlan insectos plaga a nivel de huerto familiar en cultivos de tomate, calabaza y frijol (Vázquez, 2005). En lo que respecta a la diversidad vegetal del estado de Guanajuato, se encuentra *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, cuyas raíces son utilizadas en la medicina tradicional como vermífugo, saborizante de alimentos, anestésico local para el tratamiento del “dolor de muela”, tratamiento para aftas bucales y el pie de atleta; entre muchas otras aplicaciones tradicionales en diferentes municipios de la Sierra Gorda del Estado de Guanajuato, donde se le conoce como Chilcuague o hierba de la muela (Ximénez, 1615; Martínez, 1994; Molina-Torres *et al.*, 1999). En las raíces, esta planta acumula afinina, una molécula formada por un ácido graso de cadena alifática de 10 carbonos conteniendo tres insaturaciones, el cual está unido a una isobutilamida (Figura 1). La afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida) pertenece al grupo de alcanidas olefinicas, es el compuesto mayoritario que representa hasta el 90% del total de los metabolitos presentes en las raíces y la responsable de los efectos biológicos atribuidos a esta planta. Al igual que el piretro, los extractos de la raíz de *H. longipes* A. Gray Blake muestran el mismo grado de acción paralizante y toxicidad contra insectos como la mosca doméstica (Crombie y Krasinki, 1962), el lepidóptero *Diaphania hyalintia* y contra el díptero *Aedes aegypti* vector del dengue (Jacobson, 1971); por lo que gracias a estas propiedades, ha sido utilizada como insecticida durante la segunda guerra mundial (Little, 1948). Por otra parte estudios realizados en especies del mismo género, se ha demostrado que la escabrina aislada de *Heliopsis scabra* Dunal es un insecticida más potente que las piretrinas, sin embargo debido a su toxicidad para los mamíferos, se desistió en su uso para el control de insectos (Roark, 1951).

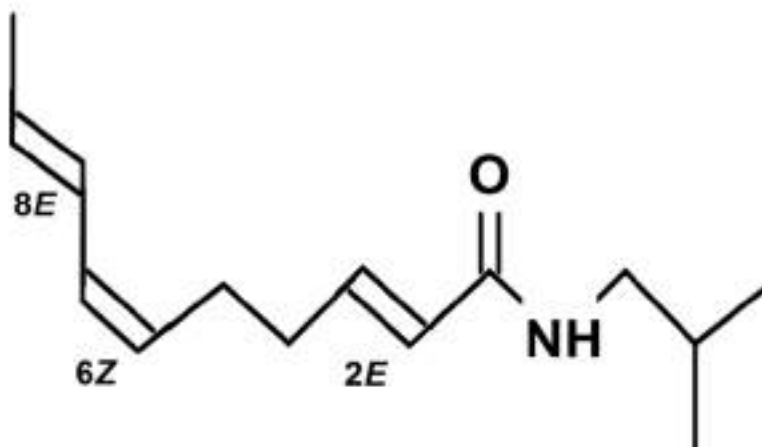


Figura 1. Fórmula estructural de la afinina, *N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E* decatrienamida. Principal componente bioactivo del extracto etanólico de *H. longipes* A. Gray Blake. $C_{14}H_{13}NO$; peso molecular 221 gr / mol.

En los últimos años la resistencia a los insecticidas así como los cambios climáticos han contribuido al resurgimiento del paludismo, aunado a ello no se dispone de una vacuna contra esta enfermedad. Por lo cual es necesaria la búsqueda de alternativas para controlar las poblaciones de vectores transmisores de enfermedades infecciosas. Con base en lo anterior en este trabajo se determinó el potencial insecticida de *H. longipes* A. Gray Blake, contra larvas de *A. albimanus*, principal vector del paludismo en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Se recolectaron raíces de *H. longipes* A. Gray Blake (Figura 2), en el municipio Puerto de Tablas, Xichú en la Sierra Gorda del Estado de Guanajuato, a altitudes entre 2589 msn, en terrenos alterados de bosque de encinos (*Quercus* sp) y con pendientes pronunciadas. La autenticidad del material fue realizada por el Dr. Jerzy Rzedowski del Instituto de Ecología de Pátzcuaro Michoacán donde se depositaron especímenes de referencia (García-Chávez *et al.* 2004).



Figura 2. Raíces de *H. longipes* A. Gray Blake.

Obtención de extractos

El extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake se obtuvo a partir de 1.5 Kg de raíces secas, las cuales fueron pulverizadas y maceradas con 10 L de etanol absoluto durante una semana a temperatura ambiente, transcurrido este período el extracto se filtró con papel filtro Whatman No. 2 para eliminar partículas suspendidas. El extracto obtenido se concentró hasta aproximadamente 1 L, utilizando un evaporador rotatorio Büchi 461 a una temperatura de 50 °C, posteriormente el extracto se guardó a 4 °C hasta su uso.

Análisis del extracto de *H. longipes* A. Gray Blake

Las muestras de extracto etanólico fueron analizadas en un Cromatógrafo de Gases (GC Hewlett-Packard modelo 5890) equipado con una columna capilar HP-1MS (30 m x 0.25 mm, i.d.; 0.25 µm film thickness) acoplado a un Espectrómetro de Masas (Hewlett-Packard, modelo 5972 MSD). El equipo fue programado con las siguientes condiciones de operación: la temperatura del inyector se mantuvo a 200 °C, mientras que la temperatura inicial del horno a 150 °C durante 3 minutos, con incremento de 4 °C por minuto hasta lograr una temperatura final de 300 °C, la cual se mantuvo durante 20 minutos. Se utilizó Helio como gas acarreador con un flujo constante de 1 mL / min. El extracto se cuantificó en base a la curva de calibración de afinina realizada previamente en el laboratorio.

Colonia de *Anopheles albimanus*

La colonia del mosquito *A. albimanus* fue establecida en el Insectario del Cinvestav Unidad Irapuato, a partir de huevecillos donados por el Dr. Humberto Lanz Mendoza del Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos; los cuales fueron eclosionados en bandejas con agua de la llave libre de cloro y posteriormente fueron incubados a 28 °C, 75% de humedad relativa y ciclos de 12 h luz : 12 h oscuridad.

Ensayo larvicida contra *Anopheles albimanus*

Para este ensayo se realizó el procedimiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En recipientes de plástico conteniendo 50 ml de agua de la llave libre de cloro se colocaron 10 larvas de tercer estadio larval de *A. albimanus*, posteriormente se agregaron diferentes concentraciones (0–200 ppm) del extracto etanólico, además se utilizaron el insecticida comercial Abate® y etanol absoluto como controles positivo y negativo, respectivamente; realizando 3 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos más los controles fueron incubados en las mismas condiciones de mantenimiento de la colonia. El efecto larvicida se determinó a las 48 h, considerándose positivo cuando las larvas se observaban muertas o no presentaban movimiento. Los valores de la dosis letal media (DL₅₀) fueron calculados utilizando el programa Probit (Raymond, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La afinina es el compuesto mayoritario del extracto etanólico de la raíz de *H. longipes* A. Gray Blake.

Para la elaboración del extracto se realizaron dos rondas de maceración con etanol al 96% con el objetivo de extraer la mayor cantidad de los compuestos presentes en las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake; obteniéndose aproximadamente 10 L de extracto etanólico. Una muestra del extracto se concentró bajo presión reducida para eliminar el solvente y recuperar un aceite color amarillo, cuyo aspecto correlaciona con la naturaleza lipídica de las alcamidas. Para determinar su composición, el aceite se disolvió en etanol absoluto y se analizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM); con lo cual se identificaron los compuestos presentes en las

raíces de *H. longipes* A. Gray Blake. El análisis del cromatograma revela un compuesto mayoritario que eluye con un tiempo de retención de 11.53 minutos (Figura 3); y muestra un patrón de fragmentación por EM m/z (masa/carga) = 221 (10), 192 (4), 141 (100), 126 (39), 98(26), 81 (94), 68 (14), 53 (12); el cual al ser comparado con la biblioteca NIST, confirma que el compuesto mayoritario en las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake es la (a) afinina (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida), cuyos picos m/z = 221 y 141 corresponden al ión molecular y al ión padre, respectivamente (Figura 4). Por otro lado el cromatograma, muestra que además de la afinina, el extracto contiene compuestos minoritarios (Figura 3); cuyo patrón de fragmentación por EM comparado con la base de datos, sugiere que corresponden a distintas alcanidas: (b) *N*-(2-metilbutil)-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida, (c) *N*-isobutil-2*Z*-monoén-8,10 diin-undecamida y (d) *N*-isobutil-2*E*-monoén-8,10 diin-undecamida; y el éster (e) 2*E*,6*Z*,8*E* decatrienoato de bornilo (Cuadro 1), lo cual demuestra que el extracto etanólico está formado por una mezcla de alcanidas. Finalmente con el análisis por CG-EM se determinó la concentración del extracto, estimada como 142.2 mg/mL en base a la alcanida mayoritaria; la afinina, considerada como parámetro indicador de la eficiencia del proceso de extracción.

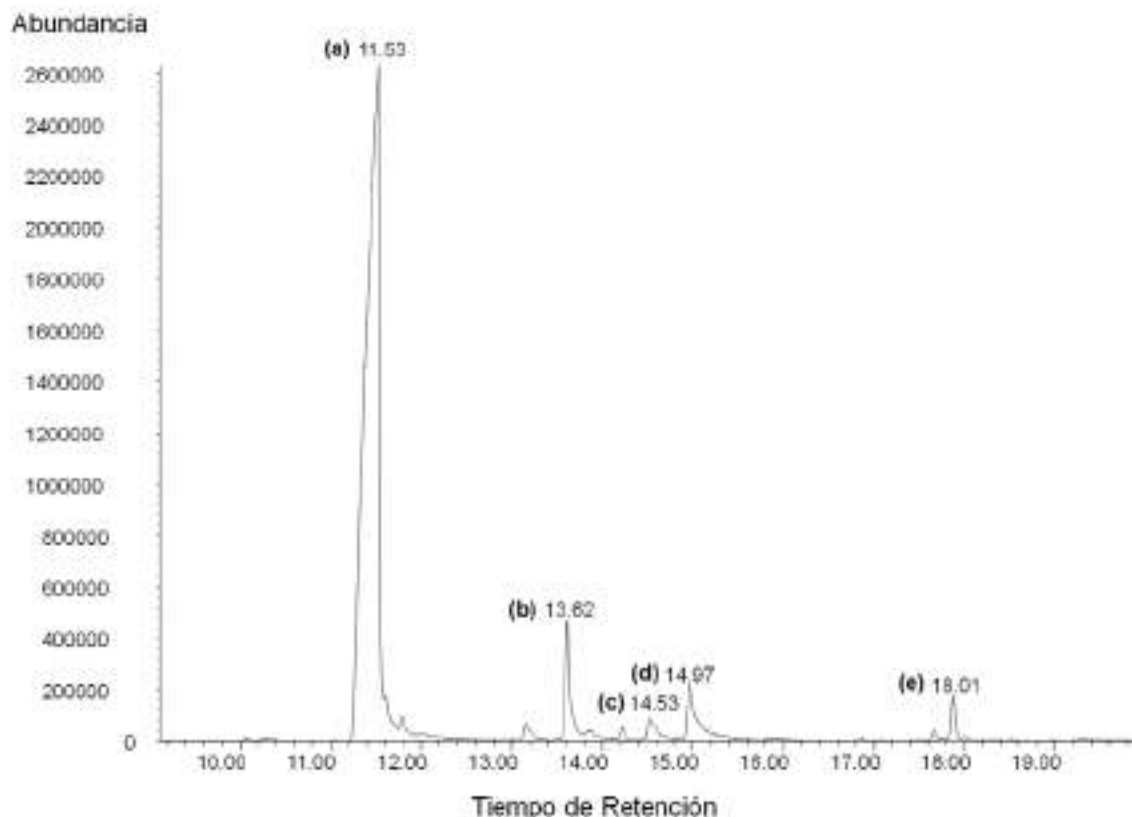


Figura 3. Composición del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake. Cromatograma obtenido mediante CG-EM del extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake. El pico más alto corresponde a la (a) *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida, el compuesto bioactivo presente en las raíces de la planta. El resto de los picos corresponden a las diferentes alcanidas presentes en el extracto, (b) *N*-(2-metilbutil)-2*E*,6*Z*,8*E* decatrienamida, (c) *N*-isobutil-2*Z*-monoén-8,10 diin-undecamida, (d) *N*-isobutil-2*E*-monoén-8,10 diin-undecamida y (e) 2*E*,6*Z*,8*E* decatrienoato de bornilo.

El extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake posee actividad insecticida contra *A. albimanus*.

Previamente se ha demostrado el efecto de *H. longipes* A. Gray Blake contra insectos que causan perjuicio al ser humano (Crombie y Krasinski, 1962; Jacobson, 1971); lo cual constituye a esta

planta como una fuente potencial de compuestos con propiedades insecticidas. Con el objetivo de demostrar el potencial de esta planta contra el díptero transmisor del paludismo, se determinó el efecto larvicida contra el tercer estadio larval de *A. albimanus*, evaluando distintas concentraciones de extracto 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 ppm. Se determinó una mortalidad de 100% a partir de 5 ppm, concentración a la cual las larvas se observaron inmóviles en el fondo del recipiente y en algunos casos signos de necrosis. Con base en estos resultados se procedió a evaluar concentraciones de 0 a 4 ppm de extracto con el fin de ampliar los tratamientos e incrementar la confiabilidad y soporte estadístico de los ensayos. Con este rango de concentración, se obtuvieron distintos valores de mortalidad en los tratamientos, los cuales fueron sometidos a análisis estadístico en el programa Probit y encontrando que la dosis letal media (DL_{50}) del extracto son 2.85 ppm, correspondiente a la cantidad de extracto etanólico necesaria para eliminar al 50% de las larvas de *A. albimanus*. Se ha sugerido que el efecto insecticida de *H. longipes* A. Gray Blake está dado por las insaturaciones en las posiciones 2E, 6Z y 8E de la afinina, la alcanida mayoritaria (Figura 1). Sin embargo es necesario realizar más experimentos que validen la importancia de las insaturaciones en la actividad insecticida. Por otra parte es probable que la actividad del extracto se deba no sólo al efecto de la afinina, sino también a la acción sinérgica de las otras alcanidas identificadas en el extracto.

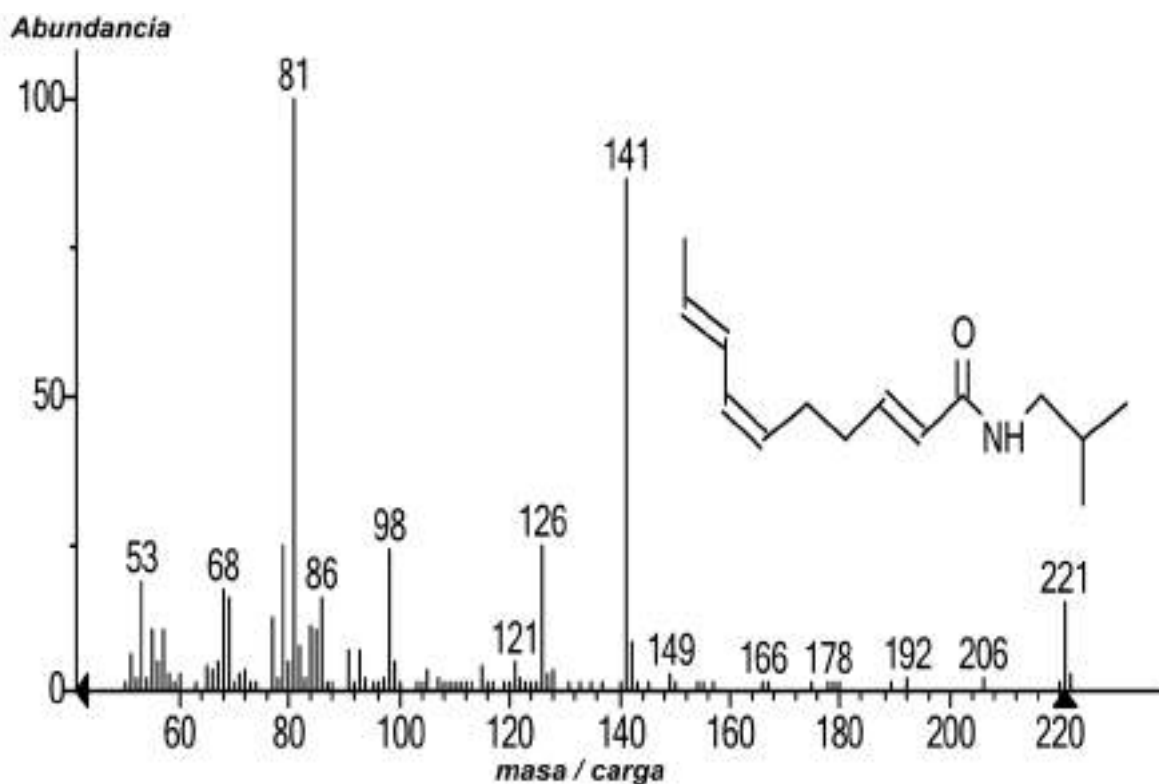


Figura 4. Patrón de fragmentación por Espectrometría de Masas de la afinina, *N*-isobutil-2E, 6Z, 8E decatrienamida.

Al realizar la comparación las DL_{50} del extracto de *H. longipes* A. Gray Blake y del control positivo, el insecticida comercial Abate® (Cuadro 2), se encontró que se requiere más cantidad de extracto etanólico para la obtención del mismo resultado. Sin embargo debemos destacar que los mosquitos dispersos en el medio ambiente, han desarrollado resistencia a los insecticidas utilizados en las campañas de prevención, entre ellos el Abate®, por lo que ha sido necesaria la aplicación constante de cantidades cada vez mayores del insecticida, lo que es una grave amenaza para la salud del hombre y para la biodiversidad de los ecosistemas. Ante este panorama la aplicación del

extracto como insecticida puede ser una excelente alternativa para el control de las poblaciones resistentes de mosquitos, contribuyendo a disminuir la incidencia de enfermedades transmitidas por vector, lo cual constituye una alternativa ecológica dado que disminuye la aspersión de químicos al medio ambiente.

Cuadro 1. Alcamidas presentes en el extracto etanólico de las raíces de *H. longipes* A. Gray Blake.

Compuesto	TR	EM (m/z)
(a) <i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienamida	11.53	221 (10), 192 (4), 141 (100), 126 (39), 98(26), 81 (94), 68 (14), 53 (12)
(b) <i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienamida	13.62	235 (12), 53 (18), 69 (18), 81 (100), 86 (30), 98 (14), 126 (12), 155 (88)
(c) <i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> -monoeno-8,10 diin-undecamida	14.53	230 (1), 146 (10), 141 (9), 131 (73), 117 (76), 103 (27), 91 (95), 57 (100)
(d) <i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -monoeno-8,10 diin-undecamida	14.97	231 (17), 57 (45), 63 (35), 79 (21), 91 (100), 103 (41), 116 (45), 131 (58)
(e) 2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> decatrienoato de bormilo	18.01	302 (0.2), 137 (76), 121 (9), 109 (13), 93 (14), 81 (100), 69 (7), 55 (6.1)

TR= Tiempo de retención; EM= Patrón de fragmentación por espectrometría de masas.

Cuadro 2. Dosis Letal Media (DL₅₀) del extracto etanólico de *H. longipes* A. Gray Blake contra *Anopheles albimanus*.

Compuesto	DL ₅₀ ppm	95% IC
Extracto etanólico	2.85	1.98-4.09
Abate®	<1	ND

La mortalidad se determinó a las 48 horas post-exposición a los compuestos evaluados. DE=Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza 95%; ND=No determinado

CONCLUSIONES

El extracto de raíces de *H. longipes* A. Gray Blake constituye una fuente potencial de insecticidas para ser utilizado como alternativa para controlar las poblaciones del mosquito transmisor del paludismo, el cual tiene la ventaja de estar constituido por una mezcla de alcamidas que pueden ejercer un efecto sinérgico, de manera que no es necesario llevar a cabo procesos de purificación de las alcamidas.

LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2008. **Métodos de control de *Aedes aegypti* mosquito vector del virus del dengue en México.** Dirección del programa de enfermedades transmitidas por vector [www.cenave.gob.mx/dengue/insecticida.pdf].
- Casida J. 1980. **Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides.** *Environ Health Perspect* 34:189-202.
- Crombie L y Krasinki. 1962. **Synthesis of *N*-isobutyldeca-*trans*-2,*cis*-6,*trans*-2,*cis*-6,*cis*-8 trienamida.** *Chem Ind* 983-984.
- García-Chávez A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J. 2004. **El género *Heliopsis* (Heliantheae, Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces.** *Acta Botánica Mexicana* 69:115-131.
- Hay S I, Cox J, Rogers D J, Randolph S E, Stern D I, Shanks G D, Myers M F, Snow R W. 2002. **Climate change and the resurgence of malaria in the East African highlands.** *Nature* 415:905-909.
- Jacobson M. 1971. **The insaturated isobutilamides.** In. Naturally occurring insecticides. Jacobson M and Crosby D G (eds) Marcel Dekker. New York pp. 137-173.
- Little E. 1948. **El chilcuague (*Heliopsis longipes*). Planta insecticida.** *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 7:23-27.
- Maharaj R, Maharaj V, Crouch N R, Bhagwandin N, Folb P I, Pillay P, Gayaram R. 2011. **Screening for adulticidal bioactivity of South African plants against *Anopheles arabiensis*.** *Malaria Journal* 10:223.
- Martínez M. 1994. **Las plantas medicinales de México.** Ediciones Botas 6ª Ed. pp. 113-115.
- Mittal P K, Subbarao S K. 2003. **Prospects of using herbal products in the control of mosquito vectors.** *ICMR Bulletin* 33:1-10.

- Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E. 1999. **Antimicrobial properties of alkamides presents in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin.** *J. Ethnopharmacology* 64:241-248.
- Raymond M. 1985. **Presentation d'un programme Basic d'analyse logprobit pour micro-ordinateur.** *Cah. ORSTOM Ser. Ent. Med. Parasitol.* 23:117-121.
- Roark R C. 1951. **Scabrin.** *Soaps and sanitary chemicals* 27:125-137.
- Sen-Sung C, Hui-Ting C, Shang-Tzen C, Kun-Hsien T, Wei-June Ch. 2003. **Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae.** *Bioresource Technology* 89:99-102.
- Shaalán E A, Canyon D, Younes M W F, Abdel-Wahab H, Mansour A H. 2005. **A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential.** *Environment International* 31:1149-1166.
- Toledo V M. 1994. **La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación de los noventas.** *Ciencias UNAM* pp. 43.
- Vázquez R F. 2005. **Evaluación d extractos vegetales en el control de insectos plaga a nivel de huerto familiar.** Memoria de residencia. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca.
- Velázquez-Monroy O J, Gutiérrez-Trujillo G, Dávila-Torres J, Cabral-Soto J, Heredia-Jarero N M. 2003. **Epidemiología del paludismo.** *Epidemiología* 20 (37):23.
- Ximénez F. 1615. **Qvatro libros de la naturaleza.** México Calle Diego López Dávalos pp. 224.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo agradecen al Dr. Humberto Lanz Mendoza por la donación de los huevecillos de *Anopheles albimanus*; al Ing. Javier Luévano Borroel y Tec. Katia Teresa Flores Camarillo por las facilidades brindadas para el establecimiento de la colonia de *A. albimanus* en el insectario del Cinvestav IPN, Unidad Irapuato.

Dr. Alejandro Hernández-Morales

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez

Investigadora Invitada. Laboratorio de Biología Molecular de Bacterias I. Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

Dra. Blanca Estela Gómez-Luna

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

M. en C. Enrique Ramírez-Chávez

Auxiliar de Investigación. Laboratorio de Fitobioquímica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

Dra. María del Rosario Abraham-Juárez.

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

Dr. Gerardo Martínez-Soto.

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

Dr. Jorge Molina-Torres

Investigador Titular. Laboratorio de Fitobioquímica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

EFFECTO DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y EXTRACTO ACUOSO DE VERMICOMPOST SOBRE CALIDAD DE FRESA

Fabián Heriberto Rivera-Chávez; Gilberto Vázquez-Gálvez; Luz Elena Castillejo-Álvarez;
M. Valentina Angoa-Pérez; Guadalupe Oyoque-Salcedo y
Hortencia Gabriela Mena-Violante
Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3
Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 119-130.



e-revist@s

EFFECTO DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y EXTRACTO ACUOSO DE VERMICOMPOST SOBRE CALIDAD DE FRESA

EFFECT OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND VERMICOMPOST LIQUID EXTRACT ON QUALITY OF STRABERRY

Fabián Heriberto **Rivera-Chávez**¹; Gilberto **Vázquez-Gálvez**¹; Luz Elena **Castillejo-Álvarez**¹, M. Valentina **Angoa-Pérez**¹, Guadalupe **Oyoque-Salcedo**¹; Hortencia Gabriela **Mena-Violante**¹

¹CIIDIR-IPN, Departamento de Investigación. Justo sierra # 28 Colonia Centro, Jiquilpan Michoacán.

RESUMEN

La aplicación de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y vermicompost constituye una alternativa al uso de agroquímicos para garantizar el rendimiento y calidad de los cultivos, disminuyendo el costo y el deterioro del medio ambiente. En el presente trabajo se evaluó el efecto de HMA y extracto acuoso de vermicompost (VL) sobre la calidad de frutos de fresa. Los tratamientos fueron: 1) control absoluto con agua (CTL); 2) fertilizado (F); 3) inoculado con HMA (M); 4) con vermicompost líquido (VL); 5) inoculado con HMA y fertilizado (M+F); 6) fertilizado y con vermicompost líquido (VL+F); 7) inoculado con HMA, y con vermicompost líquido; 8) inoculado con HMA, fertilizado y con vermicompost líquido (M+F+VL). Los parámetros evaluados fueron: color, peso, diámetro polar, diámetro ecuatorial, firmeza, °Brix, análisis proximal, contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas. Los tratamientos VL y M promovieron un peso de fruto significativamente mayor al de los frutos del tratamiento fertilizado (39%). En general los tratamientos con HMA incrementaron el % de ceniza, excepto cuando estos se combinaron con fertilizante. El tratamiento M promovió un aumento significativo del % de ceniza en los frutos de fresa en comparación con el tratamiento F (3.7% mayor). Los tratamientos con HMA y VL (solos o combinados) incrementaron el % de grasa de los frutos respecto al tratamiento F. No se encontraron efectos significativos de los tratamientos sobre el % de fibra cruda. Los frutos de plantas tratadas con VL+F fueron significativamente más firmes (20%) que los frutos del tratamiento F. Se observó que los frutos del tratamiento M+F presentaron los mayores valores de °Brix (14% más altos que en frutos del tratamiento F). Interesantemente, los frutos obtenidos de las plantas tratadas con VL y M+F presentaron un contenido de fenoles totales significativamente superior al de los frutos del tratamiento F (29 y 17%, respectivamente). En general, los tratamientos con HMA y VL promovieron la acumulación de flavonoides. Los frutos del tratamiento M presentaron un contenido significativamente mayor de estos pigmentos (1.8 veces) que los frutos del tratamiento F. El mayor contenido de antocianinas lo presentaron los frutos del tratamiento M+VL siendo 38% mayor que el contenido de estos pigmentos en frutos del tratamiento F. Los resultados demostraron que la aplicación de HMA y VL influencia significativamente atributos sensoriales y nutraceuticos de los frutos de fresa.

Palabras clave: *Fragaria ananassa*, humus, análisis proximales, fenoles, flavonoides, antocianinas.

SUMMARY

The application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and vermicompost is one of the alternatives to agrochemical products, to reach crops yield and quality, reducing costs and environmental damage. In the present study, the effect of applying AMF and vermicompost aqueous extract (LV) on strawberry fruit quality, was evaluated. The treatments were: 1) control with water (CTL); 2) fertilized (F); 3) inoculated with AMF (M); 4) with vermicompost aqueous extract (LV); 5) inoculated with AMF and fertilized (M+F); 6) fertilized and with vermicompost aqueous extract (LV+F); 7) inoculated with AMF, and treated with vermicompost aqueous extract (M+LV); 8) inoculated with AMF, fertilized and treated with vermicompost aqueous extract (M+F+LV). The evaluated parameters were: color, weight, polar and equatorial diameter, firmness, °Brix, proximal analysis, phenols, flavonoids and anthocyanins contents. LV and M treatments promoted a significant increase of fruit weight (39%) compared to the fertilized treatment. In general, treatments with AMF increased ash except when combined with fertilization. The M treatment caused a significant increase of ash (3.7%) respect to the F treatment. The treatments containing AMF and LV (alone or combined with others) increased fat content in fruits, in comparison with the F treatment. There were no significant effects treatments on fiber content. Fruits from plants treated with LV+F were significantly firmer (20%) than fruits in the F treatment. Fruits in the M+F treatment showed the higher values of °Brix (14% higher than fruits in the F treatment). Interestingly, fruits from the treatments LV and M+F had significantly superior contents of total phenols than fruits from the F treatment (29 and 17% respectively). In general, the treatments containing AMF and LV promoted flavonoid accumulations in fruits. Fruits of the M treatment showed a significantly greater content of this pigments (1.8 times) than fruits of the F treatment. Fruits of the M+VL treatment showed the highest anthocyanins content, being 38% greater than that found in fruits of the F treatment. Results showed that the application of AMF and LV influenced sensorial and nutraceutical fruit quality attributes in strawberry.

Key words: *Fragaria ananassa*, humus, proximal analysis, phenols, flavonoids, anthocyanines.

INTRODUCCIÓN

La producción agrícola actual, requiere de estrategias para reducir los insumos asegurando el rendimiento y la calidad de los cultivos a un costo relativamente bajo, sin deterioro del medio ambiente. En este sentido, una alternativa al uso de agroquímicos, es la aplicación de biofertilizantes y/o bioestimuladores, entre los que se encuentran los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Vessey, 2003) y el vermicompost (Tsavkelova *et al.*, 2006), los cuales estimulan el crecimiento de las plantas y favorecen su sano desarrollo.

Los HMA habitan en la rizosfera e interactúan con las raíces de las plantas formando una simbiosis mutualista, que permite a la planta la absorción más eficiente de nutrimentos (Hernández y Chailloux, 2001; Vessey, 2003) y de agua (Augé, 2004), así como una mayor tolerancia al ataque de patógenos (Alejo-Iturvide *et al.* 2008); mientras que los hongos son provistos de fuentes de carbono (Smith y Read, 1997). Se ha documentado el efecto positivo de los HMA sobre los rendimientos de diversos cultivos (Duffy y Cassells, 2000; Kaya *et al.*, 2003). En cuanto al efecto de los HMA sobre los frutos existe poca información. Se ha reportado que estos influyen el tamaño de los productos agrícolas (Kaya *et al.*, 2003; Mena-Violante *et al.*, 2006), además de su calidad interna. Bagyaraj y Sreeramulu (1982) reportaron el incremento en el contenido de vitamina C de chiles producidos con HMA. Adicionalmente, Mena-Violante *et al.*, (2006) encontraron que el contenido de carotenoides se incrementó en frutos de *Capsicum annuum* por efecto de la inoculación con consorcios de HMA. En este sentido, Olalde-Portugal y Mena-Violante, (2008) propusieron a los HMA entre otros microorganismos rizosféricos, como factores bióticos pre-cosecha que promueven cambios en los atributos de calidad (externa e interna) de frutas y hortalizas. Otro factor pre-cosecha que podría influenciar la calidad de frutos de cultivos de interés comercial, es la aplicación de vermicompost, el cual es rico en poblaciones microbianas, particularmente de hongos, bacterias y actinomicetos. El vermicompost contiene también sustancias húmicas (SH) que interactúan con componentes orgánicos del suelo y de las raíces de plantas en la matriz del suelo, donde pueden influenciar no sólo la fertilidad y conservación del mismo, sino también la fisiología de las plantas. Se ha reportado que las SH mejoran el crecimiento de las plantas en términos de longitud y biomasa de raíz, además de mejorar la adquisición de nutrimentos e incrementar la concentración de clorofila en hojas (Nardi *et al.*, 2002). Se ha reportado que la aplicación de vermicompost puede incrementar el rendimiento y número de frutos de diversos cultivos (e.g. chile, fresa) (Arancon *et al.*, 2004a, Arancon *et al.*, 2006). Además, la aplicación de extractos acuosos de vermicompost forliaramente o en el suelo, ha mostrado efectos positivos sobre la salud de las plantas, el rendimiento y la calidad nutricional, mejorando las comunidades microbianas benéficas, mejorando el estatus nutricional de las plantas e induciendo sus mecanismos de defensa (Scheuerell *et al.*, 2002; Carpenter, 2005; Pant *et al.*, 2009). Cabe señalar que muchos de los beneficios que el vermicompost provee a los cultivos se han atribuido principalmente a su actividad de “fitohormonas” (Zandonadi *et al.*, 2007; Arancon *et al.*, 2004b).

La aplicación futura de desarrollos tecnológicos basados en los HMA y vermicompost, requiere conocer su efecto sobre los productos finales. Además los distintos actores de las cadenas productivas así como los consumidores, han adquirido conciencia de los efectos secundarios derivados del uso de agroquímicos, aunada al creciente interés por el valor nutricional y el contenido de componentes bioactivos de los productos agrícolas, tal como la fresa que es uno de los cultivos de mayor importancia en nuestro país, cuyos principales atributos de calidad son el sabor, el color y firmeza, así como el contenido de vitamina C y diversos compuestos nutraceuticos que incluyen fenoles, flavonoides y antocianinas (Meyers *et al.*, 2003), los cuales han demostrado un alto poder antioxidante (Sun *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2004; Scalzo *et al.*, 2005) y se han asociado a múltiples beneficios en la salud (Hannum, 2004, Freese *et al.*, 2006). Considerando los beneficios

que podrían alcanzarse con la aplicación de HMA y vermicompost en el cultivo de la fresa, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de HMA y de extracto acuoso de vermicompost sobre la calidad de frutos de fresa (*Fragaria ananassa*) variedad Albion producidos en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Albion de calidad certificada de la compañía Lassen Canyon Nursery Inc de California, EUA. El inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) consistió en un consorcio perteneciente al cepario del Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Producción de vermicompost

El vermicompost líquido se elaboró de acuerdo a la metodología indicada por Vázquez-Gálvez *et al.*, (2009), para esto se utilizó estiércol vacuno y lombrices de *Eisenia foetida* Sav para la obtención de vermicompost sólido, el cual se colocó en un recipiente de 200 l (una parte de vermicompost sólido y tres de agua). La mezcla se agitó durante 48 h y se dejó reposar, se separó la parte líquida y se diluyó con agua (30 l del extracto en 200 L de agua). El vermicompost líquido tenía pH 8.68 (1:5 agua), conductividad eléctrica 2.37 mmhos/cm, capacidad de intercambio catiónico 6.73 meq/100g de muestra, relación Carbono/Nitrógeno 7.59, 3.53% de materia orgánica 0.97% de ácidos húmicos, 0.18% de ácidos fúlvicos.

Experimento

El estudio fue realizado en el invernadero del CIIDIR-IPN unidad Michoacán, en la ciudad de Jiquilpan de Juárez, Michoacán. El sitio del experimento se ubica en los 19° 59' 57.30" de Latitud Norte y los 102° 42' 23.56" de Longitud Oeste, a una altitud de 1545 m.s.n.m.

Las plantas fueron trasplantadas en macetas de 5 kg que contenían suelo de la localidad con las siguientes características: vertisol, pH (en agua) 6.72, conductividad eléctrica 95 μ s, Fósforo (Olsen y Sommers, 1982) 15.8%, Nitrógeno 0.1%, materia orgánica 2.7%, arena 24.8%, Limo 21.0%, arcilla 54.2%. Las plantas se colocaron en suelo completamente húmedo, a una distancia entre sí de 20 cm a lo largo de la hilera, obteniéndose una densidad de 10 plantas por m².

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental constó de 8 macetas. Los tratamientos aplicados fueron: Los tratamientos aplicados fueron: 1) control absoluto con agua (CTL); 2) fertilizado (F); 3) inoculado con HMA (M); 4) con vermicompost líquido (VL); 5) inoculado con HMA y fertilizado (M+F); 6) fertilizado y con vermicompost líquido (VL+F); 7) inoculado con HMA, y con vermicompost líquido; 8) inoculado con HMA, fertilizado y con vermicompost líquido (M+F+VL).

Se instaló un sistema de riego por goteo, con depósitos de 200 L para la aplicación de agua, fertilizante líquido de Steiner y vermicompost líquido, que se distribuyeron a las plantas impulsados por una bomba centrífuga de 0.25 hp, a través de cinta regante colocada sobre las hileras de plantas y con goteros distanciados cada 20 cm. El inóculo de HMA contenía 10 esporas/g y se aplicó (10 g) al momento del trasplante. Las plantas se mantuvieron en invernadero hasta fructificación. Los frutos se cosecharon en estado 6 de madurez según NMX-FF-062-SCFI-2002.

Análisis proximales

Se realizaron medidas de los indicadores de producción: diámetro ecuatorial, polar, peso y se clasificaron los frutos de acuerdo a la norma NMX-FF-062-SCFI-2002. Además, se determinaron los ° Brix de los frutos según metodología indicada en la norma NMX-F-103-1982.

Para la determinación del color del fruto de fresa se midió el coeficiente de luminosidad L, los parámetros a y b, y la cromaticidad (C) utilizando un espectrofotómetro Minolta CR- 300, para lo cual, se registraron lecturas de tres puntos seleccionados al azar de la zona ecuatorial del fruto recién cosechado, arrojando un promedio final de las 3 lecturas. Otro de los indicadores que se midió fue la firmeza de los frutos enteros mediante una prueba de penetración. Se evaluó la fuerza máxima requerida para penetrar el fruto a una distancia especificada de 10 mm en la zona ecuatorial utilizando una sonda cilíndrica de 3 mm de diámetro (velocidad=5 mm s-1) acoplada a un equipo Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems).

Extracción y cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas

Para la extracción de fenoles se peso 1 g de fruto de fresa congelado y almacenado a -20°C, se homogenizó con 20 ml de metanol acuoso (80:20, v/v) por 5 min. El homogeneizado se agitó a 200 rpm y temperatura de 25°C por 24 h en oscuridad. En seguida la muestra se filtró al vacío con papel Whatman No. 40. El filtrado se llevó a sequedad en un rotavapor Buchi RII y se resuspendió en metanol (1 ml). Los extractos fueron almacenados a -20°C para su posterior utilización. La extracción se realizó por triplicado.

Para la determinación de fenoles totales se recurrió la metodología desarrollada por Singleton y Rossi, (1965) usando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para lo cual se mezclaron 50 µl de cada extracto con 200 µl de agua destilada, adicionando 250µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (50% v/v), se agitaron vigorosamente por 3 min. Después se agregaron 500µl de solución de Na₂CO₃ en agua (7.5% P/V) y se mezclaron vigorosamente. En seguida se incubaron a una temperatura de 45°C por 15 min para posteriormente medir su absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro UV-Visible (CARY 3E), utilizando como blanco el metanol acuoso (80:20 v/v). Para la cuantificación de fenoles totales se utilizó ácido gálico como estándar (0-30 µg ml⁻¹). El contenido de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (mg por 100 g de peso fresco). La cuantificación de fenoles se realizó por triplicado

Para la extracción de flavonoides totales se peso 1 g de fruto de fresa congelado y almacenado a -20°C, se homogenizó con 10 ml de etanol al 80%. Posteriormente se sonicó durante 30 min a 60°C y se centrifugó a 1,300 rpm por 10 min. El sobrenadante fue almacenado a -20°C. La extracción se realizó por triplicado. Para la cuantificación se utilizó quercitina como estándar. A 100 µl de extracto se les añadieron 200 µl de solución de acetato de potasio 1M y 200 µl de nitrato de aluminio al 10%. Se aforaron a 1 ml con etanol al 80%. Se dejaron reposar por 40 min y se midió la absorbancia contra un blanco de etanol al 80% 415 nm en el espectrofotómetro UV-visible. Cada muestra se determinó por triplicado. Los resultados fueron expresados en mg de quercitina en 100 g de peso fresco.

Para la extracción de antocianinas se pesaron 0.5 g de fruto de fresa congelado y almacenado a -20°C, se homogenizó en 5 ml de metanol acidificado (metanol, HCl 1N) 85:15 V/V con agitación vigorosa. En seguida la muestra se dejó en agitación a 200 rpm a 25°C por 16 h. Posteriormente se filtró al vacío con papel filtro Whatman No. 40 y aforó a 25 ml con metanol acidificado. Para la cuantificación de antocianina se tomó un alícuota de 3 ml y se leyó su absorbancia a 535nm en el espectro fotómetro UV-visible. El total de antocianinas se calculó con la formula siguiente:

$$C=(A/\epsilon)(V/1000)*Mw*(1/peso\ de\ la\ muestra)*103$$

Donde:

A= Absorbancia leída

ε= Absorbancia molar de la cianidina-3-glucósido, 25. 965 cm⁻¹ M⁻¹

V= Volumen total del extracto de antocianinas

Mw= peso molecular de la cianidina-3-glucósido, 449 gr/mol

Se reporta en mg de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra (Abdel-Aal y Hulc, 1999).

Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9, con una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) y diseño experimental completamente al azar. La separación de medias se realizó con la prueba de la diferencias mínima significativas (DMS), con un valor de significancia de P= 0.05

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los múltiples beneficios que los HMA aportan a las plantas, tales como la mejor adquisición de nutrimentos y de agua (Smith y Read, 1997; Augé, 2004) y el control de patógenos (Zehnder et al., 2001; Whipps, 2004), se ha reportado el incremento en el rendimiento de diversos cultivos tales como chile (Bagyaraj y Sreeramulu, 1982), papa (Duffy y Cassells, 2000) y sandía (Kaya et al., 2003). Por otro lado, se ha reportado el efecto positivo de la adición del vermicompost y extractos de sus ácidos húmicos sobre el crecimiento, rendimiento y contenido de minerales de diferentes cultivos (Azarmi et al., 2008; Arancon et al. 2003; Atiyeh et al., 2002; Atiyeh et. al., 2000a, Atiyeh et. al., 2000c). Adicionalmente, se ha documentado la efectividad del humus líquido (extracto acuoso de vermicompost) aplicado foliarmente en las primeras etapas del crecimiento y desarrollo de tomate y fresa (Artega et al., 2006). A pesar de que inicialmente dichos beneficios se atribuían a efectos nutricionales (biofertilizantes), diversos estudios han demostrado que el vermicompost puede ejercer además efectos bioestimulantes (Arancon et al., 2006). En cuanto al efecto de HMA y del VL sobre la calidad de frutos propiamente dicha, existe muy poca información. En este caso, el tamaño de los frutos en términos de peso y diámetro polar respondió a la aplicación de los HMA y del VL, y la magnitud de dicha respuesta dependió de su aplicación de manera independiente, conjunta o en combinación con fertilizante (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y vermicompost líquido (VL) sobre el tamaño de frutos rojos de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Albion

Tratamiento	Peso (g)	Diámetro polar (cm)	Diámetro ecuatorial (cm)
CTL	14.3±0.25 c	4.06±0.63 abc	2.90±0.24 a
F	15.3±0.37 c	3.53±0.65 c	2.66±0.32 a
M	17.9±0.28 b	4.12±0.71 abc	3.18±0.22 a
VL	21.3±0.28 a	4.63±0.12 a	3.33±0.21 a
M+F	15.6±0.23 c	3.63±0.47 c	2.70±0.26 a
VL+F	17.0±0.18 bc	4.03±0.22 abc	2.90±0.40 a
M+VL	18.2±0.33 c	4.37±0.37 ab	3.14±0.16 a
M+VL+F	15.7±0.25 c	4.04±0.07 abc	2.96±0.04 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según MDS P<0.05

Los frutos de las plantas de fresa del tratamiento VL presentaron un peso significativamente mayor a los frutos de aquellas plantas en las que se aplicaron el resto de los tratamientos. Por su parte el tratamiento M, promovió un incremento significativo del peso de fruto respecto al control absoluto

con agua (CTL) y al control fertilizado (F) (25 y 17% respectivamente). En general, los tratamientos aplicados favorecieron un diámetro polar mayor en los frutos de fresa en comparación con el tratamiento F, excepto el tratamiento M+F cuyos frutos igualaron el diámetro polar de los frutos del tratamiento F. El diámetro ecuatorial no mostró diferencias significativas por efecto de los tratamientos.

Los resultados mostraron que el VL promovió la producción de frutos de mayor peso y diámetro polar. En este sentido, se ha documentado que el vermicompost sólido de desechos de papel, aplicado en el cultivo de fresa (*Fragaria ananassa*) var 'Chandler' además de promover el crecimiento de las plantas, incrementó el peso de frutos para comercialización (Arancon *et al.*, 2004b). El efecto positivo del VL sobre el tamaño del fruto, no pareció estar mediado por la disponibilidad de macronutrientes, dado que todas las plantas fueron provistas de las dosis adecuadas de fertilizantes inorgánicos, por lo que podría especularse que se debió a la producción de sustancias reguladoras contenidas en el VL o producidas por microorganismos presentes en el VL. En el caso de los HMA, recientemente se ha reportado su influencia sobre el tamaño de productos agrícolas (peso, longitud o diámetro) (Charron *et al.*, 2001; Kaya *et al.*, 2003; Mena-Violante *et al.*, 2006), lo cual coincidió con lo observado en el presente trabajo, ya que los HMA también favorecieron el incremento del peso de los frutos. Sin embargo, no se logró el mismo resultado al combinarlos con VL o con fertilizante. Dicho efecto podría ser resultado de una mejor adquisición de nutrimentos, principalmente P (Hernández y Chailloux, 2001). En este sentido, se ha señalado que los HMA pueden presentar un efecto nulo sobre las plantas cuando éstas no se encuentran sometidas a estrés (*e.g.* carencia de nutrimentos, sequía) (Smith y Read, 1997). En cuanto a la composición proximal de los frutos de fresa, se observó que el tratamiento VL provocó una disminución significativa del % de humedad en frutos, en relación al resto de los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y vermicompost líquido (VL) sobre la composición proximal de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Albion.

Tratamiento	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Fibra Cruda (%)
CTL	89.13±0.44 a	7.00±0.94 a	1.62±0.52 d	5.85±0.30 a
F	89.12±0.56 a	3.33±1.58 c	2.25±0.15 c	5.24±0.35 ab
M	88.92±0.11 ab	7.00±1.80 a	2.45±0.38 ab	5.93±0.04 a
VL	87.75±0.42 cd	3.33±0.06 c	2.27±0.08 bc	5.93±0.44 a
M+F	88.48±0.69 abc	3.33±0.38 c	2.58±0.25 ab	5.85±0.50 a
VL+F	89.36±0.20 a	3.66±0.84 c	3.09±0.95 a	5.94±0.26 a
M+VL	89.04±0.14 a	5.66±2.09 ab	2.39±0.10 bc	5.84±0.04 a
M+VL+F	89.36±0.05 a	4.00±0.47 bc	2.23±0.89 ef	5.85±0.10 a

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según MDS $P < 0.05$

Respecto al contenido de ceniza, el tratamiento M promovió un aumento significativo del % de ceniza en los frutos de fresa en comparación con el tratamiento F (3.7% mayor). En general los tratamientos con HMA incrementaron el % de ceniza, excepto cuando estos se combinaron con fertilizante. En relación al contenido de grasa, los tratamientos con HMA y VL (solos o combinados) incrementaron el % de grasa de los frutos respecto al tratamiento F, excepto el tratamiento M+VL+F en el cual los frutos presentaron el mismo % de grasa que los frutos del tratamiento F. Cabe destacar que el tratamiento VL+F produjo los frutos con mayor porcentaje de grasa. No se presentaron diferencias significativas en el contenido de fibra cruda en frutos obtenidos de los diferentes tratamientos. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte de la composición proximal de frutos provenientes de plantas tratadas con HMA y VL. Cabe destacar que

la aplicación de HMA promovió la acumulación de cenizas y grasa en los frutos de fresa, lo cual sugiere que los HMA influyen el llenado del fruto y la distribución de fotosintatos en el mismo. Otro atributo de calidad del fruto que puede ser influenciado por la aplicación de HMA y vermicompost líquido fueron los °Brix (Cuadro 3). Al respecto se ha reportado que el vermicompost puede provocar el aumento de °Brix en tomate cuando se aplica por aspersión foliarmente (Arteaga *et al.*, 2006) o sólido en suelo (Gutiérrez *et al.*, 2007). Sin embargo, en el presente estudio el VL no favoreció el aumento de °Brix en frutos de fresa, lo cual podría explicarse por la diferencia en la forma de aplicación, así como la dosis y el cultivo. Por su parte el tratamiento M provocó una disminución significativa de °Brix (14%), respecto a aquellos mostrados por los frutos del tratamiento F. Los HMA, promovieron el aumento de este parámetro únicamente en combinación con fertilizante.

Cuadro 3. Efecto de la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y vermicompost líquido (VL) sobre los °Brix de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Albion.

Tratamientos	°Brix
CTL	6.7 ± 0.9d
F	7.8 ± 0.5bc
M	6.7 ± 0.8d
VL	8.0 ± 0.4bc
M+F	8.2 ± 0.5ab
VL+F	7.0 ± 0.8d
M+VL	7.3 ± 0.4cd
M+VL+F	7.9 ± 0.3bc

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según MDS $P < 0.05$

Uno de los aspectos más sobresalientes que se ha reportado sobre el efecto de la aplicación de microorganismos rizosféricos sobre la calidad de frutos, ha sido el mejoramiento de la textura (firmeza). Mena-Violante y Olalde-Portugal (2007) mostraron que la inoculación de las raíces de tomate con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (*Bacillus subtilis*) incrementó significativamente la firmeza de los frutos. Charron *et al.*, (2001) reportaron diferencias en este atributo físico en bulbos de cebolla (*Allium cepa*) debidas a la inoculación con HMA. Cabe destacar que en ambos estudios se sugirió la influencia de los microorganismos sobre el proceso de maduración de los frutos. Los frutos obtenidos de las plantas tratadas con VL+F fueron significativamente más firmes (20%) que los frutos del tratamiento F (Cuadro 4). Mientras que el tratamiento M+VL disminuyó significativamente la firmeza de los frutos en comparación con el tratamiento F (27%). No se considera que dichas diferencias entre tratamientos se deban a un estado de madurez distinto de los frutos, ya que todos fueron cosechados en el mismo estadio, lo cual se confirmó mediante la medición y análisis de los parámetros de color L^* , a^* , b^* y C^* (datos no mostrados).

Cuadro 4. Efecto de la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y vermicompost líquido (VL) sobre la firmeza de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Albion.

Tratamiento	Firmeza (N)
CTL	1.64 ± 0.48g
F	2.21 ± 0.75cde
M	2.27 ± 0.45bcde
VL	2.53 ± 0.71abc
M+F	2.48 ± 0.72abcd

VL+F	2.67 ± 0.63ab
M+VL	1.60 ± 0.48g
M+VL+F	2.45 ± 0.72abcd

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según MDS $P < 0.05$

Los resultados de este trabajo mostraron la tendencia de los HMA a mejorar la firmeza, sin embargo, el efecto no fue contundente, esto podría deberse a que la fisiología de maduración de estos productos agrícolas es distinta, siendo la fresa a diferencia del tomate un fruto no climatérico (Given *et al.*, 1988). La misma tendencia se presentó con el VL al favorecer la firmeza de los frutos, sin embargo al ser combinado con fertilizante mostró un mayor impacto sobre dicho atributo. El impacto de los HMA y del VL sobre la firmeza de frutos de fresa probablemente sea consecuencia de la disminución de la actividad de ciertas enzimas que provocan cambios en los componentes pécticos de la pared celular (Woodward, 1972; Redgwell *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1997), o enzimas que degradan la matriz de celulosa (Knee *et al.*, 1977). En este sentido, se ha reportado el incremento de la actividad de endoglucanasa durante la maduración de frutos de fresa (Abeles y Takeda, 1990; Harpster *et al.*, 1998; Llop *et al.*, 1999; Trainotti *et al.*, 1999). Los efectos de los bioestimuladores utilizados sobre la firmeza de los frutos, podría entonces relacionarse con la maduración (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007), esto como resultado de la influencia ejercida sobre la regulación de dicho proceso por moléculas inductoras (fitohormonas) presentes en el VL o producidas por los HMA u otros microorganismos. Sin embargo, es poco probable que sea la causa única de los efectos positivos encontrados sobre la textura de los frutos, éstos podrían relacionarse con factores tejido-específico o relacionados con estructura que afectan la textura del fruto, los cuales incluyen la composición química de la pared celular, organización espacial e interacción de los constituyentes macromoleculares en la formación de esta estructura (Perkins, 1995); actividad de enzimas relacionadas con el ablandamiento (Abeles y Takeda, 1990; Medina *et al.*, 1997); la forma y el tamaño de la célula; y la cantidad y distribución de los espacios celulares, entre otros. Es destacable el hecho de que el manejo precosecha mediante la aplicación de microorganismos y bioestimuladores pueda influenciar la firmeza de los frutos, ya que se esperaría que los frutos provenientes de plantas biofertilizadas y/o bioestimuladas tuvieran una vida de anaquel más prolongada, sin embargo es necesario realizar investigaciones posteriores para determinarlo.

El contenido de compuestos bioactivos o nutraceuticos de los frutos de fresa se presenta en el Cuadro 5. Los resultados mostraron que la concentración de fenoles totales en los frutos de fresa, coincidió con el reportado por otros autores (230-530 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco) (Prior *et al.*, 1998; De Ancos *et al.*, 2000a, b; Proteggente *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005; Rababach *et al.*, 2005), y fue superior al reportado por Heinonen *et al.*, (1998) y Scalzo *et al.*, (2005) para *Fragaria ananassa* (295 mg y 212.8 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco, respectivamente). De igual manera, el contenido de flavonoides resultó mayor al reportado por Meyers *et al.*, (2003) y Cheel *et al.*, (2007), quienes reportaron contenidos de 78.0 mg equivalentes de catequina/100 g de peso fresco y 123.2 mg equivalentes de quercitina/100 g de peso fresco, en *Fragaria x ananassa*. Las diferencias encontradas entre los contenidos de los compuestos fenólicos obtenidos en el presente estudio y lo reportado en la literatura citada, podrían atribuirse a un efecto de la variedad (Scalzo *et al.*, 2005), así como a otros factores tales como las condiciones ambientales y el manejo del cultivo. Por su parte el contenido de antocianinas de los frutos de fresa coincidió con lo reportado por Clifford, (2000), quien documentó que el contenido de antocianinas totales en diferentes variedades de fresa puede fluctuar en un rango de 15.0 a 35.0 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido/100g, mientras que Meyers, (2003) reportó concentraciones que oscilaron entre 22.0 y 48.0 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido/100g de peso fresco. Dichos contenidos de antocianinas fueron similares a los reportados por Castro *et al.*, (2002) en *Fragaria ananassa* variedad Camarosa (48.0 mg equivalentes de cianidina-3-glucósido/100g de peso fresco).

Los resultados mostraron claramente que tanto los HMA como el VL promueven la acumulación de compuestos fenólicos en los frutos fresa. Los frutos obtenidos de las plantas tratadas con VL y M+F presentaron un contenido de fenoles totales significativamente superior al de los frutos del tratamiento F (29 y 17% respectivamente), mientras que los frutos del resto de los tratamientos alcanzaron un contenido de fenoles totales similar al de los frutos del tratamiento F (Cuadro 5). En el caso particular del VL, se observó que causa un incremento significativo de la concentración de fenoles totales, mientras que los HMA favorecen la acumulación de flavonoides y antocianinas, como lo reportaron Castellanos et al., (2010).

Cuadro 5. Efecto de la utilización de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y vermicompost líquido (VL) sobre el contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas totales de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) variedad Albion.

Tratamiento	Fenoles(mg/100g)	Flavonoides (mg/100g)	Antocianinas (mg/100g)
CTL	359.3 ± 34.7c	253.5± 28.1bc	19.9 ± 1.6e
F	455.0 ± 20.4b	226.5 ± 31.3c	27.1 ± 3.2bcd
M	398.1 ± 42.9bc	413.2 ± 36.0a	31.5 ± 5.3abc
VL	589.3 ± 94.4a	290.4 ± 48.4b	32.2 ± 5.5ab
M+F	535.9 ± 59.9a	324.0 ± 25.8b	32.7 ± 4.2ab
VL+F	396.3 ± 103.1 bc	324.8 ± 35.1b	25.4 ± 2.7d
M+VL	449.6 ± 21.2b	285.9 ± 28.4b	37.5 ± 3.9a
M+VL+F	452.0 ± 34.1b	256.5 ± 32.7bc	27.4 ± 4.4bcd

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, según MDS $P < 0.05$

Este hecho cobra importancia debido a las diversas actividades biológicas (e.g. antioxidante, antiinflamatoria) (Gu *et al.*, 2004; Pernía *et al.*, 2004) que estos compuestos presentan y que se asocian con múltiples beneficios a la salud (Cheel *et al.*, 2007; Woodman y Chan, 2004).

CONCLUSIONES

Se podría concluir que tanto los HMA, como los microorganismos o las sustancias húmicas presentes en el extracto acuoso del vermicompost, influyen la calidad de los frutos de fresa. Estos hallazgos indican la importancia de estudiar los efectos “globales” de la utilización de biofertilizantes y bioestimuladores ya que no solamente impactan el desarrollo de la planta sino también la calidad de los frutos, lo cual debe ser considerado como un criterio de selección de microorganismos o sustancias con función de biofertilización y/o bioestimulación.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Aal, E.S.M; Hucl, P. 1999. **A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats.** American Association of Cereal Chemists, Inc. 76: 350-354 p.
- Abeles, F. B; Takeda, F. 1990. **Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits.** Sci Hortic 42:269–275 p.
- Arancon, N. Q; Edwards, C. A; Atiyeh, R; Metzger, J. D. 2004 a. **Effects of vermicomposts produced from food waste on the growth and yields of greenhouse peppers.** Bioresource Technology 93:139-144 p.
- Arancon, N. Q; Edwards, C. A; Bierman, P; Welch, C; Metzger, J. D. 2004 b. **Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields.** Bioresource Technology 93:145-153 p.
- Arancon, N. Q; Edwards, C. A; Lee, S; Byrne, R. 2006. **Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth.** European Journal of Soil Biology 42:S65-S69 p.

- Arancon, N. Q; Lee, S; Edwards C. A; Atiyeh, R. M. 2003. **Effects of humic acids and aqueous extracts derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants.** *Pedobiologia (Jena)* 47: 744-781 p.
- Arteaga, M. G. N; Furidi F; Pino J. A; Menéndez J. L; Cartaya O. 2006. **Evaluación de las aplicaciones foliares de Humus Líquido en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) var. Amalia en condiciones de producción.** *Cultivos tropicales* 27 (3): 95-101 p.
- Atiyeh, R. M; Arancon, N. Q; Edwards, C. A; Metzger, J. D. 2000. **Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes.** *Bioresour. Technol.* 75 (3):175-180 p.
- Atiyeh, R. M; Edwards, C. A; Metzger, J. D; Lee, S; Arancon, N. Q. 2002. **The influence of humic acids derived from earthwormprocessed organic wastes on plant growth.** *Bioresour. Technol.* 84:7-14 p.
- Atiyeh, R. M; Subler, S; Edwards, C. A; Bachman, G; Metzger J. D; Shuster, W. 2000. **Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil.** *Pedobiologia (Jena)* 44:579-590 p.
- Augé, R. M. 2004. **Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations.** *Canadian Journal of Soil Science* 84:373-381 p.
- Azarmi , R; Giglou M. T; Taleshmikail, R.D. 2008. **Influence of vermicompost on soil chemical and physical properties in tomato (*Lycopersicum esculentum*) field.** *African Journal of Biotechnology* 7: 2397-2401 p.
- Bagyaraj, D. J; Sreeramulu, K. R. 1982. **Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer.** *Plant Soil* 69:375-381. p.
- Carpenter, B. 2005. **Diving into compost tea.** *Biocycle* 46:61-62 p.
- Castellanos-Morales, V; Villegas, J; Wendelin, S; Vierheilig, H; Cardenas-Navarro, R. 2010. **Root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* alters the quality of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch) at different N-levels.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:1774-1782 p.
- Castro, I, Gonçalves, O; Teixeira J. A, Vicente A. A. 2002. **Comparative study of a Selva and Camarosa strawberries from the commercial market.** *Journal of Food Science* 67: 2132-2137 p.
- Charron G; Furlan V; Bernier-Cardou M; Doyon G. 2001. **Response of onion plants to arbuscular mycorrhizae . Effects of inoculation method and phosphorus fertilization on biomass and bulb firmness.** *Mycorrhiza* 11:187-197 p.
- Cheel, J; Theoduloz, C; Rodríguez, J.A; Caligari, P; Schmeda-Hirschmann, G. 2007. **Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler.** *Food Chemistry* 102:36-44 p.
- Clifford, M. N. y Scalbert A. 2000. **Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1118-1125 p.
- De Ancos, B; González, E. M; Cano, M. P. 2000a. **Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit.** *J. Agr. Food Chem.* 48: 4565-4570 p.
- De Ancos, B; Ibañez, E; Reglero, G; Cano, M. P. 2000b. **Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit.** *J. Agr. Food Chem.* 48: 873-879 p.
- Duffy, E. M; Cassells, A. C. 2000. **The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with plant-growth promoting rhizobacteria on tuber yield and tuber size distribution.** *Applied Soil Ecology* 15:137-144. p.
- Faria, A; Oliveira, J; Neves, P; Gameiro, P; Santos,Buelga, C; De Freitas, V; Mateus, N. 2005. **Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts.** *J. Agr. Food Chem.* 53: 6896-6902 p.
- Freese, R. 2006. **Markers of oxidative DNA damage in human interventions with fruit and berries.** *Nutr Cancer* 54:143-147 p.
- Given, N. K; Venis M. A; Grierson, D. 1988. **Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit.** *Planta* 174:402-406 p.
- Gu, L; Kelm, M. A; Hammerstone, J. F; Beecher, G; Holden, J; Haytowitz, D; Gebhardt, S; Prior, R. L. 2004. **Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption.** *J nutr* 134:613-617 p.

- Proteggente, A. R; Sekher, P. A; Paganga, G; Van Buren, L; Wagner, E; Wiseman, S; Van De Put, F; Dacombe, C; Rice-Evans, C. A. 2002. **The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition.** Free Radical Res. 36: 217-233 p.
- Rababach, T. M; Ereifej, K. I; Howard, L. 2005. **Effect of ascorbic acid and dehydration on concentration of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits.** J. Agr. Food Chem. 53, 4444-4447 p.
- Redgwell, R. J; MacRae, E; Hallett, I; Fisher, M; Perry, J; Harker, R. 1997. **In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening.** Planta 203:162-173 p.
- Scalzo, J; Politi, A; Pellegrini, N; Mezzetti, B; Battino, M. 2005. **Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit.** Nutrition 21:207-213 p.
- Scheuerell, S. J, Mahaffee, W. F. 2002. **Compost tea: principles and prospects for plant disease control.** Compost Sci Util 10:313-338 p.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture 16:144-158 p.
- Smith, S. E; Read, D. J. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis.** Academic Press, San Diego.
- Sun, J; Chu, Y. F; Wu, X, Liu, R. H. 2002. **Antioxidant and antiproliferative activities of fruits.** J Agric Food Chem 50:7449-7454 p.
- Trainotti, L; Spolaore, S; Pavanello, A; Baldan, B; Casadoro, G. 1999. **A novel E-type endo- β -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits.** Plant Mol. Biol. 40:323-332 p.
- Tsavkelova, E. A; Klimova, S. Y; Cherdyntseva, T. A; Netrusov, A. I. 2006. **Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review.** Appl Biochem Microbiol 42:133-143 p.
- Vessey, K. J. 2003. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.** Plant and Soil 255: 571-586 p.
- Whipps, J. M. 2004. **Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens.** Can J Bot. 82:1198-1127 p.
- Woodman, O; Chan, E. 2004. **Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavonones.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31:786-90 p.
- Woodward, J.R. 1972. **Physical and chemical changes in developing strawberry fruits.** Journal of the Science of Food and Agriculture 23:465-473 p.
- Zandonadi, D. B; Canellas, L. P; Facxanha, A. R. 2007. **Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation.** Planta 225:1583-1595 p.
- Zehnder, G.W; Murphy, I.F; Sikora, E.J; Kloepper, J.W. 2001. **Application to rhizobacteria for induced resistance.** Eur. J. Plant Pathol. 107:39-50 p.

M. en C. Fabián Heriberto Rivera-Chávez

Egresado del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable del CIIDIR IPN Unidad Michoacán.

M. en C. Luz Elena Castillejo-Álvarez

Egresado del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable del CIIDIR IPN Unidad Michoacán.

Dr. Gilberto Vázquez-Gálvez

Profesor Investigador. Departamento de Investigación del CIIDIR IPN Unidad Michoacán.

Dra. M. Valentina Angoa-Pérez

Profesora Investigadora. Departamento de Investigación del CIIDIR IPN Unidad Michoacán.

M. en C. Guadalupe Oyoque-Salcedo

Profesora Investigadora. Departamento de Investigación del CIIDIR IPN Unidad Michoacán.

Dra. Hortencia Gabriela Mena-Violante

Profesora Investigadora. Departamento de Investigación del CIIDIR IPN Unidad Michoacán. tenchisgmv@hotmail.com.

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE HONGOS BASIDIOMICETES SILVESTRES

Blanca Estela Gómez-Luna; Gerardo Vázquez-Marrufo; Carlos Hernán Herrera-Méndez;
Alejandro Hernández-Morales y Víctor Olalde-Portugal
Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3
Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 131-141.



e-revist@s

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE HONGOS BASIDIOMICETES SILVESTRES

USE OF MOLECULAR MARKERS FOR THE STUDY OF WILD FUNGUS BASIDIOMYCETES

Blanca Estela **Gómez-Luna**¹, Gerardo **Vázquez-Marrufo**², Carlos Hernán **Herrera-Méndez**¹, Alejandro **Hernández-Morales**¹; Víctor **Olalde-Portugal**³.

¹Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad De Guanajuato. Privada de Arteaga s/n Zona Centro. C.P. 38900. Salvatierra, Guanajuato. ²Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Michoacán. ³Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Cinvestav-IPN Unidad Irapuato. Km. 9.6 Libramiento Norte carretera Irapuato-León. Irapuato, Guanajuato.

RESUMEN

Las técnicas de marcadores moleculares en el estudio de basidiomicetos silvestres, son cada vez más aplicadas a proyectos de ecología, con especial enfoque en análisis de la diversidad genética. Con frecuencia se requieren métodos especializados para la extracción del DNA de organismos de ambientes naturales, debido a los complejos compuestos que los constituyen (polímeros de carbohidratos) y los contaminantes del ambiente (partículas de suelo). Los materiales biológicos utilizados fueron basidiocarpos colectados en el bosque de Santa Rosa, Gto., y micelio aislado de estos basidiocarpos. En este trabajo se utilizó un método de extracción de DNA que permitió la amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción y la hibridación Southern por método no radiactivo. Los resultados que se obtuvieron: La amplificación de la región ITS1 de la unidad ribosomal de las diferentes especies de basidiomicetos. Se logró observar la diversidad genética entre las diferentes especies de basidiomicetos y los micelios. Además los resultados también sugieren diferencias en metilación del DNA entre el micelio vegetativo y el micelio del basidiocarpo. Por último cabe mencionar que no se encontraron trabajos previos sobre la aplicación de métodos de hibridación Southern no radiactivos para el análisis de basidiomicetos silvestres, siendo este trabajo pionero en aplicar esta técnica.

Palabras clave: Hongos, RFLP, Southern.

SUMMARY

Molecular marker techniques in the study of wild basidiomycete, are increasingly applied to ecology projects, with special focus on analysis of genetic diversity. Often require specialized methods for extracting the DNA of organisms of natural environments, because of the complex compounds that are (carbohydrate polymers) and contaminants from the environment (soil particles). Biological materials used were basidiocarps collected in the forest of Santa Rosa, Guanajuato. And mycelium isolated from these basidiocarps. In this work we used a DNA extraction method that allowed the PCR amplification, restriction enzyme digestion and Southern hybridization by non-radioactive method. The results were obtained: Amplification of the ITS1 region of ribosomal unit of the different species of Basidiomycetes. It was possible to observe the genetic diversity among different species of basidiomycetes and the mycelia. Furthermore, the results also suggest differences in DNA methylation between the vegetative mycelium and mycelium of basidiocarpo. Finally it is noteworthy that there were no previous work on the application of methods of non-radioactive Southern hybridization for analysis of wild Basidiomycetes and this pioneering work in applying this technique.

Key words: Fungus, RFLP, Southern.

INTRODUCCIÓN

Los hongos forman parte integral de los diferentes tipos de vegetación en los bosques templados y tropicales, participan en procesos de reciclaje de nutrientes y descomposición de la materia orgánica. Debido a que los hongos carecen de clorofila, su nutrición depende de otros organismos y de acuerdo con la clase de sustancias orgánicas que aprovechen pueden ser, entre otros: saprobios, parásitos o simbioses. Por esto los hongos son muy versátiles y su hábitat es muy amplio y diversificado (Herrera y Ulloa, 1998).

La identificación del micelio vegetativo de macromicetos silvestres aislados de suelo u de otros sustratos presenta algunas dificultades (Rogers y col., 1989) por: i) las características morfológicas y estructurales de los micelios de hongos ectomicorrízicos (EM) no varían grandemente, ii) varias especies de simbioses EM no pueden ser aislados en cultivo puro y iii) muy pocos hongos EM

forman cuerpos fructíferos en cultivo puro. Los estudios por PCR han sido evaluados para la identificación de hongos EM. Esta es una valiosa herramienta en el estudio de evolución molecular y biología poblacional.

La identificación del micelio vegetativo los macromicetos silvestres aislados de suelo u otros sustratos presenta algunas dificultades (Rogers *et al.*, 1989) por: i) las características morfológicas y estructurales de los micelios de hongos ectomicorrícicos (EM) no varían grandemente, ii) varias especies de simbiontes EM no pueden ser aislados en cultivo puro y iii) muy pocos hongos EM forman cuerpos fructíferos en cultivo puro. Los estudios por PCR han sido evaluados para la identificación de hongos EM. El método permite la amplificación de secuencias blanco de DNA. Esta es una valiosa herramienta en el estudio de evolución molecular y biología poblacional.

La generación de huellas moleculares a partir del DNA de hongos (Rosewich y McDonald, 1994), y el establecimiento de relaciones filogenéticas entre el taxa coprinoides y otras relacionadas se han basado en los sitios de restricción en los productos de amplificación de la región ITS (Hopple *et al.*, 1994). Se han realizado análisis RFLPs utilizando la región IGS de la Unidad Ribosomal en cultivos del hongo Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae* (Iracabal y Labarére, 1994). El análisis RFLPs de distintas regiones de la UR se ha aplicado en estudios de sistemática molecular del género *Pleurotus* (Iracabal *et al.*, 1995). Los RFLPs se han aplicado en la identificación de hongos EM con el objetivo de conocer la persistencia y distribución de los hongos EM en ecosistemas de bosque (Armstrong *et al.*, 1989). En la identificación y abundancia de *Tylospora fibrillosa*, hongo EM, en una zona forestal (Erland, 1995). Por último, en trabajos de diversidad genética en poblaciones de *Uncinaria necator*, comparando aproximaciones basadas en RFLPs y PCR (Stumer, 2000); diversidad de hongos en suelo por RFLPs - PCR de la región ITS (Viaud, 2000) e identificación de especies por patrones de RFLPs de *Flammulina* y determinación de patrones biogeográficos entre especies (Methven, 2000). Otra aplicación del RFLPs al estudio de macromicetos es en la detección de los niveles de metilación de residuos de citosina del DNA en *Coprinus cinereus* después de la replicación meiótica (Zolan y Pukkila 1986).

El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis genético molecular comparativo en micelio vegetativo y tejido del basidiocarpo de diferentes especies de macromicetos silvestres a partir de especímenes colectados en la sierra de Santa Rosa, Gto., por marcadores moleculares e hibridación Southern no radiactivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizan entre 50 y 500 mg de peso húmedo de muestra, tanto micelio vegetativo como fragmentos de himenio del basidiocarpo, de los hongos silvestres de la colección del Laboratorio de Micología Básica de la Universidad de Guanajuato y del Laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV- IPN U. Irapuato.

Producción de biomasa del micelio vegetativo

Para la obtención de suficiente biomasa de los micelios aislados se resiembran tomando de la orilla de la colonia y se inoculan en emplean en medio PDB. Los cultivos líquidos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml a los cuales se les agregaron 25 ml de medio líquido PDB estéril. Con la ayuda de un sacabocados metálico de 0.5 cm de diámetro, se colocan en cada matraz 5 cilindros con inóculo de los micelios provenientes de un precultivo en PDA, todo esto en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Los matraces así inoculados se incuban en una cámara oscura a 24°C y 180 rpm por 8 días dependiendo de la cepa con el fin de obtener el mayor crecimiento de todos los micelios. Después de este tiempo se procede a filtrar al vacío los

micelios con un embudo de Buchner de porcelana y papel filtro (Whatman No. 41), el micelio se desprende del papel con una microespátula limpiada con etanol al 70% y se coloca en una bolsita de plástico etiquetada con el código del micelio, enseguida se coloca en un termo con N₂ líquido para congelarlo. Los micelios se almacenan en un ultracongelador Revco a -70°C para preservar el DNA íntegro en el momento que se requiera su extracción.

Aislamiento de DNA

Extracción del DNA, el tejido se congelo con N₂ líquido y se macero en un mortero. Se agregaron 500 µl de regulador de extracción: TrisHCl pH 8.5, 100 mM, SDS al 2%, EDTA 50 mM pH 8.5 y NaCl 50 mM. Se agregó 500 µl de cloroformo. Se centrifugaron 10 min a 12,000 rpm. Se agregó Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:24:1). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 10 min, y se precipito el DNA con isopropanol frío.

Digestión del DNA total RFLP

La digestión del DNA se realizó con las enzimas, *Msp* I y *Hpa* II para carpóforo y micelio. Se utilizaron 10 µl de DNA con 1U de enzima y su regulador a un volumen final de 20 µl. Se incubo toda la noche a 37°C.

Obtención de sonda de hibridación

Southern no radioactivo

Para la hibridación se incubo la membrana (con el DNA previamente transferido) durante una noche con la sonda de DNA a 65°C. Para la detección, se sumergio la membrana en Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M. Se bloqueó la membrana en Tris – HCl pH 7.5 0.1 M, NaCl 0.15M, agente bloqueador al 0.5%. Se incubo por 1 h y se colocó en Tri-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M, agente bloqueador al 0.5% y anticuerpo conjugado Antifluoresceína-HRP 1/1000 (v/v). Se incubo 1 h. Se mezcló con volúmenes iguales del kit Enhanced Luminol Nucleic Acid Chemiluminescence Reagent. Se colocó la membrana en un “cassette” de exposición y sobre ella una película de rayos X.

Para la amplificación de DNA diferentes se utilizaron los oligonucleotidos descritos por White *et al.* (1990), ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3', la mezcla para PCR fue de 15 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8.3, 200 µl de MgCl₂, 1 µl de cada uno de los oligonucleotidos y 0.5 U de enzima *Taq* polimerasa. Se utilizaron 25 ng del DNA de *Amanita rubescens* para la sonda de hibridación. El programa fue: 94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 45 s, 52°C 1 min 30 s, 72°C 2 min y 72°C 7min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biodiversidad es el resultado de un proceso evolutivo que se manifiesta en los diferentes modos de vida a lo largo de toda la escala de organización de los seres vivos. Así, podemos observar y estudiar una biodiversidad morfológica, fisiológica, bioquímica y genética, en los macromicetos silvestres de la sierra de Santa Rosa, Gto. Dado el gran número de funciones que los hongos desempeñan en las áreas naturales terrestres, particularmente en los bosques templados, el estudio de marcadores genéticos de macromicetos silvestres puede contribuir de una manera sustancial al conocimiento de la dinámica de un ecosistema forestal y de la respuesta de este a factores de perturbación ambiental, ayudando así en proyectos de conservación y restauración de áreas de importancia ecológica, como lo es el bosque de Santa Rosa, en el estado de Guanajuato.

El uso de técnicas de marcaje y detección de fragmentos de DNA sin utilización de radiactividad ha ido estableciéndose de manera cada vez más sólida en los laboratorios de Biología Molecular. Este

tipo de técnicas han ido progresando de tal forma que en la actualidad algunas de ellas poseen una sensibilidad semejante a la detección por medio de radiactividad. Así, se han desarrollado técnicas para la cuantificación de productos de amplificación obtenidos por PCR utilizando biotina (Atamas y White, 1997) al igual que se han descrito métodos de fotoimmunodetección para el marcaje y detección de fragmentos de DNA con sensibilidades menores a un picogramo en regiones homólogas (Marvik *et al.*, 1997). De la misma forma, el marcaje no radiactivo ha sido aplicado para realizar ensayos de RT-PCR in situ, utilizando iniciadores marcados con fluoresceína (Stein *et al.*, 1997). Además de su gran sensibilidad, muchos de estos métodos son de rápido desarrollo y la gran mayoría resultan más económicos que el marcaje radiactivo. Otras ventajas adicionales de los métodos que no emplean radiactividad para el marcaje y detección de DNA son el menor una mayor facilidad de ejecución y el menor riesgo para el experimentador y los ecosistemas. En el caso particular de los hongos Basidiomycetes la aplicación de técnicas no radiactivas para el estudio de ácidos nucleicos es prácticamente inexistente. En uno de estos escasos estudios se han utilizado sondas de DNA marcadas con biotina para la discriminación de aislados fértiles (heterocariontes) e infértiles (homocariontes) del hongo comestible cultivable *Agaricus bisporus* (Sonnenberg y Zandt-Linders, 1992), conocido popularmente como champiñón.

Al amplificar la región ITS1 se observó un solo producto de amplificación el cual presentó un tamaño 290 de pb para *Amanita rubescens*, el producto de amplificación se utilizó como sonda de hibridación. La sonda del fragmento ITS1 de *A. rubescens* dio una buena definición de los patrones de restricción en los basidiocarpos. Se encuentran claras diferencias entre los tamaños de las bandas generadas para las distintas especies, indicando que la localización de los sitios de corte para las enzimas probadas varió de una especie a otra. En la mayoría de los hongos estudiados se observan bandas de hibridación de carpóforos arriba de las 500 pb, indicando que no existen sitios de corte para las enzimas estudiadas dentro de la región ITS1 de los hongos estudiados. Al comparar los datos de restricción en basidiocarpos con las enzimas *Msp* I y *Hpa* II no se observaron diferencias en los patrones de digestión de los especímenes estudiados, particularmente cuando se utiliza la sonda ITS1 de *A. rubescens*.

Trabajos previos en el estudio de metilación de hongos, particularmente en los casos donde se analizan Basidiomycetes, han utilizado cromatografía de capa fina de DNA marcado con fósforo radiactivo (Antequera y col, 1984), visualización de dobles digestiones de DNA directamente en geles de agarosa (Wilke y Wach, 1993), hibridación tipo Southern con sondas marcadas con fósforo radiactivo (Zolan y Pukkila, 1986; Li y Horgen, 1993) y recientemente la cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC, Binz y col., 1998).

El uso de los genes de la región UR o DNAr de mitocondria en hongos, amplificados por PCR, nos permite hacer estudios de comparaciones de evolución, filogenia, estudios ecológicos (como puede ser la dinámica de poblaciones), detección de polimorfismos para la generación de huellas moleculares y comparaciones en bancos de datos para fines taxonómicos.

No obstante que a la fecha existe una gran cantidad de información respecto al proceso de metilación del DNA en organismos procariotes, los posibles papeles fisiológicos de tal fenómeno en eucariotes en general y en los hongos en particular, aun no es del todo clara. La información al respecto de los niveles de metilación en hongos de la subdivisión Basidiomycotina es particularmente escasa y los resultados, en algunos casos, contradictorios. En este trabajo se estudió la posibilidad de encontrar 5mC dentro de la región ITS1 de macromicetos silvestres debido a que hasta ahora es la única base significativamente metilada encontrada en hongos (Wilke y Wach, 1993) y para esto se escogieron las enzimas isosquisomeras *Msp* I y *Hpa* II que tienen como blanco la secuencia CCGG diferenciando entre 5mC interna o externa (Doerfler, 1983).

En estudios iniciales de DNA total Antequera *et al.*, (1984) concluyen que los niveles de 5 metil citosina son bajos o inexistentes en *Schizophyllum commune*, al igual que en la mayoría de Deuteromycetes y Ascomycetes estudiados, sin embargo, encuentran que dichos niveles son más significativos en el zigomycete *Phycomyces blakesleeanus*. En contraste, recientemente Binz y col. (1998) concluyen que *Agaricus bisporus* y *Armillaria bulbosa* se encuentran entre los hongos con mayores niveles de 5 metil citosina en DNA total, por encima de los Ascomycetes. Aunque Wilke y Wach (1993) no realizan determinaciones sobre los niveles de metilación de DNA total de *A. bisporus*, estos mencionan que existen ciertos niveles de 5 metil citosina. Por otra parte, cuando se estudian zonas definidas del DNA de Basidiomycetes, los resultados muestran diversos niveles de metilación. En *Coprinus cinereus* se han encontrado niveles significativos de metilación en regiones relacionadas con el centrómero de los cromosomas (Zolan y Pukkila, 1986). En el caso concreto de regiones de DNA relacionadas con la Unidad Ribosomal, se ha encontrado que *Schizophyllum commune* tiene niveles significativos de metilación y que el patrón varía entre distintas cepas (Specht *et al.*, 1982), mientras que no hay evidencia de metilación de citosina en los genes de rRNA mitocondrial de *A. bisporus* (Jin y Horgen, 1992). En el caso del hongo ascomycete *Neurospora crassa* se ha encontrado que la 5 metil citosina está presente principalmente dentro de las regiones interespaciadoras que no se transcriben (Perkins *et al.*, 1986), en contraste a lo observado en *P. blakesleeanus*, en el cual no hay niveles significativos de metilación dentro de la UR. El resultado obtenido para los tejidos de los basidiocarpos estudiados en el presente trabajo muestran que no existen diferencias en el patrón de bandeo cuando se comparan los autorradiogramas de las digestiones de DNA con MspI y HpaII, particularmente al utilizar la sonda ITS1 de *A. rubescens*. Solo en el caso de las muestras 1399 y POG1 parecen modificarse el tamaño de las bandas obtenidas. La mayoría de las regiones ITS1 caracterizadas a la fecha en hongos no excede los 450 pb, presentando un tamaño promedio de 250 pb. Por lo anterior, y debido al tamaño aproximado de las bandas obtenidas en los ensayos de hibridación Southern, es posible suponer que la región ITS1 del micelio de los basidiocarpos de los basidiomycetes silvestres aquí estudiados presenta niveles de 5 metil citosina muy bajos o inexistentes. Al analizar de manera combinada el tamaño de las bandas obtenidas en micelio vegetativo y basidiocarpo para aquellas muestras con las cuales se pudo trabajar con los dos tipos miceliares los resultados son interesantes. El patrón de bandeo del micelio vegetativo de las muestras POG1 con la sonda ITS1 de *I. geophylla* da una banda de aproximadamente 4.2 kb y otra de 800 pb que también aparece con las otras dos sondas ITS1 utilizadas. Dichas bandas no se encuentran presentes cuando se analiza el basidiocarpo, particularmente en los resultados encontrados con la sonda de ITS1 de *A. rubescens*. De la misma forma, los patrones de bandeo de los micelios vegetativos de las muestras 1899, LAC y J, difieren de los patrones encontrados para sus respectivos basidiocarpos. Lo anterior indica que los patrones de metilación entre los tipos miceliares analizados difieren para una misma especie. Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo en el que se estudian los patrones de metilación de basidiocarpos de macromicetos silvestres y se comparan los datos con los patrones de metilación del micelio vegetativo.

A la fecha no se conoce si la presión de las condiciones ambientales tiene alguna influencia sobre los niveles de metilación, aunque se ha reportado la pérdida de sitios de metilación después de prolongados subcultivos y almacenamiento a 4°C del micelio vegetativo de hongos utilizados como modelo de estudio (Zolan y Pukkila, 1986). En otro trabajo se menciona que, en general, no hay relación entre la degeneración de cepas y el aumento o disminución de la metilación, que podría encontrarse en el hongo comercial *A. bisporus*, pero que la metilación del DNA ha sido reportada como un proceso de mutagenésis que pudieran ser por una metilación de novo y transmitirse por meiosis (Zolan y Pukkila, 1986; Binz *et al.*, 1998).

Aunque en este estudio no se estimó el número de copias detectadas en cada una de las muestras analizadas, es posible que la intensidad de las bandas encontradas tenga relación con el número de

copias existentes en cada una de las muestras de basidiocarpo y micelio vegetativo, el cual puede diferir de una muestra a otra. Afortunadamente las membranas utilizadas en este trabajo pueden ser regeneradas e hibridadas de nuevo con las mismas sondas o con otras sondas de interés dentro y fuera de la Unidad Ribosomal. De esta forma es posible optimizar el método de hibridación aquí montado y contestar algunas de las interrogantes surgidas con la presente aportación. Permitirá tener una mejor idea de los cambios en la composición de especies fúngicas ocasionados por diferentes alteraciones en la estructura y función del bosque. Para el estudio de estos cambios será necesario contar con un banco sondas de prueba y marcadores genéticos de los diferentes grupos de hongos, particularmente de las variedades silvestres locales.

CONCLUSIONES

El método de marcaje e hibridación tipo Southern sin utilización de sondas radiactivas permite la detección de polimorfismos genéticos relacionados con la metilación del DNA de macromicetos silvestres.

Los resultados de hibridación encontrados en el micelio vegetativo y el micelo de los tejidos del basidiocarpo indicaron que existen diferencias en los niveles de metilación del DNA entre estos dos tipos miceliarios, en las especies estudiadas. Pero no en los patrones de metilación.

LITERATURA CITADA

- Antequera, F.; Tamame M.; Villanueva J. R. y Santos T. 1984. **DNA Methylation in the Fungi**. The Journal of Biological Chemistry. 259 (13): 8033-8036.
- Armstrong, J. L.; Fowles, N. L. y Rygiewicz, P. T. 1989. **Restriction length polymorphisms distinguish ectomycorrhizal fungi**. Plant and Soil. 116: 1-7.
- Atamas, S. P. y White, B. 1997. **Nonradioactive method for quantitation of PCR products without hybridization with a specific probe**. BioTechniques. 22: 20- 22.
- Binz, T.; D'Mello, N. y Horgen, P. A. 1998. **A comparison of DNA methylation levels in selected isolates of higher fungi**. Mycologia. 90 (5):785-790.
- Doerfler, W. 1983. **DNA Methylation and Gene Activity**. Ann. Rev. Biochem. 52: 93-124.
- Erland, S. 1995. **Abundance of *Tylospora fibrillosa* ectomycorrhizas in a South Swedish spruce forest measured by RFLP analysis of PCR-amplified rDNA ITS region**. Mycol. Res. 99(12): 1425-1428.
- Herrera T. y Ulloa M. 1998. **El Reino de los Hongos**. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 364 – 433.
- Hopple, J. S. Jr. y Vilgalys, R. 1994. **Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA**. Mycologia. 86(1): 96-107.
- Iracabal, B.; Zervakis, G. y Labarère, J. 1995. **Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA**. Microbiology. 141:1479-1490.
- Jin , T. y Horgen, P. A. 1992. **Further characterization of a large inverted repeat in the mitochondrial genomes of *Agaricus bisporus* (*A. brunnescens*) and related species**. Curr. Genet. 23: 228-233.
- Marvik, O. J.; Isaksen, M. L.; Roza, L. y Lindqvist, B. H. 1997. **Photoimmunodetection: a nonradioactive labeling and detection method for DNA**. BioTechniques. 23: 892-896.
- Methven, A.; Hughes, K. W. y Petersen, R. H. 2000. ***Flammulina* RFLP patterns identify species and show biogeographical patterns within species**. Mycologia. 92(6): 1064-1070.
- Perkins, D. D.; Metzzenberg, R. L.; Raju, N. B.; Selker, E. U. y Barry, E. G. 1986. **Reversal of a *Neurospora crassa* translocation by crossing over involving displayed rDNA, and methylation of the rDNA segments that result from recombination**. Genetics. 114: 791- 817.
- Rogers, S. O.; Rehner S.; Bledsoe, C.; Mueller, G. J. y Ammirati, J. F. 1989. **Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridizations**. Can. J. Bot. 67: 1235-1243.
- Rosewich, U. L. y McDonald, B. A. 1994. **DNA fingerprinting in Fungi**. Methods in Molecular and Cellular Biology. 5:41-48.
- Sonnenberg , A. S. M. y Zandt-Linders, J. W. C. 1992. **The use of a nonradioactive nucleic acid detection system in the breeding of mushrooms**. Focus. 14: 62- 64.

- Specht, C. A., Novotny, C. P. y Ullrich, R. C. 1982. **Strain specific differences in ribosomal DNA from the fungus *Schizophyllum commune***. Curr. Genet. 8: 219-222.
- Stein, U.; Walther, W.; Wendt, J. y Scild, T. A. 1997. **In situ RT-PCR using fluorescence –labeled primers**. BioTechniques. 23: 194-198.
- Stummer, B. E.; Zanker, T.; Scott, E. S. y Whisson, D. L. 2000. **Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*: comparison of RFLP- and PCR-based approaches**. Mycol. Res. 104(1): 44-52.
- Viaud, M., Pasquier, A. y Brygoo, Y. 2000. **Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS**. Mycol. Res. 104(9): 1027-1032.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. y Taylor, J. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. PCR protocols: A guide to methods and applications. M. A. Inns, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds). Academic Press. San Diego California. USA. 315-322.
- Wilke, N. W. y Wach, M. P. 1993. **Detection of Methylated Mushroom DNA by Restriction Enzyme Analysis**. Mycologia. 85(4): 585-591.
- Zolan, M. E. y Pukkila, P. J. 1986. **Inheritance of DNA Methylation in *Coprinus cinereus***. Molecular and Cellular Biology. Jan:195-200.

Dra. Blanca Estela Gómez Luna

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. bgomezl2000@yahoo.com.

Dr. Gerardo Vázquez-Marrufo

Profesor-Investigado Titular de Tiempo Completo. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Alejandro Hernández Morales

Profesor Investigador de Tiempo Completo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

Dr. Víctor Olalde Portugal

Investigador Titular. Laboratorio de Bioquímica Ecológica. Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Irapuato.

ANEXOS

ENZIMA	SONDA ITS1	MUESTRA	PM (pb)	
<i>Msp I</i>	<i>A. rubescens</i>	GR57-2	500	
		AR	300	
		LAC	750	
		J	750	
		GR57-2	500, 750	
		POG1	800, 1500, 1900, 4200	
		1899	750, 1500	
		3599	800, 1500	
		3799	300	
		4099	400	
		6799	800, 1900	
		<i>Trichoderma sp.</i>	GR57-2	500, 750
			POG1	800
		<i>Hpa II</i>	<i>A. rubescens</i>	GR57-2
POG1	800			
1899	750			
3599	800			
6799	800			
<i>I. geophyla</i>	GR57-2			500, 750
	POG1			800
	1899			750
<i>Trichoderma sp.</i>	3599			800
	6799		800	
	AC		300	
	AR		300	
	LAC		300	
	J		300	
	GR57-2		500, 750	
	POG1		800	
	1899		750	
	3599		800	
	3799	300		
	4099	400		
	6799	800		

Tabla 1. Micelios patrones de restricción e hibridación "Southern".

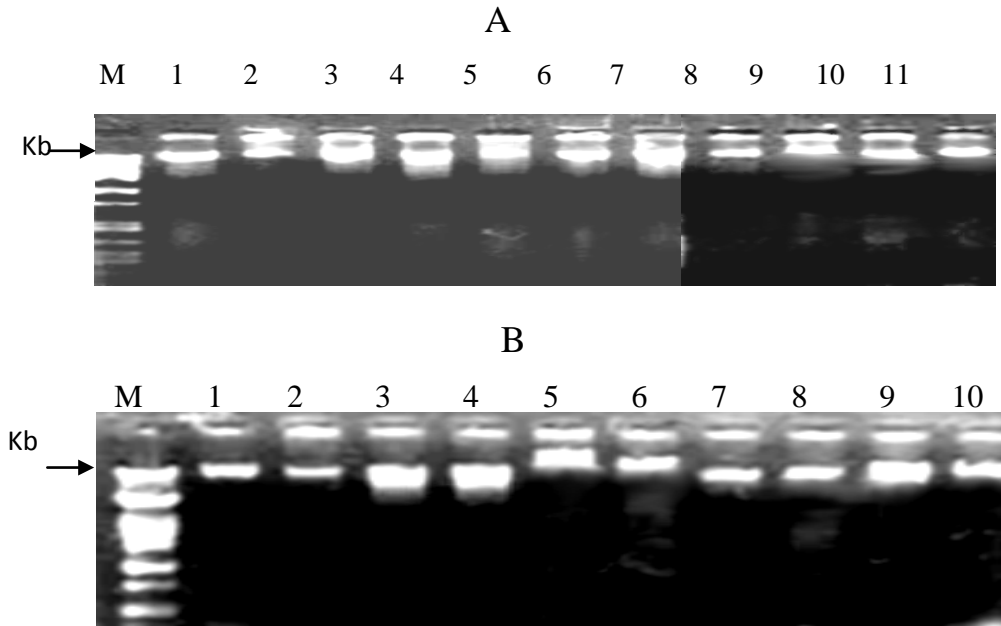


Figura 1. Gel de agarosa al 1% con Br-Et que muestra DNA de basidiocarpos (A) y micelio vegetativo (B) de las especies estudiadas. M marcador \square /Pst.

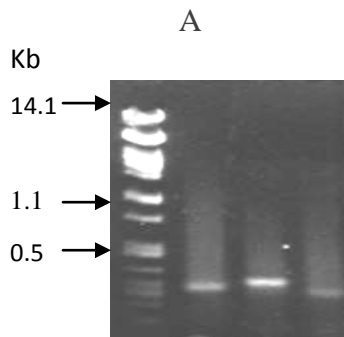


Figura 13. A) Productos de amplificación por PCR de la región ITS 1 de basidiocarpos utilizados como sondas, carriles 1) *Amanita rubescens*, 2) *Trichoderma sp.* y 3) *I. geophyla*. Geles de agarosa al 1% (w/v) con bromuro de etidio, M marcador de peso molecular \square /I.

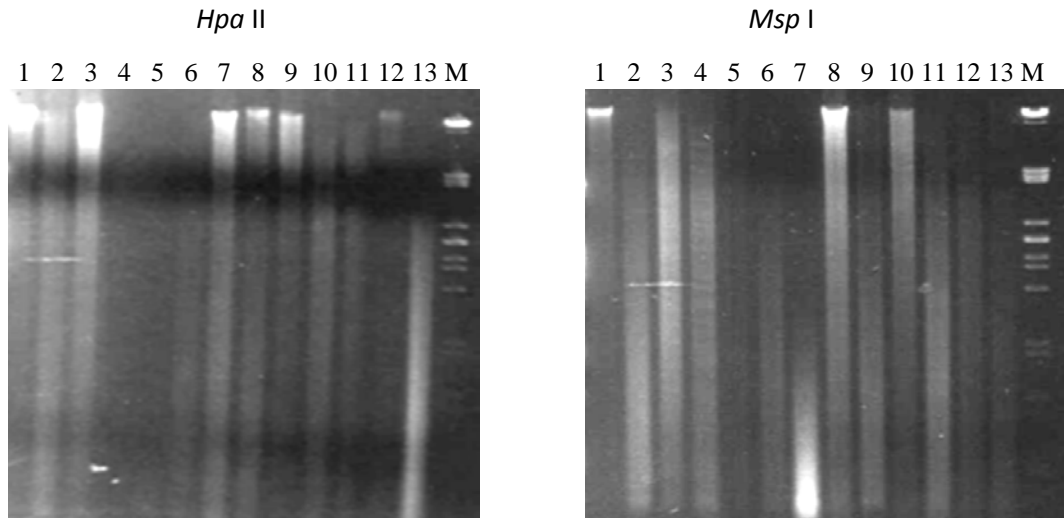


Figura 14. Productos de digestión del DNA aislado de basidiocarpos de macromicetos silvestres. Gel de agarosa 1% (w/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: *Hpa* II 1) AC198, 2) LAC198, 3) J, 4) Libre, 5) 16, 6) POG1, 7) 0799, 8) 0999, 9) 1199, 10) 1399, 11) 1899, 12) 5099, 13) 9099. *Msp* I 1) AC198, 2) LAC198, 3) J, 4) 44244, 5) 16, 6) POG1, 7) 9099, 8) 0799, 9) 0999, 10) 1199, 11) 1399, 12) 1899. M marcador de peso molecular \square /Pst I.

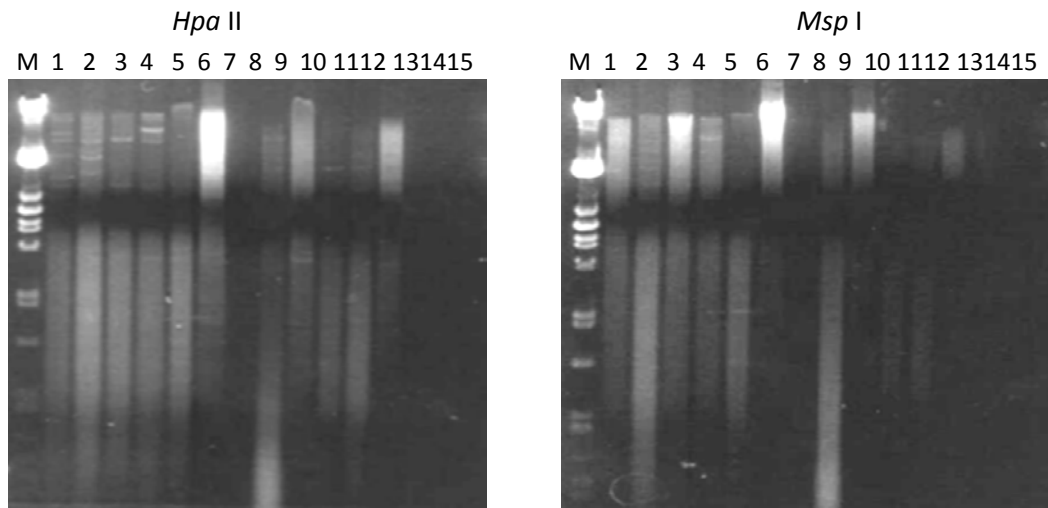


Figura 15. Productos de digestión del DNA aislado de micelio de macromicetos silvestres. Gel de agarosa 1% (w/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) AC, 2) AR, 3) LAC, 4) J, 5) GR57-2, 6) POG1, 7) R057, 8) 1899, 9) 3599, 10) 3799, 11) 4099, 12) 6799, 13) ITS1 *A. rubescens*, 14) ITS1 *I. geophyla*, 15) ITS1 *Trichoderma* sp. M marcador de peso molecular \square /Pst I.

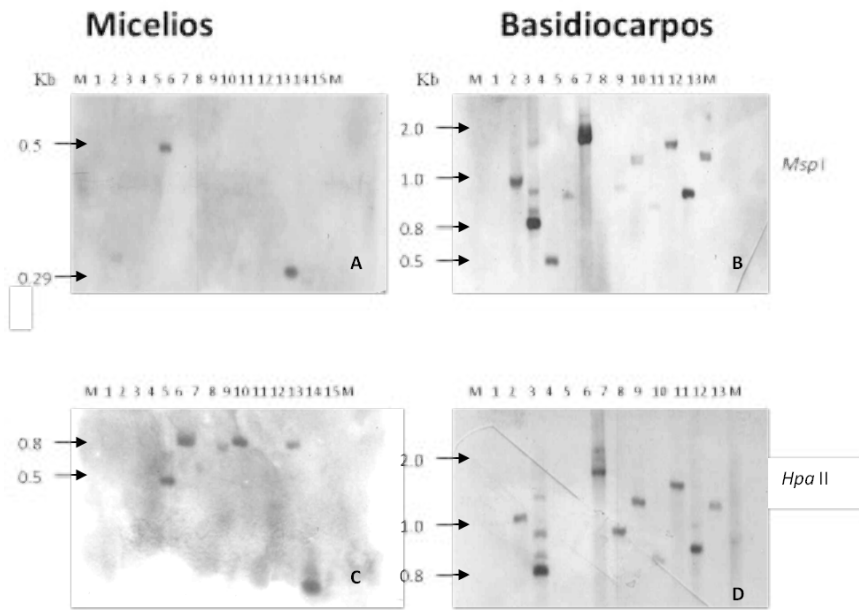


Figura 1. Hibridación Southern de las diferentes especies de macromicetos silvestres con la sonda ITS1 *A. rubescens*. A) Micelios con Msp I, B) Basidiocarpos con Msp I, C) Micelios con Hpa II, y D) Basidiocarpos Hpa II.

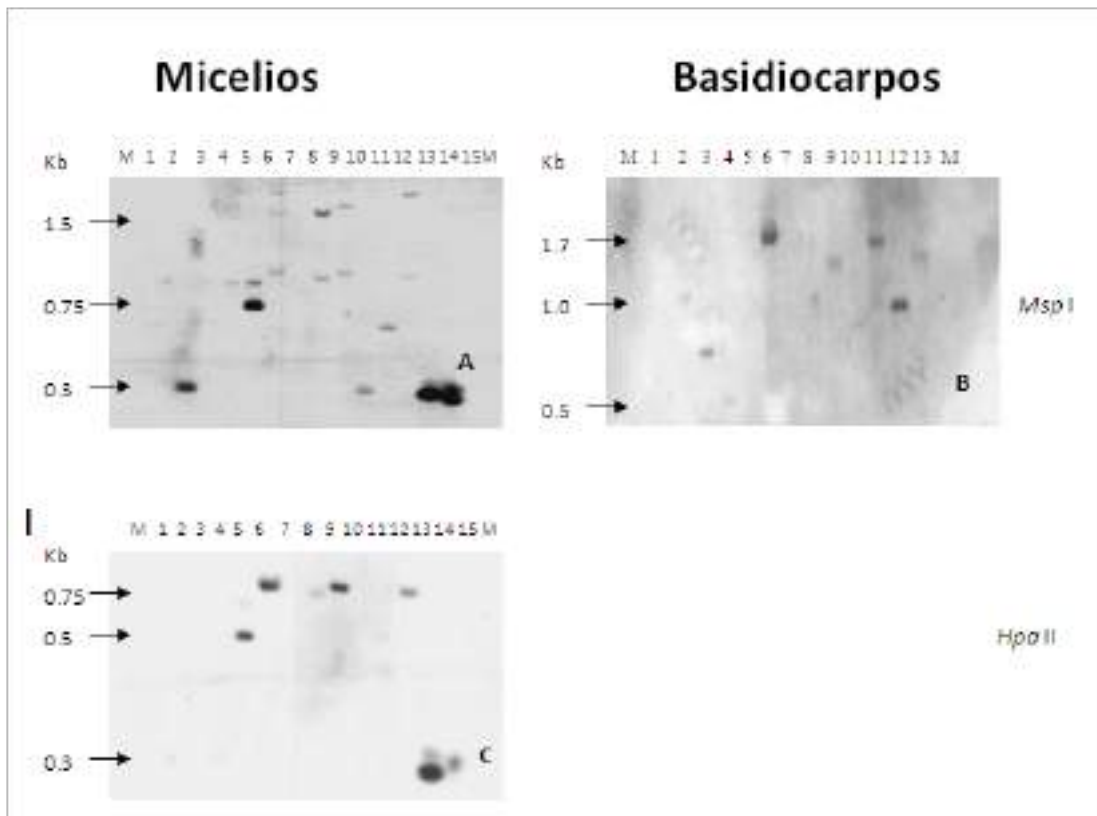


Figura 17. Autorradiografía que muestra los patrones de hibridación “Southern” de las diferentes especies de macromicetos silvestres estudiados utilizando como sonda el fragmento ITS1 obtenido por PCR del basidiocarpo de *I. geophyla*. A y C) Carriles: 1) AC, 2) AR, 3) LAC, 4) J, 5) GR57-2, 6) POG1, 7) RO57, 8) 1899, 9) 3599, 10) 3799, 11) 4099, 12) 6799, 13) ITS1 *A. rubescens*, 14) ITS1 *I. geophyla*, 15) ITS1 *Trichoderma sp.* B) Carriles: 1) AC198, 2) LAC198, 3) J, 4) 44244, 5) 16, 6) POG1, 7) 9099, 8) 0799, 9) 0999, 10) 1199, 11) 1399, 12) 1899, 13) 5099. M marcador de peso molecular. El I se transfirió el cual no hibrida con la sonda utilizada funcionando como control negativo.

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

PROTEÓMICA DE LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus* sp.) CULTIVADOS EN MÉXICO, UNA PRIMERA APROXIMACIÓN

Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas; Cristina Alonso-Ojeda y Pedro Antonio García-Saucedo

Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3

Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 143-157.



e-revist@s

PROTEÓMICA DE LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus sp.*) CULTIVADOS EN MÉXICO, UNA PRIMERA APROXIMACIÓN

PROTEOMICS OF THE RIPENING OF BLACKBERRY FRUITS (*Rubus sp.*) GROWN IN MEXICO, A FIRST APPROACH

Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas^{1*}; Cristina Alonso-Ojeda²; Pedro Antonio García-Saucedo³.

¹Profesora e Investigadora de Tiempo Completo, Laboratorio de Interacciones Planta Ambiente, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ²Ingeniero Agrónomo con especialidad en Fruticultura, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". ³Profesor de Tiempo Completo, Laboratorio de Bromatología, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Paseo Lázaro Cárdenas S/N esq. Berlín, Col. Viveros, CP 60190, Uruapan, Michoacán, México. *Correo electrónico: atchavez@umich.mx

RESUMEN

La producción de zarzamora en México ha aumentado 200 % en la última década. Las principales variedades utilizadas han sido introducidas y su establecimiento bajo las condiciones climáticas de México ha requerido de adaptaciones considerables al manejo agronómico observado en las regiones de origen de las mismas. El reto esencial del manejo de este producto se basa en las características intrínsecas de sus frutos suaves y su corta vida de anaquel, por lo que el conocimiento de su proceso de maduración bajo las condiciones de cultivo en México resulta indispensable para lograr manipular y mejorar la productividad y calidad de los frutos hasta su destino final. Con la intención de abordar en forma inicial esta problemática, se planteó como objetivo de este trabajo establecer las condiciones de protocolos de análisis de proteínas que permitan evaluar los componentes proteicos en frutos de zarzamora durante la maduración. Para lo cual se identificaron seis estadios de maduración de los frutos de la variedad comercial 'Brazos' (considerando desde frutos verdes y con bajo desarrollo, hasta frutos en madurez de consumo), se seleccionó un método de extracción de proteínas y se efectuó un perfil proteico por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Además, se establecieron los requerimientos para la electroforesis bidimensional (2-DE) de los extractos obtenidos, evaluando las condiciones de isoelectroenfoque y métodos de tinción. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó utilizar 400 µg de proteína total en tiras de IPG de 7 cm con un intervalo de pH de 3 a 10, a un voltaje máximo de 50 000 V y tinción con azul de Coomassie. Utilizando el programa KODAK MI versión 4.5, se practicó un análisis preliminar de la distribución y abundancia de los péptidos expresados en los seis estadios de maduración, observando que el estadio 2 presentó el mayor número de puntos peptídicos (158), que el mayor porcentaje de puntos peptídicos en todos los estadios se presentaron en un intervalo de pH de 5.0 a 6.9 y peso molecular de 30 a 50 kDa. Se identificaron cuatro puntos de intensidad similar durante la maduración; sugiriendo su expresión constitutiva, tres de intensidad decreciente; que podrían estar involucrados en procesos iniciales del crecimiento del fruto, cuatro que se inducen durante maduración y seis de intensidad oscilante.

Palabras clave: proteínas, electroforesis desnaturizante, electroforesis bidimensional.

SUMMARY

Blackberry production in Mexico has increased 200 % in the last decade. The main varieties used have been introduced from other countries, and its establishment under the climatic conditions of México has required considerable adaptations to the agronomic management observed in the regions of origin thereof. The essential challenge of managing this product is based on the intrinsic characteristics of its soft fruit and its short shelf life, so that knowledge of their maturation process under their growing conditions in Mexico is imperative to achieve and improve handling productivity and fruit quality unto its final destination. The aim of this work was to first address this problem by establishing the conditions of protocols for the analysis of proteins in blackberry fruits during different ripening stages. To accomplish this goal, six stages of fruit ripening were identified for the commercial variety 'Brazos' (considering a range of development from green, small fruits to fruits fully developed and in harvest maturity), a protein extraction was selected and a protein profile was performed by electrophoresis under denaturing conditions. In addition, requirements were established for two-dimensional electrophoresis (2-DE) of the extracts obtained by evaluating the conditions of isoelectric focusing and staining methods. According to the results obtained, it was determined to use 400 µg of total protein in IPG strips of 7 cm with a pH range of 3 to 10, using a maximum voltage of 50 000 V, and Coomassie blue staining. A preliminary analysis of the distribution and abundance of the peptides expressed in the six stages of maturation was performed using the KODAK MI software version 4.5, and the results showed that the stage 2 presented the highest number of peptide spots (158), the highest percentage of spots at all stages were observed in a pH range of 5.0 to 6.9 and molecular weight of 30 to 50 kDa. We identified four spots of similar intensity, suggesting its constitutive expression, three of decreasing expression; that could be involved in the initial processes of fruit growth, four spots of induced expression, and six of oscillating degrees of expression during ripening.

Key Words: proteins, denaturing electrophoresis, two-dimensional electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

La producción de zarzamora en México ha cobrado gran importancia en los últimos años, de 1995 a 2005 la superficie cultivada de esta frutilla se elevó más de 500 %, reportando una producción nacional de 118,421.73 t para el 2008 (SAGARPA, 2009; SNIIM, 2008). En 2010, Michoacán aportó el 95 % de la producción nacional, con cerca de 60,000 t y un valor de producción mayor a 1,357 millones de pesos (SIAP, 2011), las principales variedades cultivadas han sido generadas en el extranjero y han requerido adaptaciones biotecnológicas considerables en su manejo para lograr los rendimientos observados, destacando las variedades “Brazos” y “Tupy” (Muñoz y Juárez, 1995; SAGARPA, 2002; Inforural, 2010).

La zarzamora producida en México es comercializada principalmente como fruto en fresco y su mayor demanda se encuentra en el mercado internacional, por lo que un factor limitante de su comercialización es la conjunción de sus características intrínsecas de frutilla suave, el requerimiento de ser cosechada en madurez de consumo y su corta vida de anaquel, que es menor a ocho días (Piña-Dumoulin *et al.*, 2001). Por lo que para poder conocer y eventualmente manipular las condiciones de manejo postcosecha con el fin de prolongar su vida de anaquel, es necesario comprender el proceso de maduración de los frutos de zarzamora, de manera específica en los frutos introducidos y bajo las condiciones agroclimáticas bajo las cuales se desarrollan en este país.

La zarzamora forma un fruto agregado llamado polidrupa, que posee de pequeños frutos llamados drupelas o mini drupas, cada una con una semilla e insertas en un receptáculo (Hummer, 1996; Bolmgren y Eriksson, 2010).

La maduración de los frutos involucra cambios bioquímicos y fisicoquímicos que generan consecuentes aumentos en talla y peso del fruto, cambios en la tasa respiratoria, en el contenido de agua, transiciones en la pigmentación, textura, así como producción de sabores y aromas altamente distintivos que afectan la palatabilidad de los frutos. La expresión de los genes asociados a estos cambios fisiológicos está regulada por estímulos externos e internos, incluyendo temperatura, iluminación, estatus nutricional, disponibilidad de agua, así como reguladores del crecimiento vegetal (Manning, 1998).

En los frutos llamados climatéricos la acumulación de etileno dispara el proceso de maduración y su tasa endógena puede ser afectada por la concentración exógena, por lo que se considera a este regulador como el blanco para la manipulación de su vida de anaquel (Matas *et al.*, 2009). Por su parte la zarzamora es un fruto no-climatérico, en este tipo de frutos la inducción de la maduración por etileno no existe o no es tan pronunciada y por ello la cosecha debe realizarse hasta alcanzar la madurez de consumo (Srivastava, 2002).

Los primeros esfuerzos por conocer los mecanismos de regulación de los procesos de maduración de frutos fueron enfocados al estudio de la expresión y actividad enzimática de proteínas de pasos específicos en las rutas bioquímicas involucradas en este proceso (Cheng y Breen, 1991; Moyano *et al.*, 1998). Este tipo de información ha sido de gran utilidad para modificar la tecnología de manejo de frutos, con la finalidad de controlar y prolongar la vida de anaquel a través de la alteración de la concentración de proteínas relacionadas con procesos como el ablandamiento de frutos, la regulación de la tasa respiratoria o la acumulación de pigmentos (Mehta *et al.*, 2002; Neily *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011), y su interacción con factores adicionales como su susceptibilidad al ataque por fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (Cantu *et al.*, 2008), favoreciendo consecuentemente las condiciones de mercado. Con el desarrollo de la proteómica se desplegaron los límites del estudio y comprensión de la fisiología de la maduración de frutos, enriqueciendo la descripción y comparación global de patrones de expresión génica cuantitativa y funcional, permitiendo analizar y clasificar la dinámica de

expresión de todas las proteínas en frutos de etapas específicas durante el proceso de maduración (Cánovas *et al.*, 2004).

Debido a la diversidad en los tipos de proteínas, ningún método para la preparación de muestras puede ser aplicado en forma general. Cada procedimiento de separación en electroforesis dimensional y bidimensional, basados en su peso molecular (PM) y su punto isoeléctrico (pI), es selecto y específico para cada diversidad química de proteínas. El método universal para el análisis proteico de plantas es fragmentar la investigación en dos categorías esenciales: la primera implica el perfil de proteínas con el objetivo de separar, secuenciar y catalogar todas las proteínas posibles de un proteoma particular, la segunda se denomina proteómica comparativa, que tiene el objetivo de caracterizar diferencias entre poblaciones de proteínas, en este análisis se utiliza la separación por medio de geles SDS-PAGE, que separa a las proteínas por su peso molecular, después se utiliza la separación en 2-DE (Cánovas *et al.*, 2004).

El proceso de maduración en frutos no-climatéricos es menos estudiado que el de frutos climatéricos. De las frutillas, la fresa (*Fragaria* spp.) y la uva (*Vitis* spp.) son quizás las mejor estudiadas en estos términos (Moyano *et al.*, 1998; Bianco *et al.*, 2009; Robinson y Davies, 2000; Ramaschandra *et al.*, 2011); por su parte, los estudios sobre la maduración del género *Rubus* se limitan sobre todo a la frambuesa (*Rubus idaeus*; Jones *et al.*, 2000). En el presente trabajo se muestran las condiciones ensayadas para establecer parámetros de un primer acercamiento al análisis del proteoma de la maduración de frutos de zarzamora, bajo las condiciones de cultivo en Michoacán, como una herramienta para conocer y eventualmente manipular las condiciones de manejo de su cultivo y postcosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio. El material vegetal se colectó del huerto comercial “Vara Azul”, ubicado en la localidad de Caracha, dentro de las coordenadas 19° 43’77” LN y 101° 92’ 49” LO perteneciente al municipio de Ziracuaretiro, Michoacán.

Material vegetal. Los frutos utilizados en el presente trabajo fueron de la variedad comercial ‘Brazos’. Se colectaron muestras de 10 frutos de cada estadio de maduración y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

Extracción de proteínas. Se evaluaron dos condiciones de extracción, en la primera el tejido se pulverizó en frío y se agregó solución amortiguadora de extracción (tris 50 mM, pH6.8, DTT 100 mM, SDS 2 %, glicerol 10 % y PMSF 5 mM) en relación 3:1 (v:p). En la segunda condición se adicionó polivinilpirrolidona (PVP) 2 % a la solución amortiguadora de extracción. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, se precipitaron 500 µl de sobrenadante con 1 vol de acetona fría, incubando a -20 °C durante 2 h. Se centrifugó durante 30 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 600 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -70 °C hasta su utilización. La cuantificación de las proteínas totales se hizo por el método de Bradford (1976), utilizando un espectrofotómetro DU 640 (Beckman).

Electroforesis desnaturalizante y electroforesis bidimensional. La electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) se hizo de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970), con acrilamida al 12 % y marcador de peso molecular de 220 kDa de BenchMark (Life Technologies, Biorad, USA), la tinción con azul de Coomassie (R-250). Para la electroforesis bidimensional, el isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 7 cm (Biorad), ensayando dos protocolos de limpieza del extracto proteico, el primero con el kit 2-D Clean-Up (Amersham Biosciences, Nueva York, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y el otro consistió en precipitar con un volumen de acetona a -20 °C durante 2 h, centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y secar la pastilla (Görg,

et al., 2004). Las pastillas obtenidas de ambos protocolos de limpieza se resuspendieron en 125 μ l de amortiguador de rehidratación (urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4 %, anfolitos 0.5 %, TBP 40 mM, Azul de bromofenol 0.002 %) y 1.5 μ l de reactivo de Destreak (Amersham Biosciences, Suecia), se incubaron en agitación durante 2 h y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min, recuperando el sobrenadante. La separación por IEF se llevó a cabo con el equipo PROTEAN IEF Cell (Biorad, USA), para lo cual las tiras se colocaron en contacto con la muestra y se adicionaron 2 ml de aceite mineral, se utilizó el método Running Preset (Bio-Rad, USA) con una rehidratación activa a 50 V por 12 h, seguido de acondicionamiento a 250 V por 15 min, posteriormente se incrementó de manera lineal hasta un máximo de 4000 V, y se mantuvo hasta un voltaje total de 50 000 V, a temperatura constante de 20 °C.

Previo a la electroforesis de segunda dimensión, se equilibraron las tiras de IPG con 2 ml de solución amortiguadora I (urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 20 %, DTT 2 %) en agitación durante 15 min, posteriormente con 2 ml de amortiguador de equilibrio II (urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 20 %, iodoacetamida 2.5 %) durante 5 min. Se evaluaron las condiciones de enfoque de proteínas más homogéneo a distintos voltajes (35 000, 40 000 y 50 000 V), se llevó a cabo la SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie R-250 de acuerdo a Laemmli, 1970; o con plata, según el protocolo de Gambetti *et al.*, 1981. Los geles teñidos se digitalizaron en un densitómetro GS-800 (Biorad, Francia).

Análisis de puntos peptídicos. Las imágenes de los geles 2-DE se analizaron con el programa Kodak Molecular Imaging versión 4.5 (Kodak). Para estimar el punto isoeléctrico (pI) de las fracciones proteicas, la imagen de cada gel 2-DE fue dividida en los siete intervalos de pH correspondientes a los de las tiras de IEF, el peso molecular (PM) se estimó por referencia al marcador de 220 kDa de BenchMark (Life Technologies). Se editaron las imágenes de cada gel, analizando cada mancha para eliminar los falsos positivos. Se seleccionó una fracción proteica de pI, PM y densidad similares en los seis geles correspondientes a los seis estadios de maduración, considerándola de expresión constitutiva y se le otorgó arbitrariamente un valor mínimo de masa de 1.0 y se le otorgó el número de identificación N000, para utilizarlo como referencia en la estimación de densidad e intensidad de expresión del resto de las manchas de fracciones proteicas en los geles de cada estadio. De esta manera fueron caracterizados todos los puntos de cada gel de acuerdo a su pI, PM y masa, y estos datos se utilizaron para definir el comportamiento de los puntos proteicos durante la maduración de frutos de zarzamora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estadios de maduración identificados en los frutos de zarzamora ‘Brazos’. Se lograron identificar seis estadios de maduración de los frutos de zarzamora ‘Brazos’ con características morfológicamente definidas y contrastantes (Figura 1). En el estadio 1 (E1) los frutos son verdes y sus drupelas se encuentran en las primeras etapas de llenado, su talla corresponde al 40 % del crecimiento final, el crecimiento final se alcanza hasta el estadio 4 (E4), en el que la coloración de los frutos ya es roja en el 90 % de las drupelas. Sin embargo la coloración de las drupelas cambia gradualmente de verde a rojo y finalmente negro durante los seis estadios. Se estableció como estadio 6 (E6) aquel en el que se alcanzó un color negro brillante en el 100 % de las drupelas, característico del punto de madurez de cosecha.


Estadio	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Imagen del fruto						
Color drupelas % crecimiento	100% verdes 40% crec.	80% verdes 70% crec.	60% rojas 90% crec.	90% rojas 100% crec.	100% rojas 100% crec.	100% negras 100% crec.

Figura 1. Estadios de maduración determinados por el color de las drupelas y tamaño del fruto. El porcentaje de color hace referencia al porcentaje mayoritario de drupelas con un mismo color, el porcentaje de crecimiento es respecto al tamaño final del fruto.

Al establecer una escala morfológica de maduración de frutos no climatéricos es importante considerar como uno de los parámetros a la madurez de consumo, aunque la selección de los estadios puede ser variada, se recomienda tomar en cuenta puntos contrastantes de desarrollo del fruto (Manrique, 2001). En frutos de nopal (tuna), algunos autores han considerado tres estadios de maduración, a saber: verde, semimaduro y maduro (Rosas, 2008).

Para el estudio de maduración de frutos de zarzamora se han utilizado diferentes escalas, en una de ellas se consideran cinco estadios de maduración con las características de: M1: menos maduros 50%, M2: cambiantes 60 %, M3: rojos 90 %, M4: negros 90 % y M5: negros 98 % y se reportan las propiedades biomecánicas de estos frutos (Chávez-Franco *et al.*, 2000), sin embargo, las especificaciones de los estados de madurez no corresponden a lo observado en el caso de la maduración de los frutos en el presente trabajo, entre los frutos M1 y los M2 existen diferencias entre tamaños y coloraciones que no se establecen en esta escala, las diferencias entre la categoría de frutos M4 y M5 no se distinguen claramente, finalmente la etapa de maduración más avanzada es descrita como una etapa con drupelas negras en 98 % de la superficie del fruto, pero no consideran un fruto completamente negro.

Por lo que en el presente trabajo se consideró más adecuado establecer mayor número de estadios intermediarios en las primeras etapas de desarrollo del fruto, ubicar estadios de maduración más contrastantes y describir el punto de madurez de cosecha como el estadio de maduración más avanzada.

En otras escalas se han descrito hasta ocho estadios de maduración de zarzamora, basándose en cambios de coloración de las drupelas de los frutos (Esquivel *et al.*, 2008), sin embargo, en esta escala no se describe claramente el estado de crecimiento respecto al crecimiento final del fruto y el número de variaciones en los estados de maduración puede generar confusión, por no ser claramente contrastantes.

Por su parte, en otros estudios de maduración en diversos cultivares de *Rubus* spp. ('Navaho', 'Choctaw', 'Cheyenne' y 'Shawnee') se han establecido estadios de maduración con parámetros más contrastantes (verde, verde-rojo, rojo-verde, moteado, negro brillante y negro mate; Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Perkins-Veazie *et al.*, 2000) por lo que en este trabajo se procuró considerar este tipo de descripciones como análogas a las utilizadas para el caso de zarzamora var. Brazos.

La extracción de proteínas de zarzamora no requiere la adición de PVP. La PVP se utiliza ampliamente para disminuir el contenido de compuestos fenólicos que pueden disminuir la concentración o integridad de las proteínas en un extracto. En este caso, la adición de PVP al amortiguador de extracción promovió la generación de precipitados que formaron pastillas

grandes y viscosas, difíciles de resuspender y manejar. Por su parte, las pastillas generadas con el amortiguador sin PVP mantuvieron un alto nivel de pigmentación, pero fueron más compactas y menos viscosas. Ambos tipos de pastilla fueron resuspendidas en 100 μ l de amortiguador de extracción y se utilizaron alícuotas de 10 μ l para la SDS-PAGE. La resolución de las proteínas generó bandas bien definidas y consistentes en el protocolo sin PVP, mientras que los extractos con PVP mostraron una menor concentración de polipéptidos (Figura 2). Estos resultados sugieren que si bien la PVP puede disminuir la oxidación por compuestos fenólicos, en el caso de extractos de frutos de zarzamora, su presencia promueve la formación o retención de polímeros que dificultan su manejo, disminuyendo la eficiencia de extracción de proteínas totales, por lo que se eliminó el uso de PVP en el protocolo de extracción.

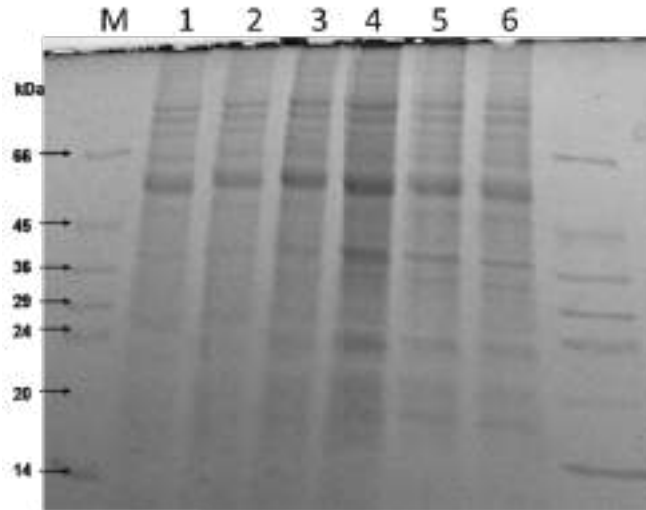


Figura 2. Evaluación de dos condiciones de extracción de proteínas totales de frutos maduros de zarzamora. Extractos de proteínas de frutos en estadio E6 se obtuvieron por el protocolo con uso de PVP (carriles 1 a 3) y sin PVP (carriles 4 a 6). 10 μ l de cada extracto se separaron por SDS-PAGE al 10 %. M, Marcador de peso molecular

Patrón de polipéptidos en SDS-PAGE de frutos durante la maduración. Las proteínas totales de cada uno de los seis estadios de maduración fueron separadas por SDS-PAGE (Figura 3). En el patrón de polipéptidos de frutos de zarzamora se observa una abundancia primordial de fracciones de concentración constante durante los distintos estadios de maduración, que sugieren una expresión constitutiva de los mismos. Sin embargo también hay polipéptidos cuya abundancia se incrementa o disminuye durante la maduración, sobre todo en un intervalo de 14 a 24 kDa, lo cual sugiere una regulación diferencial en la expresión de las mismas.

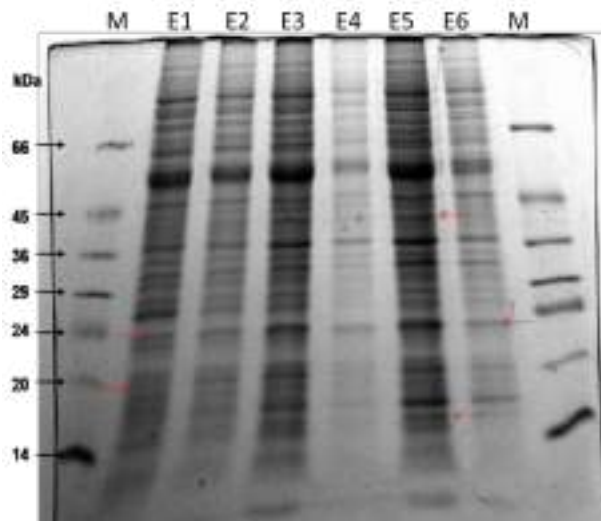


Figura 3. Patrón de proteínas totales de frutos de zarzamora durante distintos estadios de maduración. 20 μg de proteínas totales de cada estadio se separaron en un gel SDS-PAGE al 12 %. E1 a E6; estadios de maduración 1 a 6. M, Marcador de peso molecular. Las flechas rojas muestran fracciones de expresión diferencial en los distintos estadios.

Condiciones para separar las proteínas de frutos de zarzamora en 2-DE. Para el IEF se requiere una calidad de extracto proteico que permita la resolución adecuada, para lo cual se evaluaron dos protocolos de limpieza. Una alícuota de 80 μg de proteína total se procesaron con el kit 2-D Clean-Up Amersham Biosciences, de acuerdo a las indicaciones del fabricante; asimismo, una alícuota de la misma concentración se precipitó con acetona al 40 %. A ambas alícuotas se les agregó amortiguador de rehidratación y se llevó a cabo el IEF a 35 000 V durante 24 h y posteriormente la SDS-PAGE. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa en los geles, respecto a la limpieza de las muestras (Figura 4).

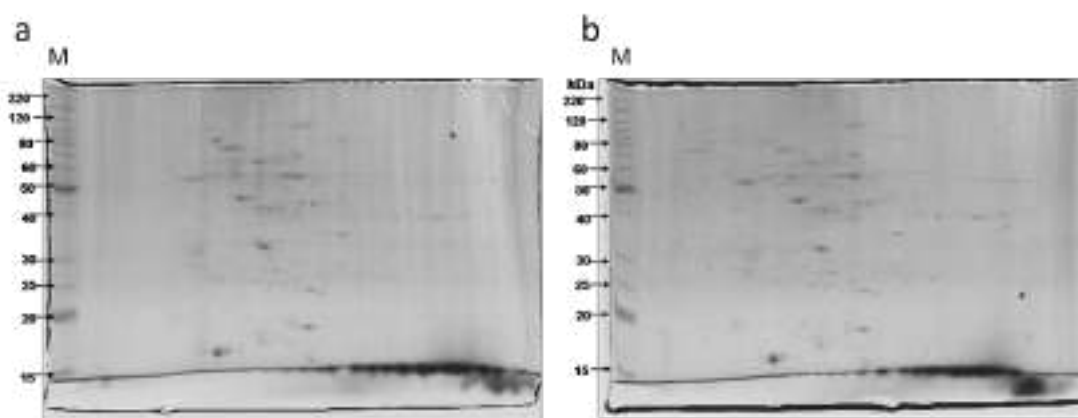


Figura 4. Evaluación de condiciones de limpieza de extractos de proteínas de zarzamora para su análisis por 2-DE. 80 μg de proteínas totales del extracto E6 se procesaron para su limpieza con el Kit 2-D Clean-Up de AmershamBiosciences (a), o con acetona (b). El IEF fue en tiras de IPG de 7 cm, pH 3 a 10, a 35 000 V durante 24 h, el SDS-PAGE al 12 %, teñidos con azul de Coomassie. M, marcador de peso molecular.

Adicionalmente se evaluaron tres concentraciones de proteína total separada por IEF a dos condiciones de voltaje, a saber: 1) 100 μg de proteína total a 40 000 V; 2) 100 μg de proteína total a 50 000 V; 3) 200 μg de proteína total a 40 000 V, 4) 200 μg de proteína total a 50 000 V y 400 μg de proteína total a 50 000V. Los resultados mostraron un enfoque adecuado a 50 000 V (Figura 5), sin embargo las manchas proteicas resueltas en los geles 2-DE todavía se observaron tenues, que podrían sugerir deficiencias en la tinción utilizada. También se valoró el uso de dos protocolos de tinción, con azul de Coomassie y con plata. En los geles teñidos con plata se observó una sobresaturación generando falsos positivos (Figura 5e). Los resultados mostraron una mejor resolución y mayor definición de puntos al utilizar 400 μg de proteína total del extracto E6, con un enfoque a 50 000 V y tinción con azul Coomassie (Figura 5f), por lo que estas condiciones fueron utilizadas para comparar los extractos de los seis estadios de maduración.

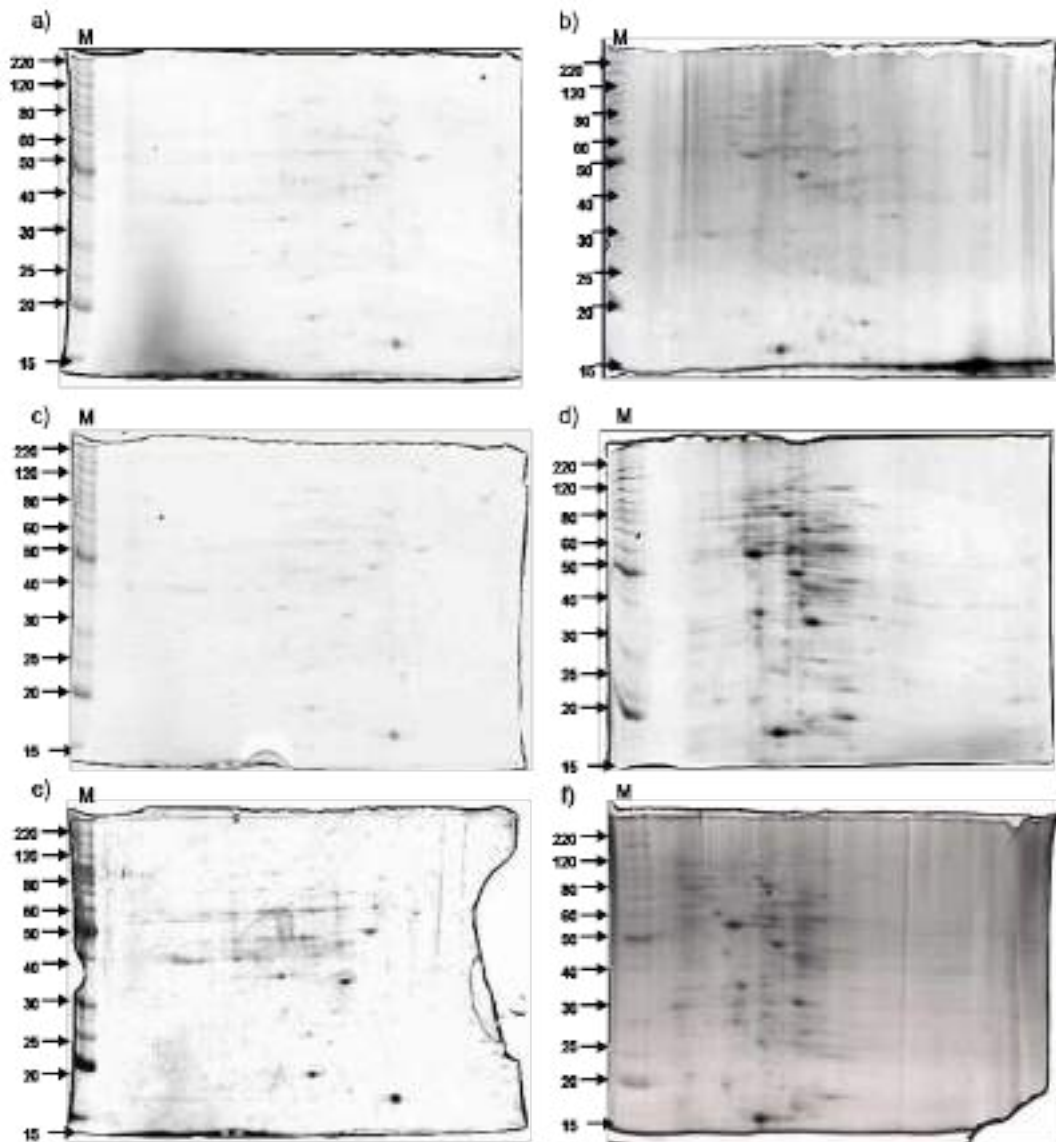


Figura 5. Evaluación de condiciones de isoelectroenfoco y concentración de extractos de proteínas de zarzamora para el desarrollo de la 2-DE. El IEF se llevó a cabo en tiras de IPG de 7 cm, pH 3 a 10. La concentración de proteínas totales del extracto E6 fue de 100 µg (a, c y e), 200 µg (b y d) y 400 µg (f), el enfoque se desarrolló a 40 000 V (a, b y e) y 50 000 V (c, d y f). La tinción se hizo con azul de Coomassie R-250 (a, b, c, d y f) y con plata (e). M, marcador de peso molecular

Análisis preliminar de manchas peptídicas durante el proceso de maduración. Las proteínas totales de cada estadio de maduración (E1 a E6) fueron separadas por electroforesis 2-DE, utilizando las condiciones estandarizadas. Las imágenes obtenidas de cada estadio de maduración fueron editadas manualmente adicionando manchas peptídicas y/o eliminando falsos positivos seleccionados por el programa, que detecta por medio de una escala de grises (Figura 6). Cabe señalar que los puntos eliminados y adicionados correspondieron a un porcentaje menor al 10 % del total de los puntos inicialmente detectados por el programa.

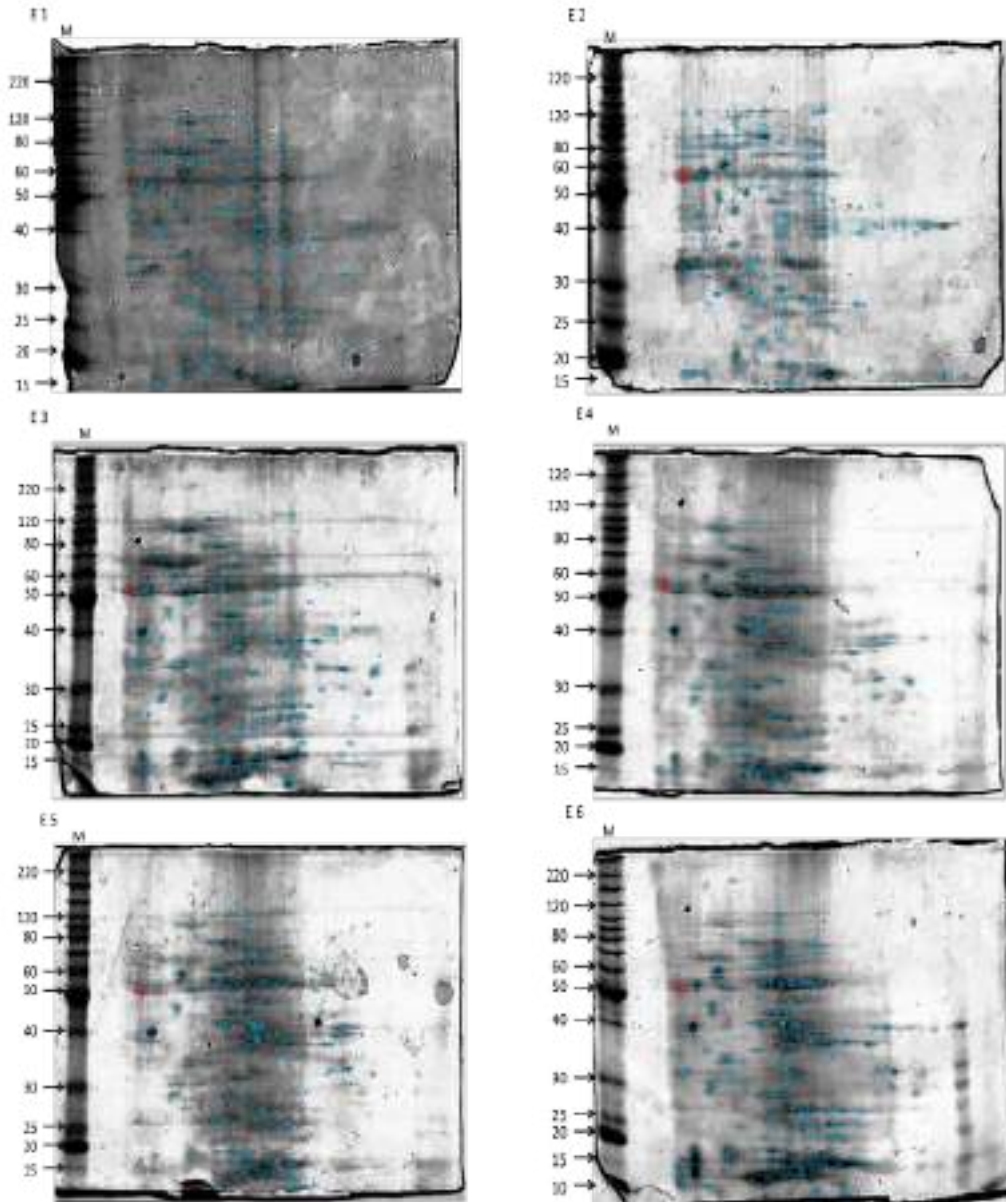


Figura 6. Electroforesis 2-DE de las proteínas de frutos de zaramora durante seis estadios de maduración. 400 μ g de proteínas totales de cada estadio de maduración fueron separadas por IEF en tiras de IPG de 7 cm, pH 3.0 a 10.0 a 50 000 V durante 24 h y posteriormente en SDS-PAGE al 12 %. Los gels se tiñeron con azul de Coomassie. Las imágenes se editaron con el programa Kodak MI, versión 4.5. El punto señalado en rojo es el seleccionado como referencia de intensidad 1.0, los puntos en azul son los seleccionados por el programa y editados como fracciones peptídicas. M, marcador de peso molecular.

Una vez que se seleccionaron las fracciones proteicas en las imágenes de los seis estadios de maduración, se cuantificó el total de manchas presentes en cada estadio. El mayor número de manchas proteicas se presentó en E2 (158), que corresponde a frutos con 80 % de drupelas verdes y un 70 % del crecimiento total, mientras que E4; de frutos con 90 % de drupelas rojas y 100 % del crecimiento, mostró 97 puntos, es decir únicamente 61 % del número de puntos encontrados en E2 (Cuadro 1). Sin embargo, el porcentaje de puntos aumentó posteriormente, hasta alcanzar 135 en E6, correspondiente al 85 % del número total de puntos en E2. Estos resultados sugieren una alta expresión de proteínas involucrados en los primeros estadios; además, que un gran número de los péptidos ubicados en E2 podrían corresponder a proteínas involucradas en el crecimiento del fruto y cuya abundancia disminuye al alcanzar un 100 % de

crecimiento, mientras que se comienzan a acumular otros péptidos que podrían corresponder a proteínas relacionadas con cambios independientes al aumento de volumen.

Cuadro 1. Número total de manchas peptídicas en los extractos de cada estadio de maduración.

Estadio	E1	E2	E3	E4	E5	E6
No. de manchas	119	158	140	97	110	135

El análisis de los valores estimados de PM y pI de las manchas peptídicas seleccionadas en cada estadio permitió establecer que, en todos los estadios de desarrollo y maduración, existe un mayor número de péptidos en el intervalo de puntos isoeléctricos de 5.0 a 6.99 y de 30 a 50 kDa (Figura 7). De manera particular, en los estadios E2, E3 y E6 se observa una alta incidencia de manchas peptídicas en estos valores de pI y PM. Los péptidos en E2 están distribuidos en todos los valores de pI y PM, con una abundancia mayor en un pI entre 5.00 a 5.99 y entre 30 a 60 y 80 a 120 kDa, mientras que E6 presenta el mayor número de manchas entre 15 a 20 y 30 a 40 kDa.

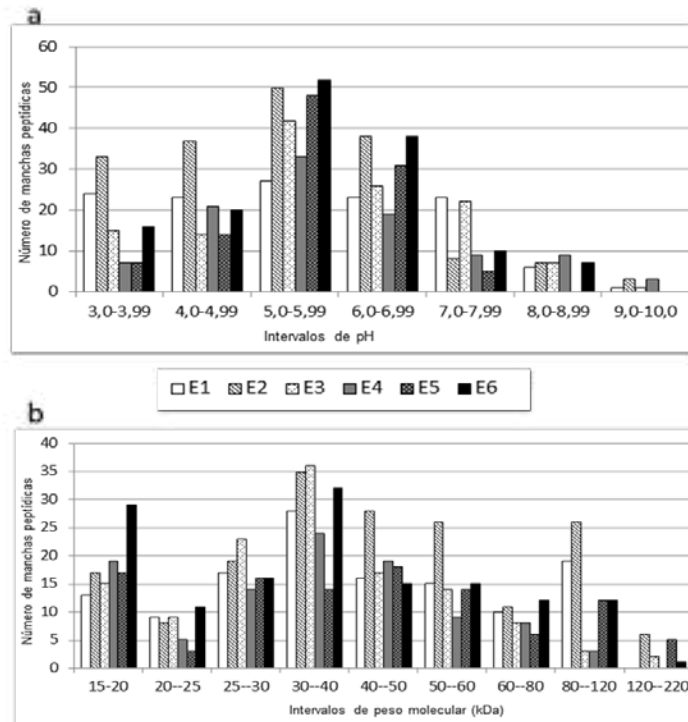


Figura 7. Clasificación de los péptidos de zarzamora durante la maduración por su pI y su PM. Las manchas peptídicas de cada estadio de maduración observadas en los ensayos 2-DE se agruparon de acuerdo a su pI (a) y a su PM (b). E1 a E6 representan los seis estadios de maduración.

Al analizar la distribución de manchas proteicas de pI 5.0 a 6.99, se observó que estos péptidos presentaron una alta incidencia en E2, entre 25 y 60 kDa, mientras que el E6 presentó mayor abundancia en péptidos de 15 a 40 kDa; sin embargo, también hay abundancia en otros estadios en los valores de 20 a 25 y 60 a 80 kDa (Figura 8). Por su parte, al analizar el pI de proteínas más abundantes y con PM de 30 a 50 kDa, se observó que la mayor incidencia de proteínas está entre 5.00 y 6.99 pI, en E2 y E6 se observaron más proteínas (Figura 9).

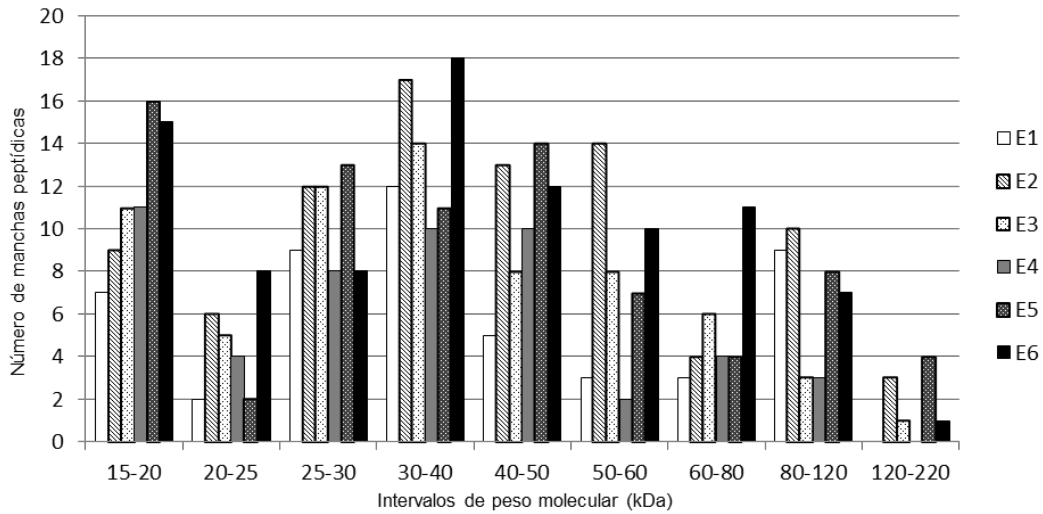


Figura 8. Peso molecular de péptidos de pI 5.0 a 6.9 durante la maduración de zarzamora. Las manchas peptídicas de extractos de zarzamora durante seis estadios de maduración que fueron separadas por los ensayos de 2-DE en un intervalo de pI de 5.0 a 6.9, fueron agrupadas de acuerdo a su peso molecular. E1 a E6 representan los seis estadios de maduración.

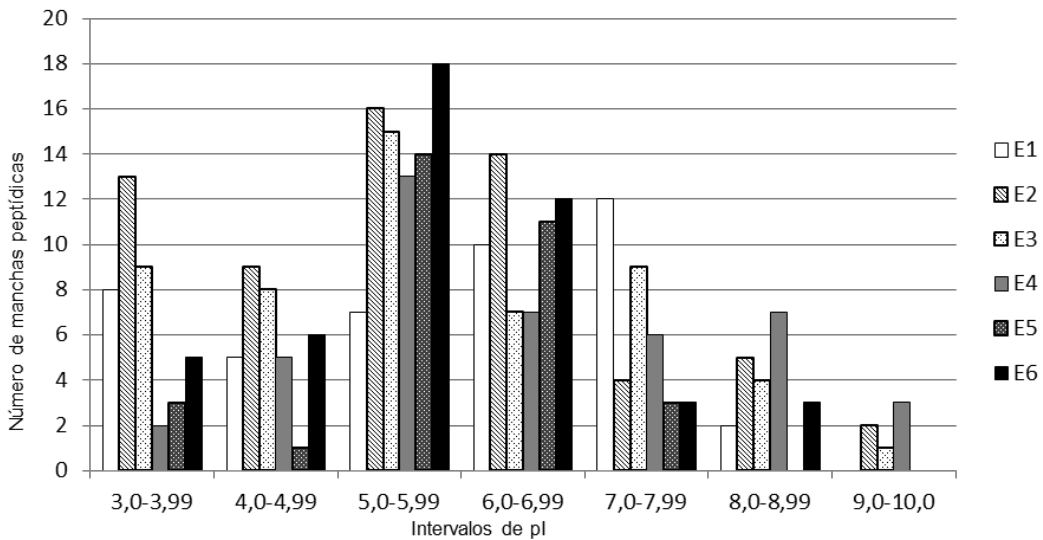


Figura 9. Punto isoelectrico de péptidos de 30 a 50 kDa durante la maduración de zarzamora. Las manchas peptídicas de extractos de zarzamora durante seis estadios de maduración que fueron separadas por los ensayos de 2-DE en un intervalo de 30 a 50 kDa, fueron agrupadas de acuerdo a su pI. E1 a E6 representan los seis estadios de maduración.

La característica fenotípica más sobresaliente del estado E2 de los frutos de zarzamora consiste en un aumento del 30 % en volumen respecto a E1, alcanzando un tamaño similar al de los frutos de estados más avanzados, mientras que el cambio de coloración no varía de manera prominente respecto al E1. Es por ello que los resultados observados sugieren que los péptidos diferenciales y de alta incidencia presentes en E2 y ausentes en E1 (como los observados en un peso molecular entre 25 y 60 kDa) corresponden a proteínas asociadas al crecimiento de los frutos de zarzamora en esta etapa, mientras que los polipéptidos de proteínas asociadas a las características fenotípicas de madurez de cosecha o de consumo observados en el E6 podrían situarse en un peso molecular entre las de PM 20-25 o 60-80 kDa.

En la caracterización preliminar del patrón de expresión de los péptidos observados en las imágenes, se seleccionaron manualmente las manchas con patrones similares de corrida en los seis estadios de maduración, que presumiblemente podrían corresponder a un mismo péptido. Posteriormente se le otorgó un número de identificación a cada péptido y se comparó la intensidad registrada en cada estadio de maduración, de acuerdo a los valores otorgados por el programa KODAK MI versión 4.5.

De esta manera se ubicaron puntos de péptidos presentes en los seis estadios en densidad similar (Figura 10), que sugieren un patrón de expresión constitutiva. Asimismo se ubicaron péptidos que mostraron intensidad disminuida en los últimos estadios respecto a los primeros, que podrían corresponder a proteínas cuya expresión es inhibida durante la maduración de los frutos y péptidos con un patrón de intensidad superior en los últimos estadios respecto a los primeros, que pueden pertenecer a proteínas cuya expresión está asociada a la maduración de los frutos de zarzamora.

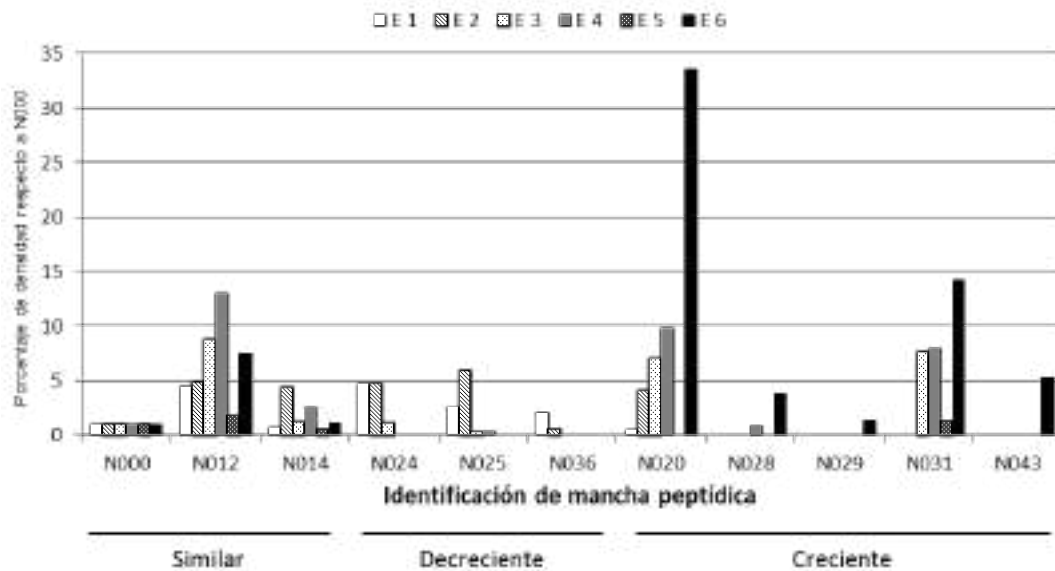


Figura 10. Densidad de péptidos en zarzamora durante la maduración. La densidad de las manchas peptídicas identificadas en los ensayos de 2-DE como comunes respecto a pI y PM fue comparada en los extractos de los seis estadios de maduración (E1 a E6, respectivamente). Se tomó como referencia una mancha común de intensidad similar en todas las imágenes (N000), a la que se le dio un valor de 1.0. En las barras de la base de la gráfica se agrupan los péptidos con densidad similar, decreciente y creciente durante la maduración.

Un gran número de enzimas se encuentran involucradas en el crecimiento y desarrollo de los frutos, por lo que el análisis de presencia de proteínas y su caracterización en cuanto a PM y pI permite estudiar la maduración asociada a caracteres fisiológicos y fenológicos (Faurobert *et al.*, 2007). El tomate es un modelo de estudio de regulación de la expresión génica en el proceso de maduración de frutos climatéricos, en este proceso se han identificado proteínas cuya expresión se incrementa o disminuye durante el proceso de maduración y la función de muchos de ellos se ha relacionado con el aumento en división y expansión celular durante las etapas en las que el fruto crece, o con cambios en textura, color, sabor o acumulación de compuestos aromáticos durante las etapas más avanzadas de la maduración.

Esto ha permitido conocer ampliamente el proceso de maduración en estos frutos, desde el punto de vista metabólico, hormonal y bioquímico de los caracteres que lo conforman (Biggs *et al.*, 1986; Seymour *et al.*, 2008) y algunos procesos podrían extrapolarse a los frutos no climatéricos. Como un primer acercamiento, en el presente trabajo se caracterizó el perfil de péptidos de los frutos de zarzamora durante el proceso de maduración. Se registraron manchas

peptídicas constitutivas, otras cuya presencia se sugiere es inducida durante el proceso y que podrían corresponder a proteínas asociadas a la síntesis de antocianinas, oxidación y/o fermentación descritos para la maduración de otros frutos (Pera; Nilo *et al.*, 2010; Tomate; Faurobert *et al.*, 2007; Uva; Sarry *et al.*, 2004), mientras que otras que se inhiben durante el proceso, en forma similar a lo que sucede con las proteínas involucradas en síntesis de ácidos orgánicos, proteínas o plegamiento de proteínas (Sarry *et al.*, 2004).

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se permitió el establecimiento de protocolos que permitieron lograr resultados preliminares en el estudio de los patrones de expresión de proteínas de frutos de zarzamora durante el proceso de maduración, sin embargo, es necesario obtener réplicas de estos resultados e identificar la naturaleza de los péptidos cuya expresión se sugiere asociada a este proceso.

CONCLUSIONES

La escala morfológica de maduración de frutos de zarzamora generada en el presente trabajo reconoce seis estadios de maduración en la var. Brazos, definidos por el tamaño y pigmentación de los frutos.

Las condiciones establecidas de IEF permiten comparar la expresión de fragmentos peptídicos durante la maduración con base en concentraciones constantes de proteína total en los distintos estadios.

Los patrones polipeptídicos observados por electroforesis desnaturizante y por electroforesis en dos dimensiones, muestran fragmentos que sugieren expresión constitutiva y diferencial durante la maduración de frutos de zarzamora.

LITERATURA CITADA

- Bianco, L., L. López, A. G. Scalone, M. Di Carli, A. Desiderio, E. Benvenuto, G. Perrotta. 2009. **Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes**. *J Proteomics* 72 (4):586-607.
- Biggs, M., R. Harriman, A. Handa. 1986. **Changes in gene expression during tomato fruit ripening**. *Plant Physiol.* 81:395-403.
- Bolmgren, K. y O. Eriksson. 2010. **Seed mass and the evolution of fleshy fruits in angiosperms**. *Oikos* 119:707-718.
- Bradford, M. M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding**. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- Cánovas, F. M., E. Dumas-Gaudot, G. Recorbet, J. Jorrin, H. P. Mock, M. Rossignol. 2004. **Plant Proteome Analysis**. *Proteomics* 4: 285-298
- Cantu, D., A. R. Vicente, L. C. Greve, F. M. Dewey, A. B. Bennett, J. M. Labavitch, A. L. T. Powell. 2008. **The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea***. *Proc Natl Acad Sci* 105:859-864.
- Chávez-Franco, S. H., E. Vázquez-García, C. Saucedo-Veloz. 2000. **Propiedades biomecánicas de frutos de zarzamora**. *Agrociencia* 34:329-335.
- Cheng, G. W. y P. J. Breen. 1991. **Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit**. *J Am Soc Hortic Sci* 116:865-869.
- Esquivel, A. E., G. J. Morales, C. A. L. Ortiz, G. M. V. Rodríguez, V. A. Ronquillo, S. A. C. Sánchez, D. A. R. Rodríguez, M. S. H. Guzmán, L. M. R. Mendoza, L. D. Hernández. 2008. **Análisis de las Propiedades Físicoquímicas de la Zarzamora en las Variedades Brazos, Cherokee y Tupy de la Zona Alta de Michoacán**. Tecnológico de Celaya. Depto. Ingeniería Bioquímica. www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A027.pdf. Consultado el 20 de agosto de 2011.

- Faurobert, M., C. Mihr, N. Bertin, T. Pawlowski, L. Negroni, N. Sommerer, M. Causse 2007. **Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening**. *Plant Physiol.* 143(3):1327-1346.
- Gambetti, P., L. Autilio Gambetti, S. C. Papasozomenos. 1981. **Bodian's silver method stains neurofilament polypeptides**. *Science.* 213 (4515):1521–1522.
- Görg, A., W. Weiss, M. J. Dunn. 2004. **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics**. *Proteomics*; 4: 3665–3685.
- Hummer, E. K. 1996. **Rubus diversity**. *HortScience.* 31(2):182–183.
- Inforural, 2010. **Zarzamora detona progreso**. <http://www.inforural.com.mx>. Michoacán. 26 de enero de 2010. Consultado el 18 de noviembre de 2011.
- Jones, C. S., H. V. Davies, M. A. Taylor. 2000. **Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques**. *Planta* 211:708-714.
- Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227: 680-685.
- Manning, K. 1998. **Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits**. *Planta* 205:622–631.
- Manrique Klinge K. 2001. **Nociones del Manejo de Post-cosecha. Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos. Centro Internacional de la Papa.** 1-9 pp.
- Matas, A. J., N. E. Gapper, M.-Y. Chung, J. J. Giovannoni, J. K. C. Rose. 2009. **Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life**. *Curr Opin Biotechnol* 20:197-203.
- Mehta, R. A., T. Cassol, N. Li, N. Ali, A. K. Handa, A. K. Mattoo. 2002. **Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life**. *Nat Biotechnol* 20:613-618.
- Moyano, E., I. Portero-Robles, N. Medina-Escobar, V. Valpuesta, J. Muñoz-Blanco, J. L. Caballero. 1998. **A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process**. *Plant Physiol.* 117:711-716.
- Muñoz, R. M. y M. R. Juárez. 1995. **El mercado mundial de la frambuesa y zarzamora**. Chapingo, Mex. http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/FRAMBUESA_Y_ZARZA.pdf Consultado el 10 de enero de 2012.
- Neily, M. H., C. Matsukura, S. Bernillon, C. Deborde, A. Moing, Y.-G. Yin, T. Saito, K. Mori, E. Asamizu, D. Rolin, T. Moriguchi, H. Ezura. 2011. **Enhanced polyamine accumulation alters carotenoid metabolism at the transcriptional level in tomato fruit over-expressing spermidine synthase**. *J Plant Physiol.* 168:242-252.
- Nilo, R., C. Saffie, K. Lilley, R. Baeza-Yates, V. Cambiazo, R. Campos-Vargas, M. González, L. A. Meisel, J. Retamales, H. Silva, A. Orellana. 2010. **Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE)**. *BMC Genomics*, 11:43
- Perkins-Veazie, P., J. K. Collins, J. R. Clark. 1996. **Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries**. *HortScience* 31:258–261.
- Perkins-Veazie, P., J. R. Clark, D. J. Huber, E. A. Baldwin. 2000. **Ripening physiology in ‘Navaho’ thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and compositional changes**. *J. Amer Soc Hort Sci* 125:357-363.
- Piña-Dumoulin, G., V. V. C. Saucedo, E. A. Ayala, L. A. Muratalla. 2001. **Atmósferas controladas para combatir daños postcosecha en Zarzamora (*Rubus* sp.)**. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 18: 87-105
- Ramaschandra, G. S., C. Stander, D. Jacobson, B. Ndimba, M. A. Vivier. 2011. **Proteomic analysis of grape berry cell cultures reveals that developmentally regulated ripening related processes can be studied using cultured cells**. *PLoS ONE* 6(2): e14708.doi:10.1371/journal.pone.0014708.
- Robinson, S. P. y C Davies. 2000. **Molecular biology of grape berry ripening**. *Aus J Grape Wine Res* 6:175-188.
- Rosas, C. F. F. 2008. **Proteómica de la maduración de tunas con características contrastantes de maduración**. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Irapuato.
- SAGARPA. 2002. **Estadísticas de bayas. Producción de zarzamora en Michoacán**. Departamento de Hortofrutícolas. México D.F. Consultado el 9 de septiembre de 2011.
- SAGARPA. 2009. **Registra México aumento en producción de Zarzamora y Frambuesa, 020/05**, México, D.F. Consultado el 13 de noviembre de 2011.

- Sarry, J.-E., N. Sommerer, F.-X. Sauvage, A. Bergoin, M. Rossignol, G. Albagnac, C. Romieu. 2004. **Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp**. *Proteomics* 4: 201-215.
- Seymour, G, M. Poole, K. Manning, G. King. 2008. **Genetics and epigenetics of fruit development and ripening**. *Curr Opin Plant Biol.* 11:58-63.
- SIAP. 2011. **Cierre de la producción agrícola por cultivo**. <http://www.siap.gob.mx>. Consultado el 23 de noviembre de 2011
- SNIIM. 2008. **Sistema Nacional de Información de Mercados**. <http://www.economia-sniim.gob.mx/sicia/VerAgr.htm>. Consultado el 22 de febrero de 2012.
- Srivastava, L. 2002. **Plant growth and development**. Academic Press, San Diego, California. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publ. Sunderland, Massachusetts. 772p.
- Sun, L. Y. Sun, M. Zhang, L. Wang, J. Ren, M. Cui, Y. Wang, K. Ji, P. Li, P. Chen, S. Dai, C. Duan, Y. Wu, P. Leng. 2011. **Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid digoxigenase (NCED), which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomatoes**. *Plant Physiol. Preview*. Published on November 22, 2011, as DOI:10.1104/pp.111.186866.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al señor Benjamín Villanueva Esquivel, dueño del huerto comercial “Vara Azul”, por permitirnos utilizar sus materiales. Al Dr. Octavio Paredes López, del CINVESTAV, Unidad Irapuato, por permitirnos utilizar sus instalaciones. Así como al financiamiento de los proyectos PIFI 2007-17-03 y CIC-UMSNH 15.11, 2010.

Dra. Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas

Profesora Investigadora de Tiempo Completo. Laboratorio de Interacciones Planta-Ambiente, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. tztzquichavez@gmail.com

Ing. Cristina Alonso-Ojeda

Egresada del programa de Ingeniero Agrónomo con especialidad en Fruticultura, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Dr. Pedro Antonio García-Saucedo

Profesor de Tiempo Completo, Laboratorio de Bromatología, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.