



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

**DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE AFLATOXINA B₁ QUE AFECTA
LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE MAÍZ (*Zea mays*)**

ANA ISABEL RITA CASTILLO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

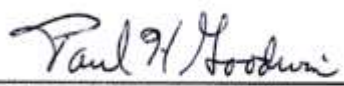
La presente tesis titulada: **Degradación biológica de aflatoxina B₁ que afecta la calidad fisiológica de semillas de maíz (*Zea mays*)**, realizada por **Ana Isabel Rita Castillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA 
DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR 
DR. LÉOBIGILDO CÓRDOVA TÉLLEZ

ASESOR 
DR. PAUL H. GOODWIN

DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE AFLATOXINA B₁ QUE AFECTA LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE MAÍZ (*Zea mays*)

Ana Isabel Rita Castillo, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2016.

RESUMEN

Uno de los factores que determinan la calidad fisiológica de la semilla de maíz, es el porcentaje de germinación, el cual se ve afectado por múltiples factores en campo y condiciones de almacenamiento. Aflatoxina B₁ (AFB₁) es un metabolito secundario producido por *Aspergillus flavus* y tiene efectos negativos sobre la calidad fisiológica de semillas de maíz, avena, trigo y muchas otras especies de cultivos con importancia económica. Muchas estrategias incluyendo el control biológico, se han desarrollado para el manejo de aflatoxinas en cultivos en pre y postcosecha. Con base en lo anterior el presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el objetivo de identificar bacterias asociadas a los cultivos de maíz, que presentaran la capacidad de degradar AFB₁, en semillas contaminadas. Se establecieron tratamientos, para determinar la actividad degradadora de las bacterias provenientes de suelo y bacterias endófitas de semillas de maíz, se cuantificó la concentración de AFB₁ al inicio y final de cada experimento con una duración de 12 días, la cuantificación se realizó mediante la metodología fluorométrica VICAM, con algunas modificaciones, los resultados se analizaron mediante t-test para muestras emparejadas ($p < 0.05$), para determinar cuál bacteria presentaba mayor actividad degradadora. Las mejores bacterias se identificaron mediante la técnica PCR, se seleccionó una bacteria identificada como *Cupriavidus alkaliphilus* para determinar los efectos de AFB₁ y los efectos de la bacteria degradadora en semilla contaminada. Se midieron cuatro variables, germinación, longitud de tallo, longitud de raíz y velocidad de germinación. Los resultados demuestran los efectos negativos de AFB₁ en la calidad fisiológica de la semilla, así como los efectos que tiene la bacteria sobre la calidad fisiológica de semillas contaminadas. Las pruebas y experimentos se realizaron en las instalaciones de CIMMYT Texcoco y el Colegio de Postgraduados.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, *Cupriavidus alkaliphilus*, degradación, inhibición, germinación.

BIOLOGICAL DEGRADATION OF AFLATOXIN B₁ AFFECTING THE PHYSIOLOGICAL QUALITY OF MAIZE (*Zea mays*) SEED

Ana Isabel Rita Castillo, M.S.
Colegio de Postgraduados, 2016.

ABSTRACT

One of the factors that determine the physiological quality of maize seed is the germination percentage, which is affected by many factors in field and storage conditions. Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a secondary metabolite produced by *Aspergillus flavus* and has negative effects on the physiological quality of seed corn, oats, wheat and many other species of economically important crops. Many strategies including biological control have been developed for the management of aflatoxin in pre and post-harvest crop. Based on the above, this research was conducted in order to identify bacteria associated with maize, with the ability to degrade AFB₁ in contaminated seeds. Treatments were applied to determine the degrading activity from soil bacteria and endophytic bacteria maize seeds, the concentration of AFB₁ at the beginning and end of each experiment lasting 12 days was quantified, quantification was performed using the methodology fluorometric VICAM, with some modifications, the results were analyzed by t-test for paired samples ($p < 0.05$), to determine which bacteria had higher degrading activity. The best bacteria were identified by the PCR technique, bacteria identified as *Cupriavidus alkaliphilus* was chosen to determine the effects of AFB₁ and degrading the effect of bacteria on contaminated seed. Four variables, germination, stem length, root length and germination rate were measured. The results demonstrate the negative effects of AFB₁ in physiological seed quality as well as the effects of the bacteria on the physiological quality of seeds contaminated. Tests and experiments were conducted at the premises of CIMMYT Texcoco and the Colegio de Postgraduados.

Key words: Aflatoxin B₁, *Cupriavidus alkaliphilus*, degradation, inhibition, germination.

Agradecimientos

Gracias a Dios por ponerme en este camino y principalmente por permitirme encontrarme con todos ustedes, todo lo que soy y lo que tengo en mi vida se lo debo a él, a su poder y amor incondicional, que Dios los bendiga siempre.

Al Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, especialmente al Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Producción de Semillas, por su invaluable apoyo en mi formación profesional.

Al CONACYT, por el financiamiento otorgado y por apoyar la formación y proyectos de muchos investigadores a nivel nacional.

También hago extenso mi agradecimiento al CIMMYT por su valiosa colaboración y apoyo, por permitirme el acceso a todos los recursos necesarios para cumplir con este proyecto de investigación.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por su valioso apoyo y aportación a esta investigación, por la confianza brindada y por ser partícipe de mi formación profesional, por mantener siempre el entusiasmo y optimismo, gracias por contagiarme de todo lo positivo que hay en usted, porque a pesar de tantas travesías en estos dos años, usted me impulsó a continuar, gracias por los consejos, por esos momentos de largas charlas agradables que me hicieron más fuerte.

Al Dr. Leobigildo Córdova Téllez por todas las aportaciones muy valiosas que brindó para la realización de esta investigación y por su gran e invaluable apoyo. Infinitamente gracias por dedicarme su tiempo, esfuerzo y dedicación, por ser parte en la realización de este trabajo de investigación y principalmente por formar parte de este ciclo tan importante en mi vida.

Al Dr. Paul H. Goodwin, por ser parte de mi formación, siempre compartiéndome sus conocimientos y experiencias, por la confianza y paciencia que siempre tuvo para mí y en que todo se realizara de la mejor manera. Su apoyo ha sido fundamental en mi formación.

Al Dr. George Mahuku por brindarme la confianza para colaborar en su equipo de trabajo, por su dedicación y enseñanzas. Gracias por que desde el primer instante usted creyó que esto era posible, por impulsarme a descubrir nuevos caminos, por enseñarme que “lo único constante es el cambio”.

Mi más sincero y especial agradecimiento al Ing. Ciro Sánchez Rodríguez, por ayudarme cuando apenas iniciaba, por ser la primer persona en darme una oportunidad, porque desde ese instante usted me impulso a no rendirme y a creer en mi misma, siempre estaré agradecida con usted, por todo lo que ha hecho por mí, muchas gracias por su amistad sincera y por todas sus enseñanzas.

Gracias a mi querida madre la Sra. Paula Castillo por su infinito y maravilloso amor, por dedicarme su tiempo y su vida, todos los objetivos que me he fijado han sido siempre pensando en ti, eres la mejor mamá del mundo, por que fuiste padre y madre para todos tus hijos, gracias a ti he aprendido las mejores lecciones de la vida, a levantarme una y otra vez, a ser una mujer independiente y dueña de mis propias decisiones, siempre agradeceré a la vida por tenerte conmigo.

Gracias a mis queridos abuelitos Sr. Celerino Castillo (†) y la Sra. Petra Rivera, por asumir el papel de padre y madre, por ser mi motivo más grande para continuar por ser mis mejores consejeros, por preocuparse por mí, por sus oraciones, por sus cuidados, y por amarme tanto, gracias a ustedes es que he podido llegar hasta este momento tan importante en mi vida, gracias a los valores que se me inculcaron en casa es que puedo disfrutar y sonreírle a la vida. En casa siempre se nos enseñó a trabajar, a valorar lo mucho o poco que la vida te da y sobre todo que pase lo que pase siempre contarás con la familia, por eso y más, me siento muy afortunada.

Gracias a Oscar mi esposo a nuestra familia Oscar y Yair, por regalarme parte de su tiempo, por las veces que me ausente de casa, por desvelarse conmigo y por su gran apoyo, por los momentos bonitos que me regalan, por ser mi mejor compañía, ustedes le dieron un cambio total a mi vida, siempre viven en mi mente y en mi corazón, me han enseñado que soy capaz de amar.

Gracias a mis hermanos Rodolfo, Alfredo y Joel, por estar ahí y por todo lo que compartimos juntos desde niños por ser partícipes en cada etapa de mi vida, por alentarme a continuar, por ser uno de mis pilares más fuertes. Mi vida no sería la misma sin ustedes, los amo.

Gracias a mi tía Alicia, por cuidar de mí y mis hermanos, por preocuparse y estar pendiente de nosotros siempre que la hemos necesitado.

Gracias a toda mi familia a mis tíos, Camilo, Guillermo, Inés, Leo, Teodora y Manolo, por sus palabras alentadoras llenas de amor, cariño y confianza en que todo saldría bien, por sus oraciones, mil gracias por todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

Gracias a mis amigos María Elena Lemus por abrirme las puertas de su casa, por hacerme sentir en familia y darme su amistad sincera.

Gracias a Juanita Valencia que me ha apoyado en cada etapa de la investigación.

A mis amigas Ana Jazmín y Verónica Garrido por su amistad incondicional, por todos los momentos agradables que compartimos, por esas charlas de ciencia, por su confianza, su linda amistad y su buena vibra, a ustedes muchas gracias por su cariño.

Agradezco especialmente a la Señora Martha por apoyarme en cada etapa durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Gracias al Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas, por su gran apoyo para concluir este proyecto de investigación.

Dedicatoria

A mi querida madre Sra. Paula Castillo Rivera

A mis queridos abuelos Sr. Celerino Castillo (†) y Sra. Petra Rivera

A mi esposo Oscar y nuestra pequeña gran familia Oscar y Yair

A mis hermanos Rodolfo, Alfredo y Joel

A mis sobrinos Daniela, Anita, Ahrumi, Paula, Mateo y Sofía

Son la prueba más grande del amor de Dios y mi más grande tesoro. Los amo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	viii
ÍNDICE GENERAL	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
HIPÓTESIS	15
LITERATURA CITADA	16
CAPÍTULO I. DEGRADACIÓN DE AFLATOXINA B₁ POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELO Y ENDÓFITAS DE SEMILLAS DE MAÍZ	
1.1 INTRODUCCIÓN	19
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	23
1.2.1 Colecta de muestras de suelo y descripción de genotipos de maíz para aislamiento de bacterias endófitas	23
1.2.2 Aislamiento de bacterias de suelo	23
1.2.3 Aislamiento de bacterias endófitas de semillas de maíz	24

1.2.4	Degradación biológica de AFB ₁ por bacterias aisladas de suelo y de semillas de maíz	25
1.2.5	Análisis de datos	26
1.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1.3.1	Aislamientos de bacterias de suelo	27
1.3.2	Aislamiento de bacterias endófitas de semillas de maíz	28
1.3.3	Degradación biológica de AFB ₁ por bacterias aisladas de suelo y de semillas de maíz	30
1.4	LITERATURA CITADA	34
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR AFLATOXINA B₁		
2.1	INTRODUCCIÓN	36
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.2.1	Material biológico	37
2.2.2	Extracción de DNA	37
2.2.3	Amplificación por PCR del 16S rDNA	38
2.2.4	Análisis filogenético mediante el 16S rDNA	39
2.2.5	Análisis estadístico de frecuencias de géneros de bacterias	40
2.3	RESULTADOS Y DISCUSION	40
2.4	LITERATURA CITADA	43
CAPÍTULO III. EFECTOS DE AFLATOXINA B₁ Y <i>Cupriavidus alkaliphilus</i> EN LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE MAÍZ		
3.1	INTRODUCCIÓN	45
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.2.1	Material biológico	47
3.2.2	Preparación de AFB ₁	48

3.2.3	Tratamientos para evaluar el efecto de AFB ₁ y <i>Cupriavidus alkaliphilus</i> . en la calidad fisiológica de semillas de maíz	49
3.2.4	Prueba de germinación	50
3.2.5	Longitud de plúmula y raíz	50
3.2.6	Índice de velocidad de germinación	50
3.2.7	Análisis de datos	51
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.3.1	Prueba de germinación	51
3.3.2	Longitud de plúmula y raíz	53
3.3.3	Índice de velocidad de germinación	55
3.4	LITERATURA CITADA	57
	CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES	59

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Genotipos de maíz del CIMMYT utilizados para la extracción de bacterias endófitas y utilizados en las pruebas de calidad fisiológica de la semilla.	24
Cuadro 2. Descripción morfológica de bacterias aisladas de suelo	27
Cuadro 3. Descripción morfológica de bacterias aisladas de semillas de maíz	29
Cuadro 4. Degradación de AFB ₁ por bacterias aisladas de suelo en medio de cultivo PDB	31
Cuadro 5. Degradación de AFB ₁ por bacterias aisladas de semillas de maíz en medio de cultivo caldo de Papa Dextrosa (PDB).	32
Cuadro 6. Bacterias aisladas de suelo que presentaron alto porcentaje de degradación de AFB ₁	33
Cuadro 7. Bacterias aisladas de semilla de maíz que presentaron alto porcentaje de degradación de AFB ₁	33
Cuadro 8. Identificación de los aislamientos obtenidos de suelo y semilla de maíz.	42
Cuadro 9. Genotipos de maíz del CIMMYT utilizados en las pruebas de calidad fisiológica.	48
Cuadro 10. Efecto de AFB ₁ y <i>Cupriavidus alkaliphilus</i> , en el porcentaje de germinación.	53
Cuadro 11. Efecto de AFB ₁ y <i>Cupriavidus alkaliphilus</i> , en la longitud de la parte aérea.	54
Cuadro 12. Efecto de AFB ₁ y <i>Cupriavidus alkaliphilus.</i> , en la longitud de raíz.	55
Cuadro 13. Efecto de AFB ₁ y <i>Cupriavidus alkaliphilus</i> , en el índice de velocidad de emergencia.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Maíces criollos. Maíces blancos, azules, amarillos y algunos de los usos tradicionales.	2
Figura 2. Espigas femeninas de teocintle.	2
Figura 3. Colonias de hongos causantes de pudrición de mazorca.	4
Figura 4. Pudrición de mazorca causada por <i>Aspergillus flavus</i> en campo.	5
Figura 5. Esclerocios formados por <i>Aspergillus flavus</i> en medio de cultivo.	5
Figura 6. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.	7
Figura 7. Estructura molecular de cuatro diferentes tipos de aflatoxinas.	8
Figura 8. Formación de aductos de la Aflatoxina B ₁ – DNA.	9
Figura 9. Efectos de AFB ₁ en células de la raíz de <i>Lepidium sativum</i> .	10
Figura 10. Hongos con capacidad de degradar AFB ₁ .	21
Figura 11. <i>Armillariella tabescens</i> , un basidiomiceto con capacidad de degradar AFB ₁ .	21
Figura 12. Basidiomiceto y bacteria productores de enzimas degradadoras de AFB ₁ .	22
Figura 13. Amplificación del 16S rDNA correspondiente a bacterias aisladas de suelo y semilla de maíz durante el ciclo primavera-verano 2014.	40
Figura 14. Análisis filogenético de los géneros bacterianos identificados en muestras de suelo y semilla de maíz.	41
Figura 15. Estructura química de Aflatoxina B ₁ y Cumarina.	46

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea Mays*) junto con el arroz y el trigo son los cereales más importantes a nivel mundial. Actualmente el maíz se cultiva en los cinco continentes, de acuerdo a las estadísticas, Estados Unidos es el principal productor, seguido por la República de China y Brasil, México ocupa el séptimo lugar en producción con 22, 663,953 t (FAOSTAT, 2013). En México el estado con mayor producción de maíz es Nayarit seguido por los estados de Jalisco, Colima, Sinaloa y Guerrero, con una producción anual total de 44,332.94 t (SIAP, 2013). El maíz es el cultivo más importante en México, en un amplio rango de altitud y variación climática, desde el nivel del mar hasta los 3,400 m. El maíz como cultivo es un sistema dinámico y continuo. Su polinización es libre y hay movimiento o flujo de semilla por los agricultores año con año. México es el centro de origen del maíz, aquí se concentra muy probablemente, la mayor diversidad de maíz del mundo y aquí han evolucionado y viven sus parientes silvestres, los teocintles y otro conjunto de gramíneas relacionadas, como las especies de género *Tripsacum*. En México existen 64 razas de maíz diferentes que se distribuyen a lo largo del territorio nacional y cientos de formas para preparar platillos típicos de cada región (CONABIO, 2011).

El maíz fue domesticado en México y Guatemala por los antiguos habitantes de Mesoamérica, a partir de los “teocintles”, gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica (Kato, 1984).

El maíz blanco es utilizado principalmente para la elaboración de platillos tradicionales, como son tortillas y tamales, además de su presencia diaria en la mesa de las familias mexicanas, también pueden obtenerse aceites e insumos para la fabricación de barnices,

pinturas, cauchos artificiales y jabones. El maíz amarillo también se utiliza para consumo humano en una amplia variedad de platillos; sin embargo su principal destino es la alimentación de ganado y la producción de almidones (SIAP, 2013).



Figura 1. Maíces criollos. Maíces blancos, azules, amarillos y algunos de los usos tradicionales (CONABIO, 2011).



Figura 2. Espigas femeninas de teocintle con frutos (CONABIO, 2011).

Enfermedades del maíz

Los cultivos de maíz se distribuyen por todo el mundo, en las diferentes zonas agroecológicas. El maíz en los ambientes tropicales es afectado por un gran número de patógenos que causan importantes daños económicos a su producción. La monografía de Wellman (1972) *Tropical American Plant Diseases*, informa sobre 130 enfermedades que afectan al maíz en los trópicos, comparadas con 85 que ocurren en los ambientes templados. Algunas enfermedades son universales y ocurren en casi todos los ambientes en donde se cultiva este cereal; estas incluyen los tizones, las royas y las manchas de las hojas y del tallo y la pudrición de mazorca ocasionadas por hongos.

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominados metabolitos primarios como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de rápido crecimiento (Soriano *et al.*, 2007), de esta forma reducen la viabilidad, cualidades nutricionales y sanitarias de los granos y semillas. Los principales hongos que atacan los cultivos de maíz causando pudrición de mazorca y daños por micotoxinas son: *Fusarium graminearum* que produce Deoxinivalenol (DON), *Fusarium verticillioides* y *Fusarium subglutinans* que producen fumonisinas, *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas, (Fig. 3) estos hongos atacan a los cultivos en campo o almacén (Munkvold *et al.*, 2003).

Aspergillus flavus

A. flavus es un hongo que se encuentra como saprófito en suelo y de amplia distribución en el mundo, (Klich, 2007), es un patógeno oportunista de cultivos agrícolas, especialmente aquellos que contienen aceites como maíz, cacahuate y semillas de algodón. Los hongos del género *Aspergillus* son generalmente hongos de

almacenamiento y por lo común no contaminan los granos antes de la cosecha, sin embargo condiciones de estrés en las plantas y daño producido por insectos pueden dar lugar a la infección a nivel de campo y a la producción de aflatoxinas en los granos aun no cosechados (Díaz, 1996A) (Fig 4).

A. flavus tiene dos tipos morfológicos distintivos, las cepas S que se caracteriza por formar colonias con micelio disperso sobre medio agar y la producción de numerosos esclerocios con un diámetro <400 µm, y las cepas L que producen algunos esclerocios, pero más grandes (Horn and Doner, 1998) (Fig. 5). Se relaciona a las cepas S con la producción de altos niveles de aflatoxinas en maíz (Probst *et al.*, 2007).

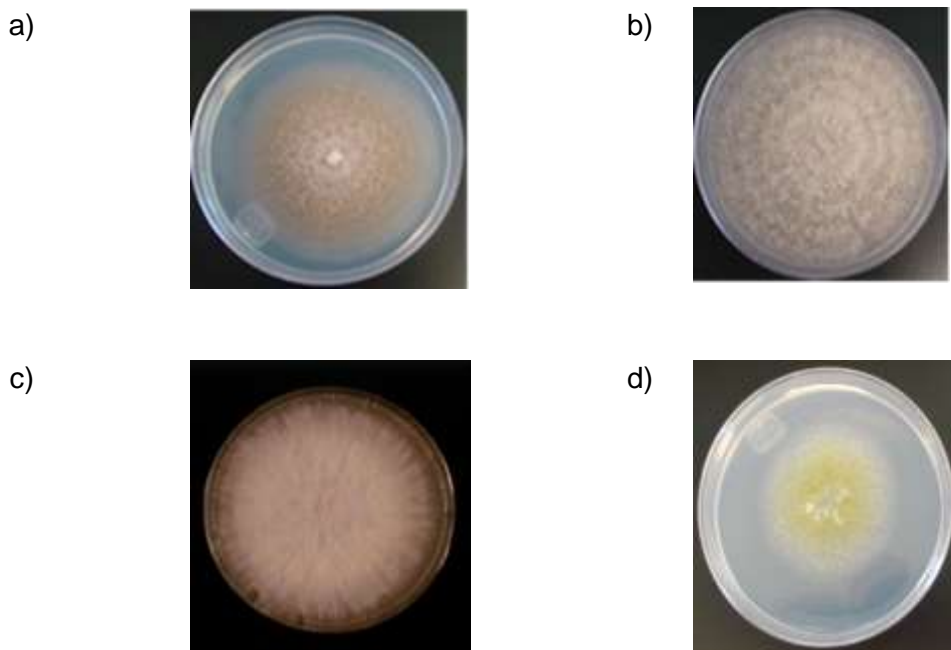


Figura 3. Colonias de hongos causantes de pudrición de mazorca. a) *Fusarium verticillioides* y b) *Fusarium subglutinans* en medio SNA; c) *Fusarium graminearum* y d) *Aspergillus flavus* en medio PDA.



Figura 4. Pudrición de mazorca causada por *Aspergillus flavus* en campo. (CIMMYT, 2010)

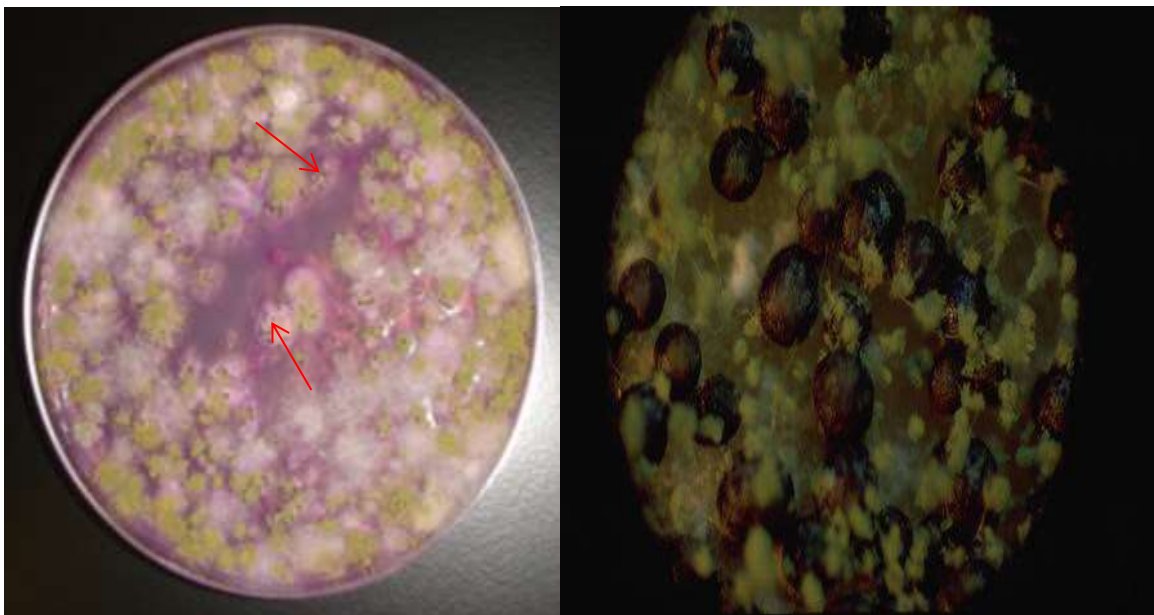


Figura 5. Esclerocios formados por *Aspergillus flavus* en medio de cultivo Rosa de Bengala-Dicloran.

Factores que afectan la producción de micotoxinas

El proceso de daños por micotoxinas puede ser dividido en dos fases, con la infección de los cultivos por hongos productores de micotoxinas en la primera fase y el incremento en la concentración de micotoxinas después de la madurez en la segunda fase (Cotty, 2001). En la primera fase la contaminación puede ser ocasionada por vectores o estrés por sequía (Cotty *et al.*, 1990). La segunda fase de contaminación puede ocurrir cuando el cultivo maduro se expone a condiciones cálidas y húmedas, ya sea en el campo o durante el transporte y almacenamiento (Cotty and Lee, 1991).

La producción de micotoxinas en sustrato natural o en cultivo es influenciada por varios factores los que se pueden ser categorizar en tres temas generales:

- a) Físicos (humedad y agua disponible, temperatura, zonas de microflora, integridad física de las semillas),
- b) Químicos (pH, composición del sustrato, nutrientes minerales, potencial oxidación-reducción nivel de CO₂ y O₂),
- c) Biológicos (presencia de invertebrados y cepas específicas) (Gimeno, 2002).

Es importante hacer notar que la presencia del hongo toxigénico en un sustrato no implica por necesidad la existencia de micotoxinas. Esto se debe a que generalmente solo un pequeño porcentaje de las cepas de hongos posee la capacidad genética de sintetizar micotoxinas y que la producción de estos metabolitos ocurre solo bajo estrictas condiciones ambientales que no siempre se cumplen (Díaz ,1996^b).

Aflatoxinas

Las micotoxinas son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la

diferenciación y la esporulación. Son moléculas relativamente pequeñas ($P_m < 700$) la mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica (Soriano, 2007).

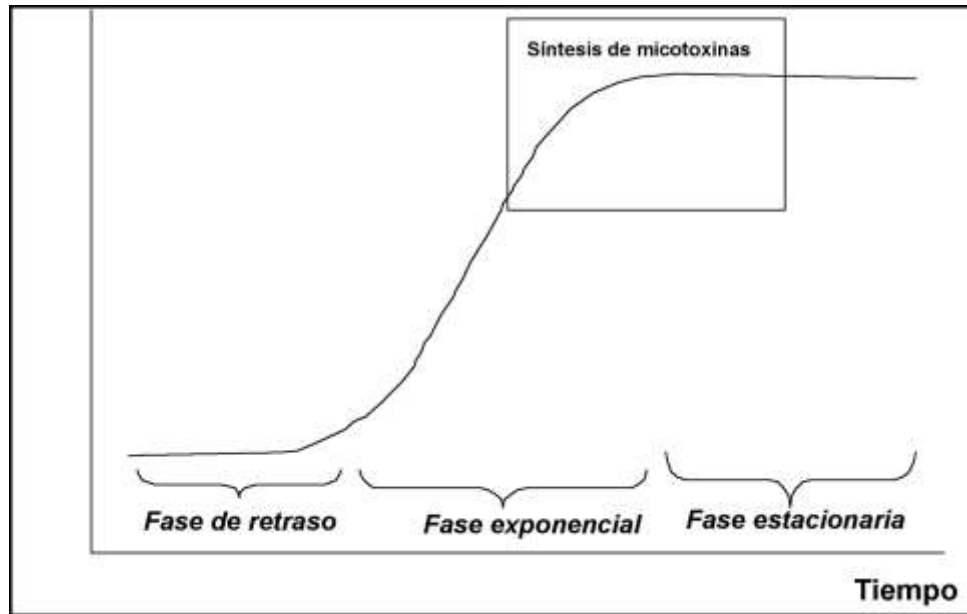


Figura 6. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas (Soriano, 2007)

Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo, dentro de este grupo tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas. En patología de plantas muchos metabolitos secundarios producidos por bacterias y hongos son factores de patogenicidad o virulencia (Yoder, 1980).

Uno de los grupos más importantes de micotoxinas son las aflatoxinas metabolitos secundarios que corresponden químicamente a bis-dihidro-furano-cumarinas (Carvajal, 2013). Actualmente se conocen 20 diferentes tipos de aflatoxinas, principalmente clasificadas en B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 y M_2 con base a su estructura y características

fluorescentes y cromatográficas (Guan *et al.*, 2011), su fluorescencia bajo la luz UV verde o azul para las aflatoxinas B y G, respectivamente. Siendo la Aflatoxina B1 la más potente (Bennett *et al.*, 2003), (Fig. 7). La parte más reactiva de la estructura de las aflatoxinas es el anillo lactónico. Por otro lado, la existencia de un núcleo bifurano confiere a las moléculas de aflatoxina una gran rigidez lo que favorece la interacción con algunos componentes celulares (Palmgren and Hayes, 1987).

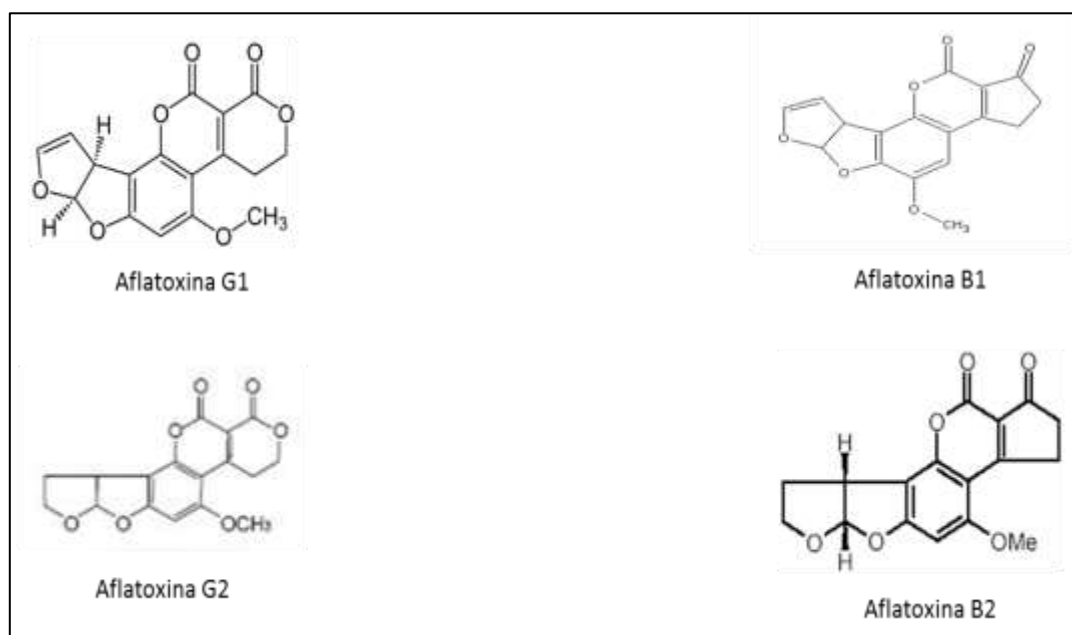


Figura 7. Estructura molecular de cuatro diferentes tipos de aflatoxinas. Aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂, distinguidas principalmente por el color de su fluorescencia azul o verde, respectivamente, bajo la luz UV.

Aflatoxina B1

La Aflatoxina B₁ es más frecuente en maíz, cacahuate, nueces, arroz, cereales y torta de algodón (Díaz, 1995). Las características físicas, químicas y biológicas de la molécula

de AFB₁ indican dos grupos cruciales para su actividad toxicológica. Uno es el doble enlace en el carbono 8,9 del anillo difurano el cual es responsable para la aducción de DNA y proteínas. La interacción de aflatoxinas, DNA y proteínas, la cual ocurre en este sitio afecta las funciones bioquímicas normales de estas macromoléculas y llevan a efectos perjudiciales a nivel celular (Lee, 1981). Afectando de esta forma la expresión de ciertos genes en humanos, animales y plantas.

Efectos negativos de AFB₁ en humanos, animales y plantas

Las alteraciones bioquímicas ocasionadas por AFB₁ han sido estudiadas en numerosos sistemas biológicos. Por su alto riesgo de toxicidad tanto en humanos, animales y diversas especies de cultivos, que actúan a nivel celular y DNA, ocasiona desarrollo de cáncer en humanos, inhibición de germinación y algunas alteraciones cromosómicas.

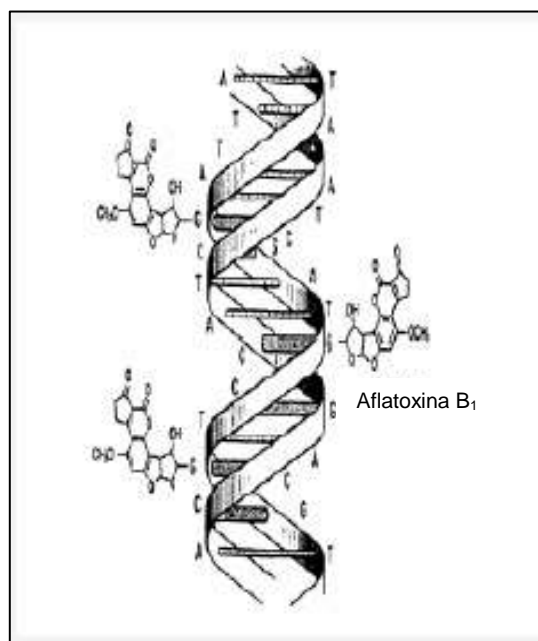


Figura 8. Formación de aductos de la Aflatoxina B₁ - DNA. (McGlynn *et al.*, 2003)

El Comité Científico de la Alimentación Humana de la Union Europea ha señalado que la AFB₁ es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de sufrir cáncer hepático. La IARC ha clasificado a la AFB₁ en el grupo de sustancias tipo 1, debido a las evidencias existentes sobre su carácter carcinógeno (AIRC, 2002).

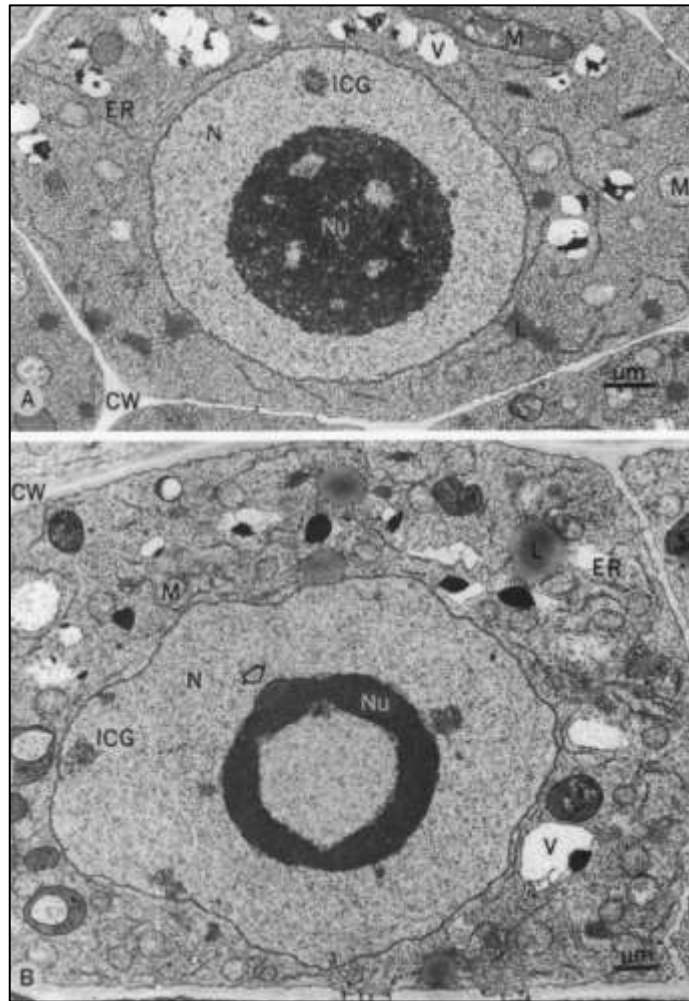


Figura 9. Efectos de AFB₁ en células de la raíz de *Lepidium sativum*. Ultraestructura de células de raíz A: Control; B: tratadas con 100 µg/ml. Abreviaturas: Cw, pared celular; ER, retículo endoplásmico; ICG, gránulos de intercromatina; L, cuerpos lipídicos; M, mitocondria; N, núcleo; Nu, nucléolo; V, vacuola. (Crisan, 1973).

La producción de aflatoxinas en granos o semillas interviene con la síntesis de proteínas por la inhibición de la incorporación de los aminoácidos a las proteínas dando como resultado la no germinación de los embriones. Las semillas de maíz contaminadas presentan algunos cambios y efectos negativos, la inhibición de germinación se incrementa conforme aumenta la concentración de toxina y subsecuente formación de la plántula (Misra *et al.*, 1980).

A nivel de microscopia electrónica se pueden observar los cambios internos que sufren las células de plantas provenientes de semillas contaminadas, como se observa en la (Fig. 9), en cultivo de *Lepidium sativum* (Crisan, 1973).

En pequeñas concentraciones aparentemente interfiere con la biosíntesis de clorofila hasta la completa ausencia de color cuando las semillas geminadas han sido expuestas al compuesto en concentraciones de 10 µg/mL (Schoental, 1965).

Medidas de prevención y control de Aflatoxinas

Las aflatoxinas son las micotoxinas que generan las mayores pérdidas y los costos de manejo más elevados, debido a su alta toxicidad, la contaminación por estas micotoxinas se extiende en diversas zonas geográficas, lo que las convierte en un gran problema mundial. Numerosas estrategias se están desarrollando para el manejo y prácticas de campo para el control de micotoxinas. Claramente algunos son más prácticos y eficientes que otros. Nuevos enfoques genéticos y moleculares para prevenir o minimizar la aparición de aflatoxinas y otras micotoxinas, la modificación de toxicidad y carcinogenicidad en animales a través de la diversidad química e intervenciones alimentarias son muy prometedores. Más se requiere una investigación para establecer la eficacia la especificidad y la seguridad de estos procedimientos (CAST, 2003).

Prácticas culturales de manejo de cultivos

La contaminación por micotoxinas en el maíz depende de la coincidencia de la susceptibilidad del huésped y, las condiciones ambientales favorables para la infección.

Las prácticas culturales diseñadas para reducir la contaminación por micotoxinas de los cultivos tienen sus raíces en la epidemiología de las enfermedades de las plantas. La estrategia general es alterar las condiciones bajo las cuales crece el cultivo de modo que se evita que la infección por el hongo u hongos. La mayoría de hongos toxigénicos crecen en los residuos de cosechas, la rotación de cultivos o la labranza se han investigado como una estrategia para reducir las micotoxinas (Campbell y White, 1995).

La selección del campo, selección de híbridos, la fertilización, la fecha y densidad de siembra, el riego, el control de malezas, la rotación de cultivos, labranza, manejo de insectos y las enfermedades, y las prácticas de cosecha influyen en la concentración de aflatoxinas (Jones, 1986).

Después de la cosecha, la reducción de la humedad mediante secado artificial es una herramienta valiosa para detener el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas. Con prácticas de manejo de cultivos adecuadas se reduce el riesgo de contaminación por micotoxinas.

Influencia del cambio climático sobre la producción de micotoxinas

La gran producción de aflatoxinas y la gran incidencia de hongos toxigénicos se encuentran relacionados con aspectos medioambientales como elevadas precipitaciones.

El cambio climático afectará las micotoxinas en los alimentos. Muchos datos indican que las epidemias en plantas están influenciadas por el clima (Paterson y Lima, 2010), el que puede influenciar directamente la susceptibilidad del hospedante (Wotton y Strange,

1987). En general serán más las micotoxinas en la nueva era del cambio climático. Puede haber un incremento de “altas temperaturas que condicionan la presencia de hongos y micotoxinas” tales como *A. flavus* y aflatoxinas (Paterson y Lima, 2011).

Control biológico de la contaminación por aflatoxinas de los cultivos

La biodegradación de aflatoxinas usando microorganismos o enzimas es una de las estrategias mejor conocidas para el manejo de aflatoxinas en alimentos para humanos y para ganado. Microorganismos como las bacterias, hongos, cepas atoxigénicas de *Aspergillus* y el desarrollo de cultivares resistentes (Yan-ni *et al.*, 2008) son algunas de las medidas que se han desarrollado en los últimos años, siendo las bacterias las de mayor estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

EL maíz es uno de los cereales más importantes en el mundo, la calidad fisiológica de la semilla se ve afectada por varios agentes causales de enfermedades como las bacterias, hongos de almacén o campo y por metabolitos secundarios producidos por los hongos como la Aflatoxina B₁ (AFB₁), siendo este un factor importante que afecta la calidad fisiológica de la semilla, principalmente el porcentaje de germinación, aunado al cambio climático, la contaminación por aflatoxinas será mayor debido a que la susceptibilidad del hospedante aumentará por las condiciones adversas.

Si no se cuenta con semillas de buena calidad no se pueden asegurar una predicción exitosa de los cultivos y en consecuencia la producción de alimentos se verá afectada.

En busca de soluciones para mitigar o reducir estos efectos negativos que las aflatoxinas tienen en la salud humana, animal y calidad fisiológica en la producción de semillas, se recurre a la utilización del control biológico aislando bacterias asociadas a los cultivos de maíz para evaluar su capacidad para degradar AFB₁ de semillas de maíz contaminadas.

Considerando técnicas moleculares para la identificación de las bacterias con capacidad de degradar AFB₁ se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar bacterias asociadas a los cultivos de maíz capaces de degradar Aflatoxina B₁ para mejorar la calidad fisiológica de semillas de maíz.

Objetivos Particulares

- Aislar bacterias de suelo y semilla de maíz para determinar su actividad degradadora de Aflatoxina B₁.
- Identificar a nivel molecular las bacterias degradadoras de Aflatoxina B₁.
- Evaluar los efectos de Aflatoxina B₁ y bacterias degradadoras en la calidad fisiológica de la semilla.

HIPÓTESIS

- La Aflatoxina B₁ producida por *A. flavus* afecta la calidad fisiológica de la semilla.
- Existen bacterias asociadas a los cultivos de maíz, capaces de reducir la concentración de Aflatoxina B₁.

LITERATURA CITADA

- Bennett J. W. and M. Klich (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497–516.
- Campbell K. W. and D. G. White (1995) Inheritance of resistance to *Aspergillus* ear rot and aflatoxin in corn genotypes. *Phytopathology* 85:886–896.
- Carvajal M. (2013) Transformación de la Aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB₁-DNA. *Revista Especializada en Ciencias Químicas y Biológicas* 16;109-120.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology Mycotoxins (2003) Risks in Plant, Animal, and Human Systems Rep. 139, Ames IA.
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (2015) Disponible en <http://www.biodiversidad.gob.mx/> (Diciembre 2013).
- Cotty P. J. (1991) Effect of harvest date on aflatoxin contamination of cottonseed. *Plant Diseases* 75:312–314.
- Cotty P. J. (2001) Cottonseed losses and mycotoxins. In, T.L. Kirkpatrick and C.S. Rothrock (Ed.), *The American Phytopathological Society*, Minnesota (pp. 9–13).
- Cotty P. J. and L. S. Lee (1990) Position and aflatoxin levels of toxin positive bollson cotton plants. Proceedings of the Beltwide Cotton Production and Research Conference. *National Cotton Council of America*, Las Vegas, NV (pp. 34–36).
- Crisan E. V. (1973) Effects of Aflatoxin on Seedling Growth and Ultrastructure in Plants. *Applied Microbiology* 12:991-1000.
- Díaz G. J. (1995) Regulación de niveles máximos tolerables de micotoxinas en materias primas y alimentos terminados. *Veterinaria al día* 1:22-27.

- Díaz G. J. (1996a) Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Segunda parte. *Veterinaria al día* 2:3-8.
- Díaz G. J. (1996b) Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Primera parte. *Veterinaria al día* 2:28-34.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015) Disponible en : <http://www.fao.org/> (Diciembre 2013).
- Gimeno A. (2002) Los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal; conceptos, problemas, control y recomendaciones. *Albeitar* 45:46-47.
- Horn B.W. and J. W. Doner (1998) Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut growing regions of the United States. *Mycology* 90:767-776.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2002) Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans Vol. 82 Lyon (pp. 171).
- Jones R. K. (1986) The influence of cultural practices on minimizing the development of aflatoxin in field maize. In MS Zuber, EB Lillehoj, BL Renfro (Ed.) Aflatoxin in Maize; a Proceedings of the Workshop (pp.136–44). Mexico: CIMMYT.
- Kato Y. T. A. (1984) Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evolutionary Biology* 17:219-253.
- Klich M. A. (2007) *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8:713–722.
- Lee L. S., J. J. Dunn, A. J. De Lucca and A. Ciegler (1981) Role of lactone ring of aflatoxin B₁ in toxicity and mutagenicity. *Experientia* 37:16-17.
- McGlynn K., K. Hunter, T. Le Voyer, J. Roush, P. Wise and R. Michielli (2003) Susceptibility to aflatoxin B₁-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Research* 63:4594-4601.

- Misra R. S. and R. K. Tripathi (1980) Effect of aflatoxin B1 on germination, respiration and α -amylase in maize. *Journal of Plant Diseases and Protection* 87:155-160.
- Munkvold G. P. (2003) Cultural and Genetic Approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review Phytopathology* 41:99–116.
- Palmgren D. and A. W. Hayes (1987) Mycotoxins in food (Ed.) Academic Press: London, (pp. 65-95).
- Paterson R. R. M. and N. Lima (2010) How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 43:1902–1914.
- Paterson R. R. M. and N. Lima (2011) Further mycotoxin effects from climate change. *Food Research International* 44:2555–2566.
- Probst C., H. Njapau and P. J. Cotty (2007) Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2762–2764.
- Schoental R. and A. F. White (1965) Aflatoxin and albinism in plants. *Nature* 205:57-58.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014). SIAP-SAGARPA. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> (Diciembre 2013)
- Soriano del Castillo J.M. (2007) *Micotoxinas en Alimentos*. Editorial Díaz de Santos. España. (pp 4-8)
- Wellman F. L. (1972) *Tropical American plant diseases*. The Scarecrow Press. NJ, USA
- Wotton H. R. and R. N. Strange (1987) Increased susceptibility and reduced phytoalexin accumulation in drought-stressed peanut kernels challenged with *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 53:270–273.
- Yan-ni Y., Y. Lei-yan, J. Jin-hua and M. Zhong-hua (2008). Biological control of aflatoxins contamination of crops. *Journal of Zhejiang University* 9:787-792.
- Yoder O. C. (1980) Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 18:103–129.

CAPÍTULO I

DEGRADACIÓN DE AFLATOXINA B₁ POR BACTERIAS AISLADAS DE SUELO Y ENDÓFITAS DE SEMILLAS DE MAÍZ

1.1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad del suelo refleja la variedad de organismos vivos, que comprende innumerables organismos no visibles a simple vista como los microorganismos: bacterias, hongos, protozoarios, la mesofauna: ácaros y colémbolos y la más reconocida macrofauna: lombrices y termitas. La investigación en la biodiversidad del suelo y su relación con los ecosistemas se han enfocado en un vago número de grupos taxonómicos y organismos indicadores (FAO, 2015).

Las bacterias endófitas son encontradas en raíces, tallos hojas semillas, frutos, tubérculos, óvulos y además dentro de los nódulos en leguminosas. En la mayoría de las plantas, las raíces tienen el mayor número de endófitos comparado con los tejidos que están por encima del suelo (Rosenblueth *et al.*, 2006). Muchos estudios han confirmado que la superficie y el interior de las semillas portan una variedad de organismos bacterianos (Nelson, 2004).

La semilla actúa como el medio de continuación de las plantas y son un medio importante en la producción agrícola (Guan, 2009).

En los últimos años se han estudiado un gran número de microorganismos provenientes de diferentes nichos y que ayudan en el control de enfermedades de cultivos y más aún en el control de la contaminación por micotoxinas, con el propósito de reducir los riesgos de consumir alimentos contaminados, y contribuir con la seguridad alimentaria a nivel global. Dentro de los principales microorganismos se encuentran:

Bacterias

En los últimos años se han estudiado diversos grupos microbianos, especialmente las bacterias por su gran potencial para degradar aflatoxinas o reducir su potencial tóxico. El número de bacterias con capacidad de degradar aflatoxina es muy extenso que abarca diferentes géneros y especies. Especies del género *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Burkholderia* en experimentos de laboratorio han mostrado la capacidad para inhibir el crecimiento de *A. flavus* e inhibir la producción de aflatoxina (Palumbo *et al.*, 2006).

Una de las bacterias más estudiadas *Flavobacterium aurantiacum* habitante de agua y suelo con alta capacidad de degradar aflatoxina (Mishra *et al.*, 2003).

Rhodococcus erythropolis y *Mycobacterium fluoranthenvivorans*, son capaces de degradar Aflatoxina B1 de una forma efectiva en un tiempo relativamente corto (Teniola *et al.*, 2005).

Numerosas cepas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas solanacearum* (= *Ralstonia solanacearum*), aislados de suelo de cultivo de maíz han sido reportados como capaces de inhibir la acumulación de aflatoxinas (Nesci *et al.*, 2005).

Hongos

Recientemente también se ha implicado a los hongos con la degradación de aflatoxina, incluyendo a los hongos zigomicetos (*Rhizopus* sp. and *Mucor* sp.), hongos ascomicetos (*Aspergillus niger* y *Trichoderma* sp.), hongos fitopatógenos (*Phoma* sp. y *Alternaria* sp.), hongos basidiomicetos (*Armillariella tabescens*) (Leonowicz *et al.*, 1999).

Cepas de *A. flavus* no toxigénicas, han demostrado ser un exitoso control biológico para la contaminación por aflatoxinas en pre y postcosecha, lo cual se ha alcanzado

mediante la aplicación competitiva de cepas no toxigénicas de *A. flavus* ó *A. parasiticus* (Dorner, 2004).

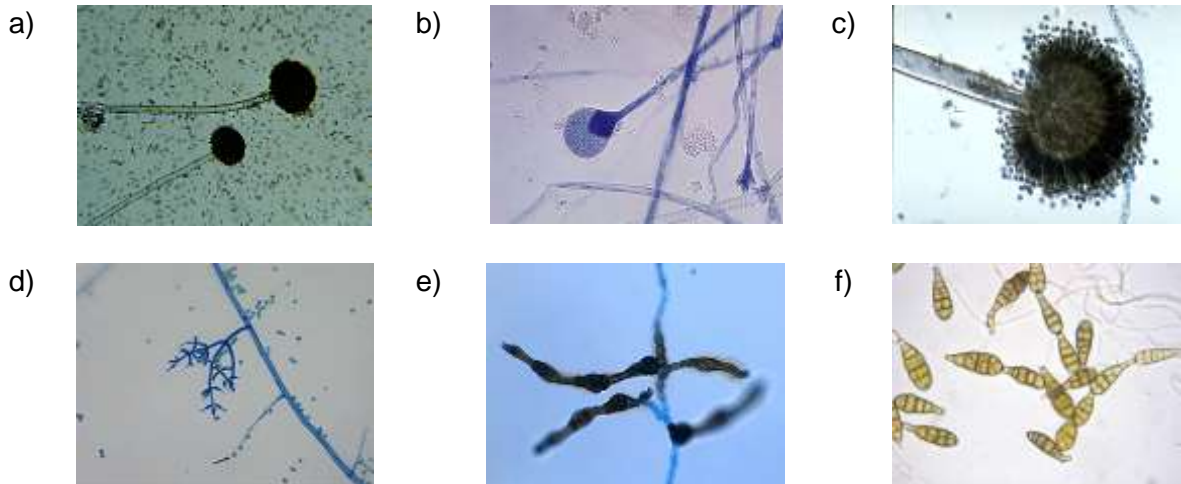


Figura 10. Hongos con capacidad de degradar AFB₁. Hongos zigomicetos, a) *Rhizopus* sp., b) *Mucor* sp.; hongos ascomicetos, c) *Aspergillus niger*, d) *Trichoderma* sp.; hongos fitopatógenos e) *Phoma* sp., f) *Alternaria* sp.



Figura 11. *Armillariella tabescens*, un basidiomiceto con capacidad de degradar AFB₁.

Levaduras y enzimas

Algunas especies de bacterias y hongos han mostrado actividad enzimática en la degradación de micotoxinas (Bata y Lasztity, 1999).

Una enzima novel para degradar aflatoxina ha sido aislada y purificada de *Pleurotus ostreatus* (Motomura *et al.*, 2003). Esta enzima demostró tener mejor actividad para degradar aflatoxina a 25°C con un pH de 4.0-5.0.

La myxobacteria aflatoxin degradation enzyme (MADE) aislada y purificada de *Myxococcus fulvus* ANSM068 tiene actividad degradadora de AFB₁ hasta en un 71.89% (Zhao *et al.*, 2010).

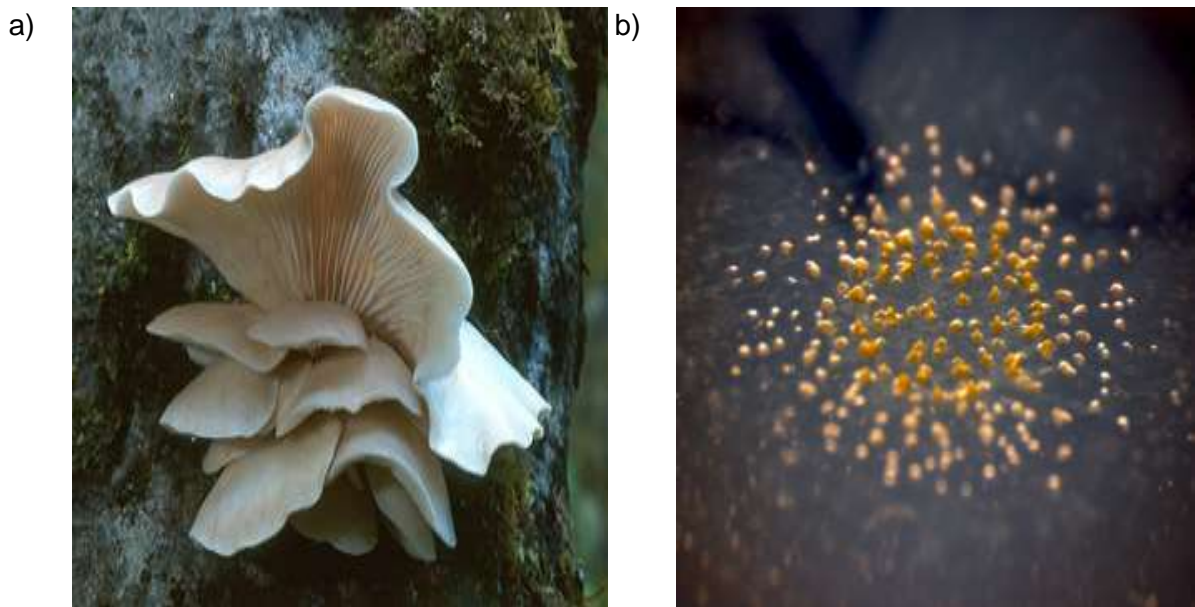


Figura 12. Basidiomiceto y bacteria productores de enzimas degradadoras de AFB₁. a) *Pleurotus ostreatus*; b) *Myxococcus fulvus*.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Colecta de muestras de suelo y descripción de genotipos de maíz para aislamiento de bacterias endófitas

Las muestras de suelo se obtuvieron de campos de cultivo de maíz, de las estaciones experimentales del CIMMYT en Agua Fría, ubicada entre los límites del estado de Puebla y Veracruz, localizada a 113 msnm y de la estación experimental de El Batán, Texcoco, Estado de México, a 2270 msnm en el ciclo primavera-verano. Las muestras se obtuvieron a una profundidad de 10-30 cm colocándose en una hielera para su transporte al laboratorio, manteniéndose en refrigeración a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para el aislamiento de bacterias endófitas se seleccionaron 8 genotipos, adaptados a dos climas diferentes y evaluados en diferentes ciclos de siembras en las estaciones experimentales del CIMMYT en Agua Fría (tropical) y Tlaltizapán Estado de Morelos, a 945 msnm (subtropical), para evaluar su resistencia o susceptibilidad a *A. flavus* y aflatoxinas.

1.2.2 Aislamiento de bacterias de suelo

Se pesaron 2 g de muestra de suelo en un matraz al que se agregaron 20 mL de agua estéril y se colocó en un agitador (Thermo Scientific, USA) con agitación continua, durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, esta suspensión se filtró a través de un filtro Whatman No. 4, seguido de diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-5} . De cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL que se distribuyó sobre una placa de medio de cultivo caldo de nutrientes agar (NB). Después de 24 horas de incubación a 30°C, se observaron

las cajas de Petri bajo una lupa para poder describir las colonias que crecieron de cada dilución, se aislaron diferentes formas coloniales de acuerdo, a su color, tamaño, borde, elevación y textura. Se cultivaron por estría cruzada en medio NB, el cultivo puro se conservó en solución de glicerol al 20% a -20°C, hasta su utilización.

Cuadro 1. Genotipos de maíz del CIMMYT utilizados para la extracción de bacterias endófitas

Genotipo	Genealogía
1	CML247=(G24F119*G24F54)-6-4-1-1-BB-f)
2	CML495=[P NVA. BCO.(S/D)xNPH-28]F32-B-1-B-1-2-BBBBBB]
3	CL-02510=P25C5HC246-3-1-BB-2-#-BBBBBBB
4	CML155=Pob62c3HC163-2-1-3#-1-1-1-1-B-1-B-B-#
5	DTPWC9-F115-1-2-1-2-B-B-B
6	P502c1F9-2-2-1-B-B-1-3-1-1-B-1-B-B-1-B-B-B-B
7	90[SPMATC4/P500(SELY)]#-B-4-2-B-B
8	DTPWC9-F67-2-2-1-B-B-B

1.2.3 Aislamiento de bacterias endófitas de semillas de maíz

Se pesaron 10 g de semilla de cada genotipo, la superficie se desinfectó haciendo un lavado con solución de alcohol al 70% durante 5 minutos, posteriormente un lavado con solución de hipoclorito de sodio con concentración 0.53% por 10 minutos, con agitación continua y finalmente tres lavados con agua destilada estéril. Posterior a la desinfección las semillas se colocaron en un molino de café (Kitchen AID, USA) y se agregaron 20 mL

de solución buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaCl}$) para triturar perfectamente. Se tomó una alícuota de 0.1 mL de extracto y se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-3} de cada dilución, se tomó una alícuota de 0.1 mL que se distribuyó perfectamente sobre una placa de medio de cultivo NB, también se tomó una alícuota de 0.1 mL del agua de lavado como control. Después de 24 horas de incubación a 30°C , se observaron las cajas bajo una lupa para poder describir las colonias que crecieron de cada dilución, se aislaron diferentes formas coloniales de acuerdo, a su color, tamaño, borde, elevación y textura. Se cultivaron por estría cruzada en medio NB. El cultivo puro se conservó en solución de glicerol al 20% a -20°C , hasta su utilización.

1.2.4 Degradación biológica de AFB_1 por bacterias aisladas de suelo y de semillas de maíz

En medio caldo de papa dextrosa (PDB) natural, se evaluó la degradación biológica de aflatoxina usando todos los microorganismos aislados de suelo y semillas de maíz. El medio de cultivo PDB se preparó de forma tradicional, se distribuyó en matraces de 125 mL transfiriendo 75 mL de medio PDB a cada matraz y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min. Posterior a la esterilización se adicionaron 0.120 mL de AFB_1 , a la concentración de $29.29 \mu\text{g/mL}$, se agregó una azada de cultivo bacteriano puro o una colonia aislada a cada matraz, y se incubaron a 30°C con agitación continua durante 12 días. En el día 0 y 12 se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (BECKMAN COULTER DU-530, USA) para determinar el crecimiento bacteriano e igualmente se tomaron muestras para determinar el contenido de aflatoxina al inicio y al final del experimento. La cuantificación de AFB_1 se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, procedimiento fluorométrico VICAM para maíz de 0-50 ($\mu\text{g/mL}$) con algunas modificaciones. Se calibró el fluorómetro (VICAM SERIES 4 EX, USA) con

estándares de calibración introduciendo los valores correspondientes al procedimiento que se utiliza, rojo: 44, verde:-1, amarillo ± 22 , diariamente se preparó solución reveladora en relación 1:9 con agua destilada, esta solución se tomó como reactivo blanco asegurando una lectura de 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el fluorómetro calibrado. Posteriormente las muestras se trataron con metanol al 80% y agitación para extraer la toxina presente y cuantificarla, las muestras se homogenizaron perfectamente a 10 mL de muestra se agregaron 40 mL de metanol (JT BAKER 9093-2) y se agitaron perfectamente durante un minuto en un vórtex, la solución se filtró a través de papel filtro cualitativo aflautado, se tomaron 10 mL del extracto filtrado y se diluyeron con 40 mL de agua destilada nuevamente se homogeneizó perfectamente la dilución y se filtró a través de un filtro de microfibra, se pasaron 5 mL de la dilución a través de una columna de inmunoafinidad Aflatest, se lavó la columna con 10 mL de agua destilada y finalmente se pasó 1 mL de metanol HPLC (JT 9093-33) para eluir la columna y el eluato se colectó en un tubo de vidrio para fluorómetro, se agregó 1 mL de revelador Aflatest y se leyó inmediatamente en el fluorómetro, los valores se obtienen directamente en $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se registraron los datos de concentración de AFB₁ obtenidos del día 0 y 12.

1.2.5 Análisis de datos

Cada matraz se inoculó con aflatoxina B₁ y con bacterias por separado aisladas de suelo y de semilla de maíz, con tres repeticiones cada uno. Los resultados de concentración inicial y final al cabo de 12 días, se analizaron mediante T-test para muestras emparejadas utilizando una $p=0.05$, para determinar cuáles bacterias reducían la concentración de aflatoxina B₁

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Aislamiento de bacterias de suelo

Los aislamientos puros de bacterias de muestras de suelo de cultivos de maíz se caracterizaron de acuerdo a su morfología tomando en cuenta el color, tamaño, apariencia, superficie y borde. Se obtuvieron 25 aislamientos puros de bacterias (Cuadro 2). De acuerdo con numerosas investigaciones, la diversidad bacteriana de muestras de suelos está conformada por bacterias conocidas y por nuevos grupos, tanto relacionados como no relacionados filogenéticamente a las ya conocidas.

Cuadro 2. Descripción morfológica de bacterias aisladas de suelo de cultivos de maíz en el período P-V 2012.

Aislamiento	Color	Tamaño	Apariencia	Borde	Superficie
SEAF12-004	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada
SEAF12-005	Beige	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-006	Beige	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-007	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-008	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-009	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-010	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Plana
SEAF12-011	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-012	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-016	Beige	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-018	Amarillo	Pequeña	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-019	Rosa	Pequeña	Seca	Liso	Elevada
SEAF12-020	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana

SEAF12-021	Rosa	Pequeña	Seca	Liso	Elevada
SEAF12-022	Rosa	Pequeña	Seca	Liso	Elevada
SEAF12-023	Rosa	Pequeña	Seca	Liso	Elevada
SEAF12-024	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-025	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEAF12-026	Rosa	Pequeña	Seca	Liso	Elevada
SEBA13-001	Rosa	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada
SEBA13-002	Amarillo	Grande	Húmeda	Liso	Plana
SEBA13-003	Amarillo	Mediana	Húmeda	Liso	Plana
SEBA13-004	Amarillo	Mediana	Seca	Rugoso	Plana
SEBA13-005	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada
SEBA13-006	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada

SE: Extracto de Suelo; AF: Agua Fría; 12: Año 2012; BA: Batán; 13: Año 2013. Pequeña: 1-2 mm; Mediana: 3-5 mm; Grande:> 5 mm. Crecimiento en medio NB. Colonias observadas después de 24 horas de incubación a 30°C.

1.3.2 Aislamiento de bacterias endófitas de semillas de maíz

Los aislamientos obtenidos se describieron morfológicamente tomando en cuenta características como color, tamaño, apariencia, superficie y borde. Se obtuvieron 23 aislamientos en total. Las semillas utilizadas proviene de líneas de maíz resistentes y susceptibles a la contaminación por aflatoxinas, las cuales fueron estudiadas en 2012 mediante técnicas moleculares y pruebas serológicas para determinar la concentración de AFB₁ después de inocular el cultivo con una cepa de *A. flavus* productora de aflatoxina, en esta investigación se planteó el objetivo de extraer y aislar los microorganismos endófitos para poder obtener mayor información acerca de la población bacteriana que se encontraba en estos genotipos.

Cuadro 3. Descripción morfológica de bacterias aisladas de semillas de maíz en el período P-V 2013.

Aislamiento	Color	Tamaño	Apariencia	Borde	Superficie
ES113-001	Beige	Mediana	Seca	Liso	Plana
ES113-002	Beige	Mediana	Seca	Liso	Plana
ES213-003	Beige	Mediana	Seca	Liso	Plana
ES413-004	Beige	Mediana	Seca	Liso	Plana
ES413-005	Amarillo	Mediana	Húmeda	Liso	Plana
ES513-006	Blanco	Pequeña	Húmeda	Liso	Plana
ES513-007	Transparente	Pequeña	Seca	Rugoso	Plana
ES713-008	Beige	Pequeña	Húmeda	Liso	Elevada
ES713-009	Amarillo	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada
ES813-010	Beige	Mediana	Seca	Liso	Plana
ES813-011	Blanco	Pequeña	Húmeda	Liso	Plana
ES913-012	Amarillo	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada
ES913-013	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Elevada
ES913-014	Blanco	Mediana	Húmeda	Liso	Plana
ES1013-015	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Plana
ES213-016	Beige	Mediana	Húmeda	Liso	Plana
ES313-017	Amarillo	Mediana	Seca	Liso	Plana
ES313-018	Beige	Grande	Húmeda	Liso	Elevada
ES413-019	Beige	Pequeña	Húmeda	Liso	Plana
ES513-020	Beige	Pequeña	Húmeda	Liso	Plana
ES913-022	Beige	Pequeña	Húmeda	Liso	Plana
ES913-023	Beige	Grande	Seca	Liso	Plana
ES1013-024	Beige	Grande	Seca	Liso	Plana

ES: Endófito de Semilla; Número Consecutivo (1-10): No. Entrada Genotipo; 13: Año 2013. Pequeña: 1-2 mm; Mediana: 3-5 mm; Grande:> 5 mm. Crecimiento en medio NB. Colonias observadas después de 24 horas de incubación a 30°C.

Las aflatoxinas pueden ocasionar daños irreversibles en humanos, animales, plantas y semillas, alterando sus funciones metabólicas principales. Por ello es muy importante buscar medidas para mitigar y controlar los niveles de contaminación.

Las semillas portan dos genes micrófitos de los padres (Guan, 2009) y una variedad de bacterias benéficas y patógenas. Estos microorganismos se originaron de varias comunidades microbianas que nacieron en la superficie de la semilla (Nelson, 2004). Algunos reportes han demostrado que de una selección de híbridos de maíz relacionados genéticamente, la mayoría de los endófitos dominantes de la descendencia de los híbridos se encontraron en las semillas de los padres, indicando que esta es una continuidad de bacterias endófitas de los padres a las semillas descendientes. Las comunidades de bacterias endófitas de las semillas descendientes son afectadas por la raza de los padres (Yang *et al.*, 2012). El desarrollo de cultivares resistentes a la contaminación por aflatoxinas y otras micotoxinas resulta ser una práctica efectiva, pero es importante destacar el estudio de las comunidades bacterianas que habitan las semillas de manera endófitas, para determinar qué factores influyen en la resistencia a la acumulación de aflatoxinas y las comunidades endófitas de microorganismos.

1.3.3 Degradación de AFB₁ por bacterias aisladas de suelo y semillas de maíz

Se utilizaron todos los aislamientos obtenidos tanto de suelo como de semillas de maíz para determinar su actividad degradadora, y elegir a los mejores, después de cuantificar la concentración inicial y final de AFB₁.

Cuadro 4. Degradación de la Aflatoxina B1 por bacterias aisladas de suelo en medio de cultivo líquido PDB.

Aislamiento	Promedio AFB ₁ (µg/kg)		Diferencia AFB ₁ (µg/kg) Día 0- Día 12	T-test Día 0 vs Día 12 p<0.05	OD _{600 nm}		Diferencia OD _{600 nm} Día 12-Día 0
	Día 0	Día 12			Día 0	Día 12	
SEAF12-004	21.667	12.333	9.333*	0.0088	0.004	1.890	1.886
SEAF12-005	16.333	16.000	0.333	0.8600	0.004	0.530	0.526
SEAF12-006	20.667	7.833	12.833*	0.0005	0.010	2.220	2.210
SEAF12-007	19.667	22.000	-2.333	0.3688	0.010	0.790	0.780
SEAF12-008	21.667	21.667	0.000	1.0000	0.012	0.915	0.903
SEAF12-009	20.333	18.000	2.333	0.3688	0.005	0.835	0.830
SEAF12-010	24.000	4.500	19.500*	0.0114	0.006	1.720	1.714
SEAF12-011	19.667	19.333	0.333	0.7418	0.000	0.890	0.890
SEAF12-012	21.000	19.667	1.333	0.6667	0.002	1.015	1.013
SEAF12-016	19.667	22.000	-2.333	0.2495	0.003	0.730	0.727
SEAF12-018	20.667	17.000	3.666	0.0927	0.002	1.540	1.538
SEAF12-019	18.333	4.537	13.796	0.1089	0.003	2.120	2.117
SEAF12-020	19.667	22.333	-2.666	0.0942	0.004	1.395	1.391
SEAF12-021	20.000	10.467	9.533*	0.0249	0.002	2.250	2.248
SEAF12-022	16.333	11.467	4.866	0.4226	0.008	2.225	2.217
SEAF12-023	20.333	10.700	9.633*	0.0344	0.014	2.155	2.141
SEAF12-024	22.000	2.600	19.400*	0.0150	0.002	1.410	1.408
SEAF12-025	24.333	11.567	12.766*	0.0219	0.007	1.920	1.913
SEAF12-026	24.667	12.667	12.000*	0.0069	0.007	2.270	2.263
SEBA13-001	17.333	17.667	-0.333	0.3681	0.004	0.495	0.491
SEBA13-002	22.333	13.000	9.333	0.2487	0.004	0.099	0.095
SEBA13-003	20.333	14.000	6.333	0.0880	0.007	0.090	0.083
SEBA13-004	16.000	17.667	-1.666	0.2999	0.004	1.220	1.216
SEBA13-005	19.667	13.667	6.000*	0.0091	0.005	1.240	1.235
SEBA13-006	17.667	6.800	10.866*	0.0294	0.008	1.225	1.217

* Diferencia Significativa T-Test (p<0.05)

Cuadro 5. Degradación de Aflatoxina B₁ por bacterias aisladas de semilla de maíz, en medio de cultivo PDB.

Aislamiento	Promedio AFB ₁ (µg/kg)		Diferencia AFB ₁ (µg/kg) Día 0- Día 12	T-test Día 0 vs Día 12 p<0.05	OD _{600nm}		Diferencia OD _{600 nm} Día 12- Día 0
	Día 0	Día 12			Día 0	Día 12	
ES113-001	29.33	12.67	16.67	0.0741	0.003	0.750	0.747
ES113-002	25.33	21.00	4.33	0.3588	0.002	0.019	0.017
ES213-003	25.67	18.67	7.00	0.2767	0.002	0.012	0.010
ES413-004	31.00	23.67	7.33	0.1317	0.002	0.004	0.002
ES413-005	24.67	9.67	15.00*	0.0011	0.003	0.925	0.922
ES513-006	30.67	24.33	6.33	0.0696	0.002	0.035	0.033
ES513-007	27.67	26.33	1.33	0.7735	0.001	0.004	0.003
ES713-008	21.00	12.67	8.33	0.0996	0.002	0.305	0.303
ES713-009	22.00	9.20	12.80*	0.0195	0.001	0.630	0.629
ES813-010	29.33	20.67	8.67	0.0390	0.003	0.009	0.006
ES813-011	29.00	19.33	9.67	0.1114	0.001	0.003	0.002
ES913-012	32.33	8.37	23.97*	0.0225	0.003	0.965	0.962
ES913-013	25.33	9.63	15.70*	0.0362	0.001	0.575	0.574
ES913-014	31.00	12.57	18.43*	0.0211	0.000	1.480	1.480
ES1013-015	20.67	12.33	8.33*	0.0853	0.001	0.560	0.559
ES213-016	26.33	22.33	4.00	0.3206	0.003	2.470	2.467
ES313-017	28.67	28.33	0.33	0.9388	0.002	1.415	1.413
ES313-018	33.33	20.33	13.00	0.0247	0.001	2.205	2.204
ES413-019	29.33	24.67	4.67	0.0339	0.004	0.025	0.021
ES513-020	37.67	18.33	19.33	0.2812	0.003	0.016	0.013
ES913-022	29.33	13.00	16.33	0.0210	0.003	2.130	2.127
ES913-023	30.00	20.00	10.00	0.0225	0.002	1.140	1.138
ES1013-024	33.33	16.33	17.00	0.0776	0.000	1.600	1.600

* Diferencia Significativa T-Test (p<0.05).

Se seleccionaron los aislamientos que presentaron diferencia significativa en la concentración final de AFB₁ respecto a su concentración inicial. (Cuadro 6) y (Cuadro 7) para aislamientos de bacterias de suelo y semillas, respectivamente.

Cuadro 6. Bacterias aisladas de suelo que presentaron alto porcentaje de degradación de Aflatoxina B₁.

Aislamiento	Concentración inicial de AFB ₁ (µg/kg)			Concentración final de AFB ₁ (µg/kg)			T-test (p<0.05)
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
SEAF12-004	23	20	22	12	12	13	0.0088
SEAF12-010	23	21	28	4.1	4.8	4.6	0.0114
SEAF12-024	18	21	27	2.1	2.7	3	0.0150

* Diferencia significativa T-test (p<0.05).

Cuadro 7. Bacterias aisladas de semillas de maíz que presentaron alto porcentaje de degradación de Aflatoxina B₁.

Aislamiento	Concentración inicial de AFB ₁ (µg/kg)			Concentración final de AFB ₁ (µg/kg)			T-test (p<0.05)
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
ES413-005	24	24	26	9.4	9.6	10	0.0011
ES713-008	17	27	19	11	13	14	0.0996
ES713-009	25	19	22	9.4	9.6	8.6	0.0195
ES913-012	26	36	35	9.2	9.7	6.2	0.0225
ES913-013	30	23	23	8.2	9.7	11	0.0362
ES913-014	29	33	31	16	12	9.7	0.0211
ES1013-015	24	20	18	11	12	14	0.0853

* Diferencia significativa T-test (p<0.05)

Existe una gran diversidad de microorganismos con la habilidad de degradar aflatoxinas o metabolizarlas en compuestos menos tóxicos o no detectables. Entre ellos encontramos, bacterias, levaduras, cepas de *A. flavus* atoxigenicas, que son usados como control biológico de la contaminación de cultivos. Como se puede apreciar en los resultados, las fuentes para obtener los microorganismos capaces de degradar aflatoxina se encuentran disponibles a nuestro alcance. El control biológico parece ser el más efectivo por su especificidad, y sobre todo por ser amigable con el ambiente.

1.4 LITERATURA CITADA

- Bata A. and R. Lasztity (1999) Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology* 10:223-228.
- Dorner J. W. (2004) Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Toxicology Toxin Reviews* 23:425-450.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Marzo 2015)
- Guan K. L. (2009) *Seed physiological ecology*. Chinese Agricultural Press. Beijing, China. (Pp, 1–7)
- Leonowicz A., A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojtas-Wasilewska, N. S. Cho, M. Hofrichter and J. Rogalski (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27:175–185.
- Mishra H. N. and C. Das (2003) A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43:245–264.

- Motomura M., T. Toyomasu, K. Mizuno and T. Shinozawa (2003) Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research* 158:237-242.
- Nelson E. B. (2004) Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42:271–309.
- Nesci A. V., R. V. Bluma and M.G. Etcheverry (2005) In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *European Journal of Plant Pathology* 113:159-171.
- Palumbo J. D., J L. Baker, and N. E. Mahoney (2006) Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial Ecology* 5:45-52.
- Rosenblueth M. and E. Martínez-Romero (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19:827– 837.
- Teniola O. D., P. A. Addo, I. M. Brost, P. Farber, K. D. Jany, J. F. Alberts, W. H. V. Zyl, P. S. Steyn and W. H. Holzapfel (2005) Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. *International Journal of Food Microbiology* 105:111-117.
- Yang L., Z. Shan, X. Liwen, Z. Yuanyuan and S. Wei (2012). Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Archives of Microbiology* 194:1001-1012.
- Zhao L. H., S. Guan, X. Gao, Q. G. Ma, Y. P. Lei, X. M. Bai and C. Ji (2011). Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology* 110:147-155.

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR AFLATOXINA B₁

2.1 INTRODUCCIÓN

Secuencias de DNA ribosomal (rDNA) se han alineado y comparado con un gran número de seres vivos, este enfoque ha proporcionado una gran cantidad de información acerca de las relaciones filogenéticas entre individuos de taxas diferentes. Estudios de secuencias rDNA se han utilizado para inferir la historia filogenética a través de un espectro muy amplio de estudios entre los linajes basales de vida a las relaciones entre las especies y las poblaciones estrechamente relacionadas, (Hillis and Dixon, 1991). La secuenciación del gen 16S rDNA para bacterias y 18S para eucariotas ha llevado a una vasta cantidad de secuencias de los genes rDNA de la subunidad pequeña de los ribosomas en un gran número de seres vivos. La comparación de estas secuencias ha mostrado que estos genes son altamente conservados dentro de organismos vivos del mismo género y especie, pero que son diferentes entre organismos de otros géneros y especies (Woese, 1990).

La comparación de secuencias de rRNA es una herramienta poderosa para deducir las relaciones filogenéticas y de evolución entre, bacterias, arqueobacterias y organismos eucarióticos (Fox, 1981). El uso de la secuenciación del gen 16S rRNA se ha usado por un número de razones, que incluyen: i) está presente en casi todas las bacterias, que frecuentemente existen como un multigene familiar u operones; ii) las funciones del gen 16S rRNA no han cambiado con el tiempo lo que sugiere que los cambios aleatorios en las secuencias son más bien una medida exacta del tiempo (evolución); iii) el gen 16S rRNA (1500 bp) es lo suficientemente grande para propósitos informáticos (Patel, 2001).

Para cumplir el objetivo de identificación a nivel molecular de las bacterias aisladas con capacidad de degradar AFB₁, se secuenció el gen 16S, se siguió la metodología que se describe a continuación.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Para la identificación de bacterias con técnicas moleculares se cultivó en medio NB cada aislamiento de bacterias que mostraron tener la capacidad de degradar aflatoxina B₁ (Cuadro 6 y 7) y se incubaron durante 48 h, de esta forma se obtuvieron colonias bacterianas frescas para la extracción de DNA.

2.2.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó, con una muestra de cultivo bacteriano puro. Se utilizó CTAB 2% (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; Na₂EDTA 2H₂O mM, pH 8.0; CTAB 2%; NaCl 1.4 M). Se colocaron tubos con el Buffer precalentado a 60°C. Se agregó una azada de cultivo bacteriano fresco. Se mezcló vigorosamente y se incubó a 60°C por una hora, mezclando con vórtex cada 10 min. Posteriormente se agregó a cada tubo 0.5 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 9 391.2 x *g* por 10 min para formar la fase acuosa y la fase orgánica; se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y posteriormente se colocaron 0.5 mL de isopropanol frío, se mezcló suavemente para favorecer la precipitación y se incubó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 9

391.2 x g por 30 minutos y después se agregaron 0.5 mL de etanol al 70% para lavar la pastilla, nuevamente se centrifugó a 9 391.2 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla contenida en los tubos se secó a temperatura ambiente por 2 h, finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua libre de nucleasas. La calidad y concentración del DNA se verificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA) los valores de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se encontraron entre 1.8 - 2.0.

2.2.3 Amplificación por PCR del 16S rDNA

Se amplificó el 16S rDNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con los iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), se amplificó un fragmento de 1500 pares de bases (bp) aproximadamente. La mezcla de reacción para PCR se preparó para un volumen final de 25 µL, conteniendo 0.3 unidades de enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, USA), 0.8 Mm deoxinucleosidos trifosfatos, 100 ng DNA, 20 pMol de cada iniciador y 5 µL de 5X Green Go*Taq*® Reaction Buffer (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron en un Thermal Cycler DNA Engine® (BioRad, México), con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min seguida de 35 ciclos de: 2 min para desnaturalización a 95°C, un alineamiento a 59°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1.5 min; y una extensión final a 72°C por 5 min. La verificación de los productos de PCR se realizó por medio de una electroforesis a 111 volts en gel de agarosa al 1.5 %, preparado con 3 gr de agarosa 200 mL de 1x TAE Buffer (Tris Acetate-EDTA) calentando en el microondas, posteriormente para teñir el gel se agregaron 4 µL de Red Gel (Biotium,

USA) y las bandas se visualizaron en transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Alemania).

Los productos de PCR del 16S rDNA amplificados se limpiaron con una minicolumna con membrana de sílice por medio del kit de limpieza de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente la secuencia de bases se determinó por electroforesis capilar en un secuenciador modelo 3130 Genetic Analyser® (Applied Biosystem, USA), con los iniciadores U514F (5'-GTGCCAGCGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3') y un kit de secuenciación Big Dye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing kit standard (Applied Biosystem, USA).

2.2.4 Análisis filogenético mediante el 16S rDNA

Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.30 (Zhang *et al.*, 2000). Para el análisis filogenético la secuencia consenso se compiló en un archivo fasta y se alineó con el Clustal W 2 en "modo profile" (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) y analizada con el método de Máxima Parsinomia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1) (Saitou and Nei, 1987), con Initial Tree por adición al azar (10 reps). Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol genético resultante, un análisis de bootstrap se estimó con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

2.2.5 Análisis estadístico de frecuencias de géneros de bacterias

Las frecuencias de bacterias identificadas filogenéticamente se organizaron en una hoja de cálculo wk1 para analizarlos con el programa PC-ORD 6.0 y se obtuvo el índice de Sorensen mediante el método de encadenamiento de promedio de grupos (Mc Cune y Mefford, 1999).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de aislamientos obtenidos tanto de suelo y semilla solo se utilizaron 10 aislamientos: 7 aislamientos de semilla y 3 aislamientos de suelo, se eligieron con base a su capacidad para degradar AFB₁ en medio de cultivo, se hizo la extracción de DNA y la amplificación del 16S rDNA (Fig. 14) y el análisis filogenético correspondiente.

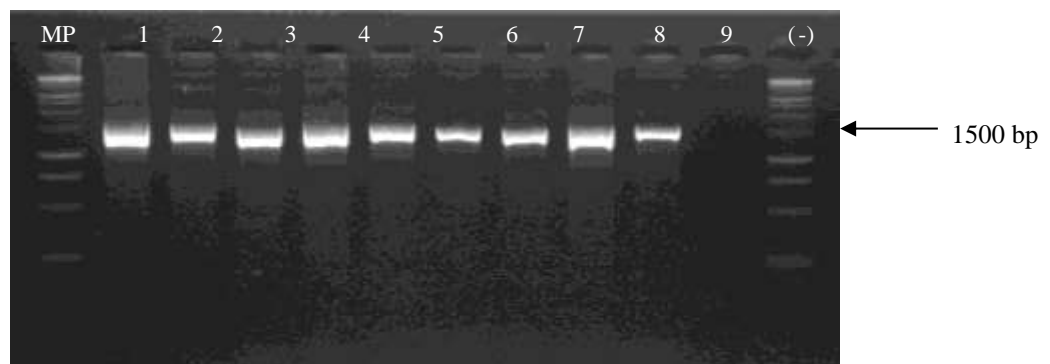


Figura 13. Amplificación del 16S rDNA correspondiente a bacterias aisladas de suelo y semilla de maíz durante el ciclo primavera-verano 2014. MP: marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega, USA), líneas 1-5: bacterias aisladas de suelo, líneas 6-9: bacterias aisladas de semilla, (-): control negativo.

El análisis filogenético permitió identificar las especies de bacterias aisladas de suelo y las aisladas de semillas de maíz.

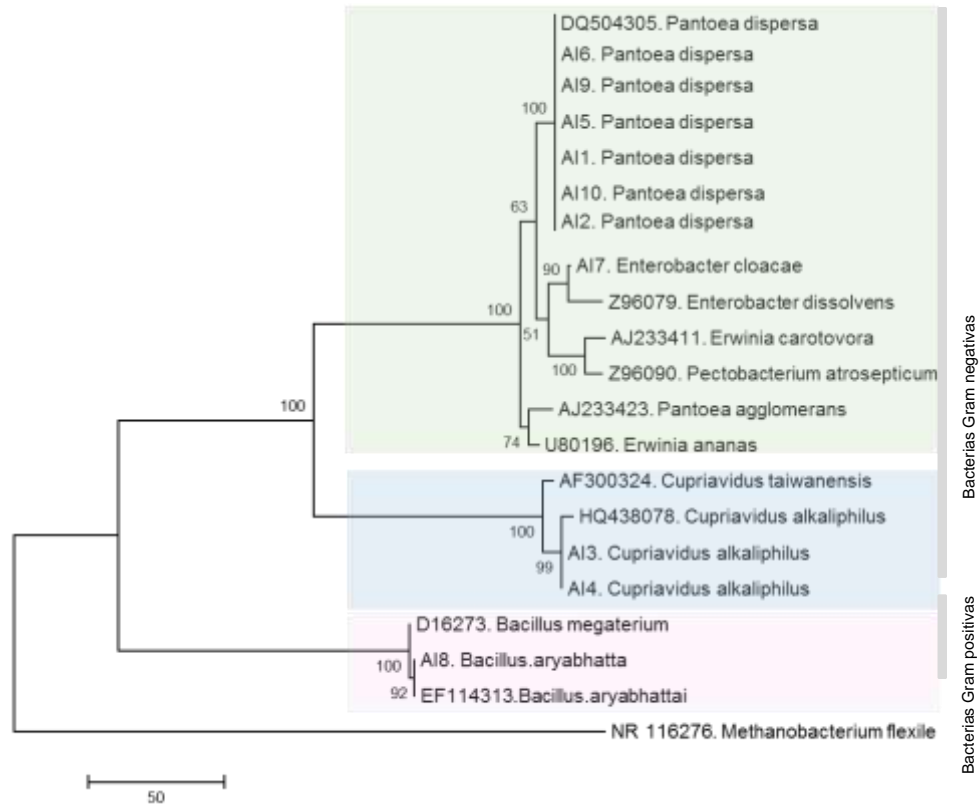


Figura 14. Análisis filogenético de los géneros bacterianos identificados en muestras de suelo y semilla de maíz. El árbol filogenético se realizó con el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 substituciones por sitio.

Con el análisis filogenético se pudo observar una incidencia de bacterias aisladas de suelo asociado al cultivo de maíz y aisladas de semillas de maíz. Bacterias del mismo género presentes en ambos orígenes. Con la identificación de las bacterias se pudo determinar la existencia de bacterias Gram negativas y positivas con la capacidad de degradar aflatoxina.

Cuadro 8. Identificación de los aislamientos obtenidos de suelo y semilla de maíz. El aislamiento SEAF12-004 fue identificado por separado.

Código	Aislamiento	Fuente	Identificación
.	SEAF12-004	Suelo	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>
AI-3	SEAF12-010	Suelo	<i>Cupriavidus alkaliphilus.</i>
AI-8	SEAF12-024	Suelo	<i>Bacillus megaterium</i>
AI-5	ES113-001	Semilla	<i>Pantoea dispersa</i>
AI-10	ES413-005	Semilla	<i>Erwinia sp.</i>
AI-2	ES713-008	Semilla	<i>Pantoea dispersa</i>
AI-9	ES713-009	Semilla	<i>Pantoea dispersa</i>
AI-4	ES913-012	Semilla	<i>Cupriavidus alkaliphilus.</i>
AI-6	ES913-013	Semilla	<i>Erwinia sp.</i>
AI-7	ES913-014	Semilla	<i>Enterobacter cloacae</i>
AI-1	ES1013-015	Semilla	<i>Erwinia sp.</i>

Pantoea sp., está asociada generalmente con plantas como epifitas o como endófitas. Ha sido aislada de diferentes nichos ecológicos, incluyendo plantas, agua, suelo, humanos y animales (Grimont *et al.*, 2005), *Enterobacter cloacae*, se ha identificado también como promotor de crecimiento de plantas de caña de azúcar (Mehnaz, 2010). *Cupriavidus alkaliphilus.*, es una bacteria Gram negativa con metabolismo oxidativo, perteneciente a la familia *Burkholderiaceae*, también ha sido encontrada en muestras de suelo (Vandamme y Coenye, 2004). *Cupriavidus taiwanensis*, forma nódulos en *Mimosa pudica* una planta de la subfamilia *Mimosoidae* como la mayoría de las bacterias del

genero *Rhizobium*, *C. taiwanensis* penetra la raíz a través de los pelos radicales, (Chen, 2003).

Todas las especies identificadas tienen un papel dentro del desarrollo de cultivos en relaciones simbióticas. De acuerdo a las características y condiciones en que podemos encontrar las bacterias identificadas puede ser un medio de asociación entre géneros bacterianos.

2.4 LITERATURA CITADA

- Chen W. M., E. K. James, A. R. Prescott, M. Kierans and J. I. Sprent (2003) Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 16:1051–1061.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits of phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fox G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. Tanner, L. Magrum, L.B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen and C. R. Woese (1980) The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209:457-463.
- Grimont P. A. D. and F. Grimont (2005) Genus *Pantoea*, In D. J. Brenner, N. R. Krieg, y J. T. Staley (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. *The Proteobacteria*. Springer- Verlag, New York. (pp 713–720).
- Hall T. A. (1999) Bio-Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and análisis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hillis D. M. and M. T. Dixon (1991) Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 6:411-453.

- Mc Cune B. and M. J. Mefford (1999) PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6. Oregon: *MjM Software Design*. (pp: 237).
- Mehnaz S., D. N. Baig and G. Lazarovits (2010) Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:1614-1623.
- Patel J. B. (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Journal of Molecular Diagnostics* 6:313–321.
- Saitou N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2013) MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6, using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Thompson J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Vandamme P. and T. Coenye (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:285–2289.
- Woese C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:4576–4579.
- Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational Biology* 7:203-214.

CAPÍTULO III

EFFECTOS DE AFLATOXINA B₁ Y *Cupriavidus alkaliphilus* EN LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE MAÍZ

3.1 INTRODUCCIÓN

En la industria de la producción de semillas, la germinación (%) es el parámetro más importante para evaluar la calidad fisiológica de los lotes de semillas, que puede ser comparado con la calidad de otros lotes y también estimar el valor de siembra en campo. Se considera que una semilla ha germinado cuando han surgido de su embrión, y se han desarrollado a partir de él, las estructuras esenciales que indican la capacidad de la semilla para producir una plántula normal en condiciones favorables (ISTA, 1976).

En el recuento en la prueba de germinación solo se toman en cuenta aquellas plántulas que tiene bien definidas y desarrolladas todas sus estructuras “plántulas normales” que le permitirán establecerse en campo. Los componentes de la calidad de semillas se separan en categorías donde se menciona la descripción, higiene y potencial de funcionamiento; en este último se toma en cuenta el vigor y la germinación (Hampton, 2002). La prueba de velocidad de emergencia propuesta por Maguire, en donde se cuenta el número de días en que emergieron las plántulas, permite obtener mejores estimadores de vigor de las plántulas (Maguire, 1962).

Uno de los factores que influyen en la germinación es la contaminación con micotoxinas, el cual tiene efectos negativos r de gran impacto para la calidad fisiológica de la semilla. La cumarina ha sido ampliamente reconocida como un inhibidor de la germinación (Sigmund, 1914) y es de especial interés debido a su eficacia en bajas concentraciones y su relación con los problemas de la sensibilidad a la luz de las semillas.

La molécula de aflatoxina contiene en su estructura un anillo insaturado de lactona postulado, que es necesario para la actividad del tipo cumarina. El problema fundamental es que no se ha respondido plenamente si la estructura de lactona insaturada o la molécula no modificada de la cumarina es responsable de la acción inhibitoria en la germinación de semillas, en el alargamiento de radícula y parte aérea de plántulas de diferentes especies de cultivos.

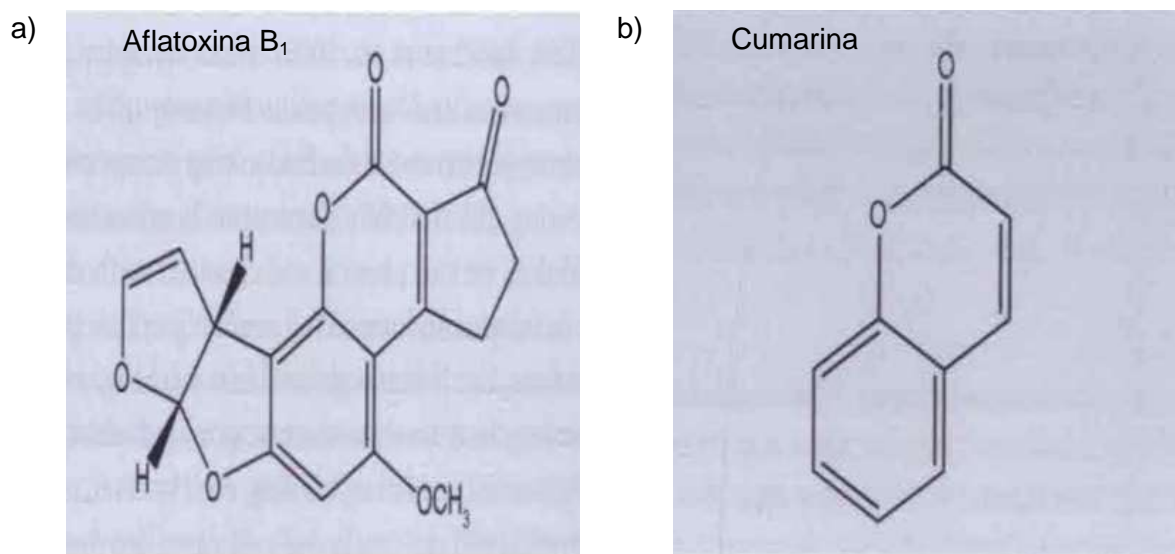


Figura 15. Estructura molecular de Aflatoxina B₁ y Cumarina. (Guan, 2011)

En *Lilium longiflorum* Aflatoxina B₁ tiene efectos inhibitorios en la germinación de granos de polen y el alargamiento del tubo polínico, la mezcla de diferentes micotoxinas disminuye el alargamiento de raíz y la germinación de semillas cacahuate, maíz, cebada y avena (Dashek, 1981).

Para el caso de maíz las pérdidas en germinación puede ser un indicativo de severos daños en la membrana celular causados por aflatoxina B₁ (Shirurkar *et al.*, 2012). En

Nicotiana tabacum el desarrollo de las hojas se ve inhibido por la presencia de AFB₁, demostrando así los efectos fitotóxicos de la toxina (McLean *et al.*, 1995).

También se ha reportado que la aflatoxina inhibe al 100% la germinación de semillas de *Lepidium sativum* (Schoental y White 1965). Así como la inhibición del alargamiento del hipocótilo y radícula en esta misma especie (Reiss, 1971).

Los procesos fisiológicos de semillas de *Vigna radiata* (variedad Pusa Baishaki) son afectados por diferentes concentraciones de aflatoxina B₁, lo que se manifiesta por inhibición de la germinación, crecimiento de la plántula, síntesis de clorofila, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Sinha, 1990).

En la presente investigación se cuantificó el efecto de la aflatoxina B₁ y la degradación de esta aflatoxina por bacterias, en la calidad fisiológica de la semilla de ocho genotipos de maíz

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material biológico

Ocho genotipos de maíz (Cuadro 9) se sometieron a tratamientos con AFB₁, y con aislados de bacterias con capacidad de degradar AFB₁; se seleccionó solo una bacteria identificada como SEAF12-010, misma que en el análisis filogenético se identificó como *Cupriavidus alkaliphilus*, que fue obtenida de aislamientos de suelo y también se aisló semillas de maíz, como una bacteria endófito.

Cuadro 9. Genotipos de maíz del CIMMYT utilizados en las pruebas de calidad fisiológica.

Genotipo	Genealogía	Ambiente
1	CML247=(G24F119*G24F54)-6-4-1-1-BB-f)	Tropical
2	CML495=[P NVA. BCO.(S/D)xNPH-28]F32-B-1-B-1-2-BBBBBB]	Tropical
3	CL-02510=P25C5HC246-3-1-BB-2-#-BBBBBBB	Tropical
4	CML155=Pob62c3HC163-2-1-3#-1-1-1-1-B-1-B-B-#	Tropical
5	DTPWC9-F115-1-2-1-2-B-B-B	Subtropical
6	P502c1F9-2-2-1-B-B-1-3-1-1-B-1-B-B-1-B-B-B-B	Subtropical
7	90[SPMATC4/P500(SELY)]#-B-4-2-B-B	Subtropical
8	DTPWC9-F67-2-2-1-B-B-B	Subtropical

3.2.2 Preparación de Aflatoxina B₁

Se diluyó Aflatoxina B₁ producida por *A. flavus* (Sigma, México) en metanol grado HPLC (JT BAKER), la concentración de la dilución se obtuvo mediante un espectrofotómetro de celda (BECKMAN COULTER D-530, USA) a 360 nm, al dato de OD obtenido se aplicó a la siguiente fórmula del coeficiente de extinción para aflatoxinas, $\mu\text{g/ml} = (A \times \text{p.m.} \times 1000 \times \text{F.C.})/e$; donde A = absorbancia, p.m = peso molecular, F.C. = factor de corrección, e = coeficiente de extinción, (AOAC, 2002).

3.2.3 Tratamientos para evaluar el efecto de Aflatoxina B₁ y *Cupriavidus alkaliphilus* en la calidad fisiológica de semillas de maíz

Los tratamientos utilizados fueron adaptados de varios autores (Dashek *et al.*, 1981), (Schoental y White 1965), (Reiss, 1971) y (Sinha, 1990), debido a que no hay una metodología estandarizada para la aplicación de tratamientos con AFB₁.

La semilla se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % y agua destilada, mediante lavado durante 10 min con agitación; posteriormente se enjuago tres veces con agua destilada estéril y finalmente se secó en toallas de papel. Para esto se utilizaron cuatro repeticiones de 25 semillas de cada genotipo. Se evaluó el efecto que tiene AFB₁ y *C. alkaliphilus*, sobre la calidad fisiológica de la semilla sometiendo cada genotipo a cuatro tratamientos: (1) Tratamiento CONTROL, la semilla tratada con agua destilada estéril durante 20 h a temperatura ambiente con agitación continua a 120 x g, (2) Tratamiento A, consistió en imbibir la semilla con una solución de toxina a concentración de 0.2 µg mL⁻¹10 h⁻¹, a temperatura ambiente y agitación continua a 120 x g. En seguida la semilla se retiró de esa solución y se lavó con agua destilada estéril, posteriormente se pasó a una suspensión de bacterias por 10 h, temperatura ambiente y agitación continua a 120 x g, (3) Tratamiento B, se imbibió la semilla primero con la suspensión de bacterias y segundo con la solución de AFB₁ bajo las mismas condiciones, por 10 h, temperatura ambiente y agitación continua a 120 x g, y (4) Tratamiento C, consistió en imbibir la semilla primeramente con agua y posteriormente se imbibió con la solución de AFB₁ combinada con la suspensión de bacterias, ambas etapas se realizaron por 10 h, temperatura ambiente y agitación continua.

Posteriormente a cada tratamiento se realizó una prueba de germinación basada en las reglas de ISTA (1976), en 4 repeticiones de 25 semillas, para los ocho genotipos con los

tratamientos descritos. Se evaluaron las variables germinación (%), longitud de plúmula, longitud de raíz e índice de velocidad de germinación, como se describen a continuación.

3.2.4 Prueba de germinación

Se realizó “entre papel” en 25 semillas distribuidas uniformemente a la mitad de la hoja de papel previamente humedecida con agua destilada, las que se cubrieron con otra toalla húmeda, se enrollaron en forma de taco y se colocaron en contenedores plásticos en un cuarto de germinación a 25°C por siete días. Después de siete días se contabilizó el número de plántulas normales y se estimó el resultado en porcentaje.

3.2.5 Longitud de plúmula y de raíz

Al 100% de las plántulas normales resultantes de la prueba de germinación se les midió la longitud del tallo (cm) desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la última hoja.

En esas mismas plántulas se midió la longitud de raíz en centímetros desde el cuello de la raíz hasta la punta de la misma.

3.2.6 Índice de velocidad de germinación

En la prueba de germinación se efectuaron conteos diarios del número de semillas germinadas, considerando como primer día aquel en el que se observó la primera semilla con emisión de radícula y el último día 7 días después del establecimiento del experimento;. El índice de velocidad de germinación se calculó mediante la ecuación propuesta por Maguire (1962).

$$IVG = \frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \frac{P_3}{T_3} + \dots + \frac{P_n}{T_n};$$

P_n = número de semillas germinadas en el n-ésimo día; T_n = tiempo en días para la germinación en el n-ésimo día; $P_1, P_2, P_3, \dots, P_n$ = número de semillas germinadas en el día 1, en el día 2, en el día 3 y en el día n; $T_1, T_2, T_3, \dots, T_n$ = número de días entre la siembra y el primer día 1 de germinación, entre el día 2, entre el día 3 y entre el día n.

3.2.7 Análisis de datos

Mediante el programa SAS versión 9.0 se realizó un Análisis de Varianza para los datos obtenidos y la prueba de comparación de medias Tukey ($p=0.05$).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Prueba de germinación

Los tres tratamientos con bacteria causaron un efecto significativo en la germinación de los genotipos 3, 7 y 8 (Cuadro 10). El tratamiento A redujo la germinación en 21, 22 y 15%, el tratamiento B en 15, 9 y 6%, y el tratamiento C en 13, 8 y 14%, para los genotipos 3, 7 y 8, respectivamente.

Esto debido posiblemente a la actividad que ejerce la bacteria sobre la aflatoxina o sobre la semilla, muchos de los procesos biológicos para degradar aflatoxina son procesos de adhesión en los cuales la toxina se adhiere a la pared celular de las bacterias o mediante degradación por enzimas (Ciegler *et al.*, 1966), podría tratarse de que estas enzimas contrarrestan el efecto de la aflatoxina B_1 , este podría ser un factor importante

para contrarrestar esos efectos negativos de la toxina sobre las semillas. En este trabajo de investigación se logró obtener aislamientos de *C. alkaliphillus* de suelo y lo que es aún mejor es que se ha obtenido como endófito de semillas de maíz, pero la habilidad de degradar AFB₁ es aún más sobresaliente. De acuerdo a los resultados que se presentan en el Cuadro 10, los genotipos 3, 7 y 8 son los que presentaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación respecto al control, en el genotipo 3 y 8 no se logró aislar e identificar bacterias endófitas capaces de degradar AFB₁, para el genotipo 7 se aisló solo una bacteria con esta capacidad degradadora y puede tratarse que esta capacidad solo se identifique en bajas concentraciones de AFB₁. Al incluir *C. alkaliphilus* en los tratamientos se buscó demostrar los efectos positivos que esta bacteria ejercía sobre la concentración de AFB₁, cabe destacar que el tratamiento A fue el que tuvo una mayor disminución en la germinación, esto puede deberse a que se deja actuar primero a la toxina sin alguna medida previa para su disminución y en el tratamiento B y C primero se adicionó la bacteria y se dejó actuar antes y en combinación con la toxina. De esta forma se demostró la actividad degradadora de AFB₁ que posee *C. alkaliphilus*. Bacterias del género *Cupriavidus* son asociadas a procesos benéficos en suelos, muchos aislamientos de *Cupriavidus* se han obtenido de la rizosfera de cultivos como el maíz, caña de azúcar, sorgo y plantas de agave, en el caso de *C. alkaliphilus* es una bacteria asociada a suelos agrícolas alcalinos, (Estrada de los Santos *et al.*, 2012) *C. taiwanensis* está asociada con la formación de nódulos en plantas de leguminosas (Marchetti *et al.*, 2011), *C. pampae* como una bacteria que degrada herbicidas y que se encuentra en muestras de suelos agrícolas de forraje como la alfalfa, (Cuadrado *et al.*, 2010) *C. metalidurans* (Monchy *et al.*, 2007), asociada con la remediación de suelos y por encontrarse en hábitats con concentraciones milimolares de metales pesados, *C. basilensis* y la degradación de Ocratoxina A, otra micotoxina que también es producida por *Aspergillus* (Ferenczi *et al.*, 2014). Como podemos observar este género de bacteria que solamente comprende 13

especies distintas ha demostrado ser de gran importancia en la agricultura. Queda aún mucho por estudiar y determinar los mecanismos que llevan a este género de bacterias a tener una actividad bacteriana efectiva y aplicable en muchos procesos naturales.

Cuadro 10. Efecto de tratamientos de Aflatoxina B₁ y *Cupriavidus alkaliphilus*. En la germinación de ocho genotipos de maíz.

GENOTIPO	CONTROL	TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B	TRATAMIENTO C
1	67 a	62 a	65 a	52 a
2	86 a	72 a	86 a	81 a
3	87 a	66 b	72 ab	74 ab
4	83 a	74 a	68 a	81 a
5	95 a	91 a	93 a	96 a
6	56 a	41 a	49 a	50 a
7	79 a	57 b	70 ab	71 ab
8	92 a	77 b	88 ab	78 b

Tratamientos con la misma letra en hileras no presentan diferencias significativas (Tukey, 0.05).

3.3.2 Longitud de plúmula y de raíz

Los tres tratamientos mostraron efectos significativos en el genotipo 3 (Cuadro 11), reduciendo la longitud de plúmula, y en el genotipo 4 (Cuadro 12), reduciendo la longitud de raíz, de esta forma se demuestran los efectos fitotóxicos de la aflatoxina en el desarrollo de las plántulas. La bacteria demostró contrarrestar los efectos negativos de la

aflatoxina en algunos genotipos y esto puede deberse a procesos que pueden identificarse a nivel molecular o enzimático. El genotipo puede considerarse como un factor determinante en los efectos que la aflatoxina o la bacteria pudieran ejercer sobre la calidad fisiológica de la semilla. Algunos autores han reportado los efectos negativos de AFB₁ en la germinación, y en la respiración bloqueando la síntesis de α -amilasa esta inhibición puede ser estudiada a nivel molecular en la síntesis de RNA (Misra *et al.*, 1980).

Cuadro 11. Efecto de tratamientos de Aflatoxina B₁ y *Cupriavidus alkaliphilus*, en la longitud de plúmula.

GENOTIPO	CONTROL	TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B	TRATAMIENTO C
1	6.944 a	7.643 a	7.936 a	6.800 a
2	9.165 a	7.940 ab	9.081 a	7.495 b
3	9.780 a	8.030 b	8.135 b	7.322 b
4	10.391 a	9.341 a	9.895 a	9.096 a
5	10.481 a	10.478 a	10.813 a	11.216 a
6	8.674 b	9.237 b	10.696 a	9.237 b
7	9.518 a	7.911 b	8.559 ab	8.345 ab
8	10.826 a	10.473 a	11.060 a	9.916 a

Tratamientos con la misma letra en hileras no presentan diferencias significativas. (Tukey 0.05).

Cuadro 12. Efecto de Aflatoxina B₁ y *Cupriavidus alkaliphilus*, en la longitud de raíz.

GENOTIPO	CONTROL	TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B	TRATAMIENTO C
1	9.437 a	9.719 a	11.961 a	10.149 a
2	13.608 a	13.970 a	15.471 a	13.006 a
3	10.488 a	12.174 a	10.895 a	10.645 a
4	15.699 a	12.593 b	12.602 b	13.050 b
5	17.565 a	16.097 ab	14.860 b	15.230 b
6	14.032 b	17.953 a	18.959 a	15.429 b
7	13.211 a	13.558 a	13.357 a	13.553 a
8	16.877 a	15.182 ab	16.487 a	13.414 b

Tratamientos con la misma letra en hileras no presentan diferencias significativas. (Tukey 0.05).

3.3.3 Índice de velocidad de germinación

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo en los genotipos 3 y 4, esto se debió a los efectos de la aflatoxina, posiblemente debidos a su intervención en la movilización de reservas de la semilla o a algún otro proceso importante que se encuentre involucrado en el proceso de germinación. Como ya se mencionó anteriormente AFB₁ tiene efectos negativos en el desarrollo de las plántulas de diferentes cultivos.

En esta investigación se ha dado un enfoque diferente con la utilización de un control biológico para mitigar los efectos negativos que AFB₁ tiene sobre las semillas. Aun así se observaron efectos negativos en las variables antes mencionadas. La relación entre la concentración de AFB₁ y el porcentaje de germinación fue más sobresaliente. Cabe

mencionar que la severidad de los efectos negativos depende de la intensidad de la exposición, la concentración y posibles efectos de sinergia con otras sustancias propias del individuo. Los tratamientos combinaron AFB₁ y una bacteria con capacidad de degradarla, en su estructura química AFB₁ presenta cumarina un compuesto que puede servir de fuente de carbono para el crecimiento bacteriano y mismo compuesto que se cree ejerce efectos negativos sobre la calidad fisiológica de las semillas actuando como un inhibidor de la germinación, al tener una fuente de carbono disponible la bacteria pudo consumirla y esta puede ser la posible causa de que no se hayan expresado los efectos negativos de la AFB₁ en la calidad fisiológica de las semillas.

Cuadro 13. Efecto tratamientos de Aflatoxina B₁ y *Cupriavidus alkaliphilus.*, en el índice de velocidad de germinación.

GENOTIPO	CONTROL	TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B	TRATAMEINTO C
1	18.238 a	13.750 b	14.511 ab	14.154 ab
2	20.083 a	16.279 ab	19.675 a	14.827 b
3	22.042 a	12.359 c	18.684 b	14.286 c
4	22.395 a	17.583 b	17.479 b	19.208 b
5	23.500 a	24.000 a	23.750 a	24.208 a
6	14.771 a	9.625 b	12.542 ab	9.646 b
7	17.946 a	11.193 b	14.182 ab	11.559 b
8	22.208 a	18.078 b	20.833 ab	19.544 ab

Tratamientos con la misma letra en hileras no presentan diferencias significativas. (Tukey 0.05).

3.4 LITERATURA CITADA

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2002) Official Methods of Analysis of the AOAC. 17th ed. Horwitz, W.(Ed.). Arlington, USA.
- Ciegler A., E. B. Lillehoj, R. E. Peterson and H. H. Hall (1966) Microbial Detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology* 14:934-939.
- Cuadrado V., M. Gomila, L. Merini, A. M. Giulietty , E. R. B. Moore (2010) *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium aisolated from agricultural soil. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2606-2612.
- Dasheck W. V., R. L. Harman, L. B. Adlestein, W. A. Morton, B. M. Rapisarda, J. C. Chancey and G. C. Llewellyn (1981) Use of *Lilium longiflorum*, cv. Ace pollen germination and tube elongation as a bioassay for the hepatocarcinogens aflatoxins. *Enviromental Health Perspectives* 40:267-278.
- Estrada-de los Santos P., L. Martínez-Aguilar, I. M. López-Lara and J. Caballero-Mellado (2012) *Cupriavidus Alkaliphilus* sp. nov., a new species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. *Systematic and Applied Microbiology* 35:310-314.
- Ferenczi S., M. Cserhádi, C. Krifaton, S. Szoboszlay, J. Kukolya, Z. Szoke, B. Koszegi, M. Albert, T. Barna, M. Mézes, K. J. Kovács (2014) A new Ochratoxin A biodegradation strategy using *Cupriavidus basilensis* Or16 strain. PLoS ONE 9(10): e109817. doi:10.1371/journal.pone.0109817.
- Hampton J.G. (2002) What is seed quality?. *Seed Science and Technology* 30:1-10.
- ISTA, International Seed Testing Association (1976) International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 4:3-177.

- Maguire J. D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergences and vigor. *Crop Science* 2:176-177.
- Marchetti M., O. Catrice, J. Batut and C. Masson-Boivin (2011) *Cupriavidus taiwanensis* Bacteroids in *Mimosa pudica* Indeterminate Nodules Are Not Terminally Differentiated. *Applied and Environmental Microbiology* 77:2161-2164.
- McLean M., M. P. Watt, P. Berjak and F. Dutton (1995) Aflatoxin B₁ its effects on an *in vitro* plant system. *Food Additives and Contaminants* 12:435-443.
- Misra R.S. and R. K. Tripathi (1980) Effect of aflatoxin B₁ on germination, respiration and α -amylase in maize. *Journal of Plant Diseases and Protection* 87:155-160.
- Monchy S., M. A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. van der Lelie and M. Mergeay (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 189:7417-7425.
- Reiss J. (1971) Hemmung der Keimung der Kresse (*Lepidium sativum*) durch Aflatoxin B, und Rubratoxin. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 162:363-367.
- Schoental R. and A. F. White (1965) Aflatoxin and albinism in plants. *Nature* 205:57-58.
- Shina K. K. and P. Kumari (1990) Some physiological abnormalities induced by aflatoxin B₁ in mug seeds (*Vigna radiata* variety Pusa Baishakhi). *Mycopathology* 110:77-79.
- Shirurkar D. D. and N. K. Wahegaonkar (2012) Effect of aflatoxin on germination seedling growth. *Archives of Applied Sciences Research* 4:2441-2446.
- Sigmund W. (1914) Über die Einwirkung von stoffwechselprodukten auf die Pflazen. *Biochem Zeit* 62:229-386.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES GENERALES

Se logró identificar especies de bacterias con capacidad degradadora de AFB₁, las cuales se encuentra asociadas a los cultivos de maíz, en consecuencia el control biológico es una de las estrategias más prometedoras para el control de contaminación por aflatoxinas y otras micotoxinas, por ser efectivo, amigable con el ambiente y lo más importante las fuentes están disponibles de forma natural.

Como aparece durante el desarrollo de la presente investigación es de suma importancia darle cabida en investigaciones sobre producción de semillas al tema de las micotoxinas debido a que estos metabolitos se encuentran asociados a problemas de salud en humanos, animales y como se pudo concluir también en semillas y sus procesos metabólicos.

Cabe mencionar que aún hace falta estudiar más a fondo, como influye la aflatoxina en los procesos enzimáticos y de activación de reservas durante el proceso de germinación. Al hacer este tipo de investigaciones se puede llegar a concluir de una mejor manera que parte de la molécula de AFB₁ es más activa para influir en estos procesos, debido a que aún no se conoce si el anillo de lactona o la cumarina producen estos efectos negativos en la calidad fisiológica de semillas de diferentes cultivos importantes como el maíz.