



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y FILOGENÉTICA DE BACTERIAS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Brachiaria* spp.

ARACELI ZUGEY SAN AGUSTÍN HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

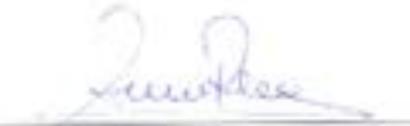
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada “**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y FILOGENÉTICA DE BACTERIAS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Brachiaria* spp.**” realizada por la alumna **ARACELI ZUGEY SAN AGUSTÍN HERNÁNDEZ**, bajo la dirección del consejo particular indicado abajo, 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 V. SILVA ROJAS

ASESOR: 
DR. LEOPOLDO E. MENDOZA ONOFRE

ASESOR: 
DR. NICACIO CRUZ HUERTA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2017

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y FILOGENÉTICA DE BACTERIAS PRESENTES EN SEMILLAS DE *Brachiaria* sp.

Araceli Zugey San Agustín Hernández, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Las bacterias presentes en las semillas de brachiarias (*Brachiaria* spp.) influyen en el porcentaje de germinación y viabilidad, el objetivo de este trabajo fue identificar filogenéticamente y morfológicamente las poblaciones de bacterias presentes en semillas de *Brachiaria* spp. Se analizaron diez genotipos de semillas del género de *Brachiaria* sp., ocho procedentes de México (*B. decumbens* cv 'Señal', Mulato II, *B. decumbens* cv 'Cayman', DRWN8A, JMLS010J, Mulato II, Papalotla, LN56 y DRWN69) y dos procedentes de Brasil (*B. brizantha* cv 'Marandú', *B. brizantha* cv 'Insurgentes'). Se aislaron y purificaron las bacterias en medio B de King para extraer el DNA. Se amplificó el gen 16S rDNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se obtuvieron cuarenta y siete aislamientos incluidos en los géneros de importancia de trece géneros diferentes de bacterias.

Palabras claves: gramínea, genotipo, PCR, Procariota, semilla

**MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION AND PHYLOGENETICS OF BACTERIA
PRESENT IN SEEDS OF *Brachiaria* sp.**

**Araceli Zuguey San Agustín Hernández, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2017**

ABSTRACT

Percentage of germination the seeds of *Brachiaria* was influenced by bacterial population in the seeds. Our objective was to identify phylogenetically and morphologically the populations of bacteria present in *Brachiaria* spp. seeds. We analyzed ten seed genotypes of *Brachiarias* seed, eight of them came from Mexico (*B. decumbens* cv 'Señal', Mulato II, *B. decumbens* cv 'Cayman', DRWN8A, JMLS010J, Mulato II, Papalotla, LN56 y DRWN69,) and two provinces of Brazil (*B. brizantha* cv 'Marandú', *B. brizantha* cv 'Insurgentes'). Bacteria were isolated and purified in to B of King, to extract the DNA and the 16S gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). Forty-seven isolates of phytosanitary importance were obtained from thirteen different genera of bacteria.

Keywords: genotype, graminea, prokaryote, PCR, seed

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de formarme como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el financiamiento necesario para cursar los estudios de Maestría.

A la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Rural y Alimentación (SAGARPA) por el apoyo recibido en el transcurso de los estudios.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por su apoyo y dirección como consejera de esta tesis.

Al Dr. Leopoldo Ernesto Mendoza Onofre por su apoyo y consejos como asesor de esta tesis.

Al Dr. Nicasio Cruz Huerta por su apoyo y consejos como asesor de esta tesis.

Al MC. Adrián Hernández Livera por su apoyo y asesoría técnica.

Al Dr. Adrián Raymundo Quero Carrillo por su apoyo y documentación prestada.

Al Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) por la atención y donación de semillas de *Brachiaria* sp.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por su valiosa cooperación en los análisis de irradiación.

Al laboratorio de diagnóstico de SENASICA por el uso de sus instalaciones.

Al Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP), Producción de Semillas del Colegio de Postgraduados.

Al Laboratorio de Análisis de Semillas del PREGEP, Producción de Semillas del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones.

A semillas Papalotla por su cooperación con la donación de muestras de semillas de *Brachiaria* sp.

A Semillas de Iguala Guerrero por su gentil atención y donación de semillas.

A Alfredo, Alfredo Jr., Ángel y Arturo por su fortaleza, comprensión y apoyo.

A los compañeros de laboratorio, de generación, personal docente, al personal administrativo por su colaboración durante mi estancia en este periodo de estudio de maestría.

DEDICATORIA

A mi familia con cariño y respeto por ser el pilar de mi vida, una fuente inagotable de fortaleza, valor y entrega, mi inspiración y consuelo en todo momento de mi vida profesional y personal.

A los buenos amigos que siempre me alentaron a seguir y alcanzar la meta.

A mis profesores que han confiado su conocimiento y experiencia en mí.

A todas las personas que contribuyen en mi superación y crecimiento.

CONTENIDO	Pág.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Justificación	6
1.2 Planteamiento del problema	10
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo general	10
1.3.2 Objetivos específicos	10
1.4 Hipótesis	11
CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1 Origen y distribución de las <i>Brachiaria</i> spp.	13
2.2 Taxonomía del cultivo	13
2.3 Importancia del cultivo	14
2.3.1 Importancia mundial	14
2.3.2 Importancia nacional	15
2.4 Principales enfermedades del cultivo	17
2.4.1 A nivel mundial	17
2.4.2 A nivel nacional	16
2.5 Aspectos importantes en la germinación	18
2.5.1 Características del muestreo de semillas	21

2.5.2 Imbibición de la semilla en agua	21
2.6 Literatura citada	23
CAPÍTULO III. GERMINACIÓN Y VIABILIDAD DE SEMILLAS DE <i>Brachiaria</i> spp.	25
Resumen	26
Abstract	27
3.1 Introducción	28
3.2 Materiales y Métodos	29
3.2.1 Pruebas de viabilidad	29
3.2.2 Pruebas de germinación	34
3.3 Resultados	38
3.4 Conclusiones	44
3.5 Literatura citada	45
CAPÍTULO IV. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN SEMILLAS DE <i>Brachiaria</i> spp.	48
Resumen	49
Abstract	50
4.1 Introducción	51
4.2 Materiales y Métodos	53
4.2.1 Material genético	54
4.2.2 Obtención de Aislamientos	52
4.2.3 Extracción de DNA de bacterias	54
4.2.4 Amplificación del 16S rDNA por PCR	55
4.2.5 Secuenciación	56
4.2.6 Análisis de secuencias	57

4.2.7	Construcción del árbol filogenético	57
4.3	Resultados	58
4.3.1	Aislamientos obtenidos	60
4.3.2	Amplificación por PCR y secuenciación	60
4.4	Análisis filogenético	61
5.0	Conclusiones	69
6.0	Literatura citada	70

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO III		Pág.
CUADRO 1.	Cultivares de <i>Brachiaria</i> spp. empleados en el estudio de germinación y viabilidad.	30
CUADRO 2.	Análisis de varianza a los 14 días de germinación.	38
CUADRO 3.	Análisis de varianza a los 21 días de germinación.	39
CUADRO 4.	Prueba de medias para la variable germinación de semillas de <i>Brachiaria</i> spp.	40
CAPÍTULO IV		
CUADRO 1.	Cultivares de <i>Brachiaria</i> sp. utilizados para identificar las especies de bacterias endófitas mediante PCR.	58
CUADRO 2.	Características morfológicas y fisiológicas de bacterias aisladas de semillas de <i>Brachiaria</i> spp.	59
CUADRO 3.	Relación de bacterias aisladas de semillas de los cultivares de <i>Brachiaria</i> spp.	62
CUADRO 4.	Géneros de bacterias aisladas en semilla de dos especies de <i>Brachiaria</i> procedente de Brasil y México.	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO III	
FIGURA 1. a) Distribución de semilla en caja de Petri, b) Cajas de Petri con semillas sobre papel húmedo de cada cultivar.	31
FIGURA 2. Disposición de las cajas de Petri en cámara de germinación.	32
FIGURA 3. Semillas de <i>Brachiaria</i> spp. germinadas a los: a) 14 días y b) 21 días.	33
FIGURA 4. Lavado y desinfección de semillas de <i>Brachiaria</i> spp.	34
FIGURA 5. Imbibición de la semilla de <i>Brachiaria</i> spp. en agua destilada estéril.	35
FIGURA 6. Semillas de <i>Brachiaria</i> spp. disectadas longitudinalmente para su inspección.	36
FIGURA 7. Acercamiento del corte longitudinal de una semilla de <i>Brachiaria</i> spp. exponiendo la tinción con tetrazolio (color rojo) en los tejidos vivos.	37
FIGURA 8. Germinación de semilla de 10 genotipos de <i>Brachiaria</i> spp. a los 21 días.	41
FIGURA 9. Porcentaje de semillas viables y no viables evaluadas con la prueba de tetrazolio de 10 cultivares de <i>Brachiaria</i> spp.	42

CAPÍTULO IV

	Pág.
FIGURA 1. Colonias bacterianas de 5 días crecidas sobre medio B de King a partir de semillas desinfestadas de <i>Brachiaria</i> spp.	58
FIGURA 2. Obtención de cultivos puros de 72 horas después de haber sido transferidas por el método de estría cruzada.	60
FIGURA 3. Amplificación del 16S rDNA por medio de PCR de bacterias aisladas de semillas desinfestadas de <i>Brachiaria</i> spp. (Carriles 1-24), (-) Control negativo. MP=marcador de peso molecular de 1Kb.	61
FIGURA 4. Frecuencias de la presencia de taxas bacterianas en los cultivares de <i>Brachiaria</i> spp. aislados de semilla desinfestada.	66
FIGURA 5. Árbol filogenético construido con secuencias parciales del 16S rDNA, se usó inferencia bayesiana con 1 M de generaciones.	67
FIGURA 6. Identificación de taxas bacteriales aisladas en cultivares de <i>Brachiaria</i> spp.	68

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Brachiaria* spp. es una de las Poaceas (gramíneas) originario de África, incluye más de 100 especies, con un potencial económico y nutrimental importante para la ganadería sustentable de América Latina tropical y el mundo constituyendo una importante fuente de generación de empleo y alimento para todos los estratos sociales (Holmann *et al.*, 2004).

Este género se ha introducido también en climas semiáridos y terrenos accidentados por su rápido desarrollo y pocos requerimientos agronómicos (Martínez, 2008).

Centro y Sudamérica han desarrollado algunas especies utilizadas en el trópico húmedo y el trópico seco para la alimentación de ganado (CIAT, 2003). El pasto *Brachiaria* sp. Es recomendado por sus características restauradoras del suelo al entrar en asociación con microorganismos fijadores de nitrógeno (Guiot, 2001).

Durante el periodo del RIEPT (Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales) el cual fue de 1976-1996 se liberaron 11 variedades de gramíneas en su mayoría del género *Brachiaria* (CIAT, 2003). Mismas que actualmente domina el mercado con el 90% en Nicaragua, el 85% en Costa Rica y el 97% en Panamá, el 84% de ventas en Honduras y México, durante los últimos años (Adamoswski *et al.*, 2008; Miles *et al.*, 2004).

Las especies más cultivadas son: *B. brizantha* (A. Rich) Stapf cv. Insurgente, *B. decumbens* Stapf cv. Chontalp y *B. humidicola* (Rendle) Schweick cv. Chetuma con

12.5% en Honduras, 1.0% en Nicaragua, 18.7% en Costa Rica y el 0.1% en Panamá. En México se siembran alrededor de 2.6 millones de ha con pastos perennes, de los que son sembrados con *Brachiaria* sp. (FAO, 2006; Martínez, 2008).

En cuanto a volúmenes de producción de semilla se desconoce con exactitud los niveles producidos en nuestro país, sin embargo México reporta del año 2000 al 2006 la importación de semilla de este género y la superficie sembrada han tenido una tasa anual de crecimiento del 32%. Del año 2005 al 2006 el mercado mexicano demandó 2100 toneladas de semillas de pastos, de las cuales 70% correspondieron a *Brachiaria* sp. (Holmann *et al.*, 2004).

Los procesos de adopción de tecnologías y el establecimiento de nuevas pasturas es una decisión de largo plazo que implica considerar diversos factores de riesgos biológicos y económicos (Rivas, 1996).

En estudios realizados para determinar los daños causados por plagas y enfermedades en *Brachiaria* se han concentrado en el comportamiento de las plantas con dependencia al grado de infección de los patógenos. Muchos autores coinciden en que este no es un grave problema debido a que las especies son resistentes al ataque de enfermedades (Holmann, 2004).

En los procesos de adopción de tecnologías y el establecimiento de nuevas pasturas no solo se deben considerar las plagas y enfermedades que afectan directamente al cultivo, se debe considerar los hospedantes alternos, sobre todo cuando son plantaciones en sistemas sustentables, combinación de cultivos o labranza cero, ya que una vez establecido un patógeno es muy difícil de erradicar y

su manejo o control genera incremento en los gastos de producción y en otras ocasiones grandes pérdidas en el rendimiento (Valle and Savidan,1996).

También es importante conocer la taxas bacterianas que hospeda la semilla para determinar si aportan algún beneficio al cultivo, ya que existen aislamientos que actúan como fijadoras de nitrógeno, mejoradoras del suelo o proporcionan control biológico contra alguna plaga (Argel, 2007).

Además, la semilla debe cumplir con los atributos establecidos para determinar su calidad, estos atributos son evaluados desde el punto de vista físico, genético, fisiológico y fitosanitario. La calidad fisiológica puede determinarse mediante pruebas que evalúan la viabilidad, para predecir la germinación de la semilla y la emergencia de plántulas en el suelo (Taylor and Francis, 2009). Para mantener la viabilidad es necesario prevenir daños de insectos, patógenos, sobrecalentamiento, deshidratación, oxidación y reducir al mínimo el deterioro durante el almacenamiento (Andrade and Ferguson, 1988; Hopkinson, 1998).

Los patógenos bacterianos, así como los insectos son los principales agentes que provocan deterioro de las semillas, ya que están presente infestándolas o infectándolas, generando un bajo porcentaje de germinación y viabilidad. También se incrementa el deterioro físico por lo que, es importante conocer la interacción que existe entre patógeno y hospedante, ya que los patógenos que infectan a la semilla son difíciles de identificar y por lo tanto controlar una vez establecidos en el interior de la semilla (Torres-Gonzales and Morton, 2005).

En las últimas décadas la aplicación de técnicas microbiológicas convencionales ha proporcionado una aceptable idea del tipo de microorganismos presentes en las

semillas deterioradas, la presencia de un microorganismo sobre un material deteriorado no implica necesariamente que éste haya causado el daño observado (Silva, 1992).

Estos microorganismos eran difíciles de aislar y si ello se conseguía, en su mayor parte, no podían ser identificados con exactitud. Una segunda estrategia a seguir en el estudio de comunidades microbianas, es el uso de técnicas moleculares. La biología molecular se introdujo a principios de los años 1990 para estudiar la diversidad microbiana en diferentes hábitats (Ward *et al.*, 1990; Amman, 1995).

Mediante la nueva tecnología del DNA y RNA es posible identificar especies microbianas existentes en distintas muestras sin necesidad de realizar cultivos previos.

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, es posible dar adecuada respuesta a muchos de los interrogantes que sobre ecología microbiana de semillas se planteaban en el pasado (Torres-Gonzales and Morton, 2005).

Estas técnicas, aplicadas al estudio de las comunidades bacterianas de semillas, han ampliado el número de géneros bacterianos identificados y catalogados como posibles patógenos (Meléndez, 2003).

Con los avances tecnológicos en materia molecular la identificación de los microorganismos es segura y rápida.

En México estas técnicas moleculares se están adoptando rápidamente lo que ha permitido su fácil acceso y la reducción en su costo. La aplicación de métodos moleculares, especialmente la amplificación del DNA que codifica para el RNA

ribosómico 16S, permite el estudio de las comunidades bacterianas no cultivables y las cultivables (Torres-Gonzales and Morton, 2005b).

En la actualidad aproximadamente el 90% de las plantas cultivadas son propagadas por semillas y éstas en muchas ocasiones no tienen las condiciones óptimas de calidad fitosanitaria, debido a la presencia de patógenos, los que pueden desarrollarse sobre o dentro de ellas. Las semillas se consideran la fuente más importante para la perpetuación de microorganismos; además, permanecen más tiempo viable en las semillas que en el suelo o en residuos de cosecha.

Su estrecha relación con la semilla favorece las infecciones primarias tempranas. Por tal motivo es una necesidad realizar estudios que determinen la fitosanidad de las semillas introducidas al país y distribuidas a los campos de producción (Navarrete-Maya *et al.*, 2014).

La información generada servirá para establecer programas que permitan evitar la dispersión de fitopatógenos, mitigando riesgos económicos en el agro-mexicano, así como alertar a las autoridades de las condiciones fitosanitarias de las semillas de *Brachiaria* spp. introducidas al país.

1.1 LITERATURA CITADA

Adamowski, E. V., Plaguiarini, M., and Borges, C. 2008. Meiotic behavior in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae:Panicea). *J. Gen.* 87:33-38.

Andrade, D. R. P., y Ferguson, J. E. 1983. La calidad de la semilla en el establecimiento de las pasturas. pp. 3-7. En: Red Internacional de evaluación de pastos Tropicales (RIEP) (eds.). Establecimiento y Renovación de Pasturas, Conceptos Experiencias y Enfoque de la Investigación. VI Reunión del Comité de Asesores de la RIEPT, CIAT, Cali Colombia.

Argel, P. J. 2007. Cultivar Mulato II (*Brachiaria* híbrido CIAT 36087): Gramínea de alta calidad y producción forrajera, resistente a salivazo y adaptada a suelos tropicales ácidos bien drenados. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 22p.

CIAT/Embrapa. 1998. Experiencias regionales con *Brachiaria*: Región de América tropical – Tierras bajas húmedas. pp. 226-243. In: Miles J. W., Valle C. B., Rao I. M., and Euclides V. P. B. (eds). *Brachiaria*: Biología, agronomía y Mejoramiento.

Guiot, J. D. 2001. Manual de actualización técnica. [cd-rom]. Semillas Papalotla,

FAOSTAT. (2006). Food Agriculture Organization Statistics. <http://apps.fao.org/page/collections/subset/agriculture>. (Marzo, 2010). México. 64 p.

- Holmann, F., Rivas, L., Ángel, P., y Pérez, E. 2004. Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria* en Centroamérica y México. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. Documento de Trabajo No. 197. p. 31.
- Hopkinson, J. M., de Souza, F. H. D., Diulgheroff, S., Ortiz, A., and Sanchez, M. 1996. Reproductive physiology, seed production, and seed quality of *Brachiaria*. pp. 124-140. In: *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. Miles, J., Maass, B. L., and do Valle, C. B. (eds.). Cali Colombia: CIAT/Brasilia:EMBRAPA.
- Martínez, M. D., Hernández-Garay, A., Enríquez, Q. J. F., Pérez, P. J., González, M. S. S., y Herrera-Haro, J. G. 2008. Producción de forraje y componentes del rendimiento de pasto *Brachiaria humidicola* CIAT 6133 con diferente manejo de defoliación. *Téc. Pec. Méx.* 46:427–438.
- Mendoza-Cruz, L., Hernández-Garay, A., Enríquez, J. F., Mendoza-Pedroza, S. I., Quero Carrillo, A. R., y Joaquín-Torres, B. M. 2008. Desempeño agronómico de genotipos de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt en el trópico húmedo de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 34:123 – 131.
- Meléndez, F. 2003. Evaluación agronómica de tres pastos bajo pastoreo en dos localidades del trópico mexicano. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México.
- Miles, J. W., y Valle, C. B. (eds.). 2004. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT- EMBRAPA Publicación CIAT N° 2.

- Miles, J. W. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Sc.* 239:S47.
- Navarrete-Maya, R., Aranda-Ocampo, S., Rodríguez-Mejía, M. L., Moya-Hernández, S. L. y González-Ochoa, M. G. 2014. Bacterias fitopatógenas en semillas: su detección y regulación. *Rev. Mex. Fitopatol.* 32:75-88.
- Rivas, L. 1996. Metodologías para evaluación de adopción e impacto de las pasturas mejoradas: el caso de adopción temprana de *Arachis pintoii* en Colombia. pp. 236-255. En: Lascano, C. y Holmann, F. (eds). *Conceptos y Metodologías de Investigación en Fincas con Sistemas de Producción de Doble Propósito*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali.
- Silva, A. P., de Lima, P. R., e Mochiutti, S. 1992. Desempenho agronomico de gramineas forrageiras em condições de Campo Cerrado do Amapá, Brasil. *Pasturas Trop.* 14:17.
- Torres-Gonzales, A. M., and Morton, C. M. 2005 Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urocloa* (Poaecaeae). *Mol. Phylogen. Evol.* 37:36-44.
- Valle, C. B. do, and Savidan, Y. H. 1996. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Briachiaria*. pp. 147-163. In: *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. Miles, J., Maass, B. L., and do Valle, C. B. (eds.). Cali Colombia: CIAT/Brasilia:EMBRAPA-CNPOC.

1.2 Planteamiento del problema

La semilla puede ser portadora de microorganismos patógenos con riesgo de introducción en zonas donde no han estado presentes, una vez establecidos la posibilidad de erradicación es muy baja, lo que conllevaría al productor establecer un sistema de manejo adecuado que permita mantener niveles de infección por debajo del umbral económico.

La concentración de fitopatógenos en semillas es muy baja de tal manera que no es posible detectarla por métodos convencionales. Por esta razón se considera importante utilizar métodos basados en DNA para identificar los fitopatógenos que se encuentran en la semilla y que pueden iniciar epidemias en condiciones ambientales favorables.

1.3 Objetivo

1.3.1 Objetivo general

Identificar morfológica y molecular las bacterias presentes en semilla de *Brachiaria* spp.

1.3.1 Objetivos específicos

- Identificar filogenéticamente las poblaciones de bacterias cultivadas presentes en semillas de *Brachiaria* spp.

- Conocer el impacto de las bacterias en la viabilidad y germinación de las semillas de *Brachiaria* spp.

1.4 Hipótesis

Las semillas de *Brachiaria* spp. son portadoras de bacterias que podrían representar un riesgo fitosanitario como fuente de infección primaria para el desarrollo de una epidemia en el campo.

Las bacterias presentes interfieren en la óptima germinación y viabilidad en semillas de *Brachiaria* spp.

CAPÍTULO II
REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución de *Brachiaria* spp.

Brachiaria spp. es una gramínea originaria de África, donde se conocen 56 especies (Ndikumana, 1985). Actualmente es un género formado por un poco más de 100 especies distribuido por todas las zonas tropicales del mundo, especialmente en Brasil, Colombia y Tailandia. Destacan las especies: *B. decumbens*, *B. brizantha* y *B. ruziziensis* (Gonzales and Morton, 2005).

Crece en diversos hábitats desde zonas semidesérticas hasta pantanos, siendo su ambiente típico la sabana. Estos pastos pasaron de ser una maleza a un importante cultivo por sus cualidades adaptativas con un mínimo de manejo y cuidados, por el desempeño que muestran como pasturas tropicales de alto valor nutrimental desplazando a los cultivos convencionales como el pasto estrella (*Cynodon* sp.) y el pasto Pangola (*Digitaria eriantha*) por mencionar algunos (Pérez *et al.*, 2002).

2.2 Taxonomía del cultivo

Inicialmente se describió a *Brachiaria* como una subdivisión de *Panicum* por Trinius en 1834, nueve años después Grisebach 1853 elevó la subdivisión a la de género. Este género está formado por un poco más de 100 especies, no existe algún estudio adecuado de *Brachiaria*, aunque se han clasificado sectorialmente en 1919 por Stapf para 56 especies africanas y Pilger en 1940 a nivel mundial para 50 especies (CIAT, 1998).

Actualmente se ha determinado que las semillas del género *Brachiaria* pertenece a la familia Gramineae, subfamilia Panicoideae, tribu *Paniceae* (NCBI, 2013). Representada por especies anuales y perenes (Renvoize *et al.*, 1998).

2.3 Importancia del cultivo

2.3.1 Importancia mundial

En los últimos años, las especies del género *Brachiaria* han sido muy importantes dentro de la extensa lista de forrajes cultivados en los trópicos húmedos, sub húmedos y secos a nivel mundial.

Especialmente en América central y América del sur, destacando Brasil con aproximadamente 50 millones de hectáreas sembradas con *Brachiaria*. Le sigue México, quien ha incrementado considerablemente los volúmenes de áreas de pastura establecidas de 18000 ha a 2'616,130 ha del 2003 a la fecha y la comercialización de semilla se elevó de 63 toneladas a 2,047 toneladas en el mismo periodo.

Para Centroamérica destaca Costa Rica con mayores volúmenes de áreas cubiertas y de comercialización de semilla seguida de Honduras, Nicaragua y Panamá (Holmann, 2004). Más del 80% corresponden a *B. decumbens* cv Basilisk y *B. brizantha* cv Marandu (Valle y Milles, 1994).

El área total sembrada con especies de *Brachiaria* en el año 2013 fueron, el 12.5% en Honduras, 1.0% en Nicaragua y Panamá, para México representa el 6.5% del total de pastos.

En cuanto a los porcentajes de comercialización de semilla la tasa anual de crecimiento se vio favorecida en el mismo periodo, con el siguiente comportamiento: 62% en Honduras, 54% en Panamá, 45% en Nicaragua, 39% Costa Rica y 32% para México (Adamowski *et al.*, 2008).

2.3.2 Importancia nacional

México representa el 14% de la zona tropical de América, las primeras introducciones de semillas mejoradas se efectuaron en la década de los 90's. Los primeros lotes de semillas llegaron vía aérea provenientes del estado de Sao Paulo, principalmente *B. decumbens* (Cochrane *et al.*, 1985).

Se tiene una extensión territorial nacional de 211.96 millones de ha de zona tropical ideal para el establecimiento de *Brachiaria* spp. (Sharma *et al.*, 1992).

No se tienen reportados los datos estadísticos de producción como forraje en México, hasta el momento la producción de semilla de este género es imperceptible en México (Meléndez, 2003).

Estas especies se establecieron rápidamente en un sector que estaba carente de pasturas de calidad, por lo que el mercado de *Brachiaris* se expandió con el transcurso de los años.

Actualmente el 60% de la superficie destinada a ganadería extensiva, se encuentra en los trópicos. El 80% de las especies forrajeras mejoradas cultivadas en el trópico mexicano son *Brachiarias* (Holmann y Rivas, 2004).

Este total de semillas, fueron importadas por 12 empresas mexicanas que a la fecha participan en el mercado de semillas de *Brachiaría* y *Panicum* (Torres-Gonzales and Morton, 2005b).

Los nuevos mercados de las semillas mejoradas de *Brachiaría* a partir del año 2000 correspondieron a Asia, en particular Tailandia, en donde se establecieron algunas áreas de producción. Este pasto está ocupando un nicho cada vez más amplio y más destacado en los sistemas de producción prevaletentes en el sudeste asiático. Para el caso de África, se comercializan principalmente en Angola y Zambia (FAOSTAT, 2004).

Para el año 2006, el mercado mexicano demandó un total de 2,100 toneladas de semillas de pasto, de las cuales el 70% correspondieron a *Brachiarias* (FAOSTAT, 2004; Holmann *et al.*, 2004).

En los últimos 20 años, se ha reunido una extensa colección de germoplasma de *Brachiaría*, de la cual se tiene un gran avance en las evaluaciones agronómicas, suficiente para tener una fuente de atributos deseables para el mejoramiento. (Holmann *et al.*, 2004).

Como resultado de estos trabajos, en los últimos años se han liberado más de 10 nuevos cultivares de *Brachiaría*, entre los que destacan: *B. decumbens* cv Basilisk, *B. humidicola* cv Llanero, *B. humidicola* cv Dyctioneura, *B. ruzizensis* cv

Ruzi, *B. brizantha* cv La Libertad, *B. brizantha* cv Marandú, *B. brizantha* cv Xaraes, *B. brizantha* cv Piatá, *B. humidicola* cv Tupi, *B. brizantha* cv Paiaguas (Peralta, 2004).

2.4 Principales enfermedades del cultivo

2.4.1 A nivel mundial

En estudios realizados para determinar los daños causados por plagas y enfermedades en *Brachiaria* se han concentrado en el comportamiento de las plantas con dependencia al grado de infección (Peralta, 2004).

Muchos autores coinciden en que este no es un grave problema debido a que las especies son resistentes al ataque de enfermedades (Holmann *et al.*, 2004).

Sin embargo, se ha determinado que la presencia de Ergot (*Claviceps* sp.) como un problema fitosanitario de importancia en Brasil, pero que no limita el desarrollo productivo de las praderas (Moreno *et al.*, 1996). En México se ha reportado la presencia de hongos como especie de forma aislada en plantaciones y el daño no ha sido considerado de importancia económica (Meléndez, 2003).

En países como Colombia han realizado estudios con 10 genotipos de *Brachiaria* para determinar la resistencia a *Rhizoctonia* spp., donde se determinó que un principal hospedero es *B. brizantha* y *B. decumbens* aunque presentaron resistencia a este (Álvarez, 2013).

En el norte de Tailandia se realizaron estudios de los géneros *Cochliobolus*, *Bipolaris* y *Curvularia* para establecer una reevaluación filogenética y taxonómica, debido a que se reportan como patógenos importantes en pastos (Poaceae) y de distribución mundial, entre ellos el género *Brachiaria* (Dimutus *et al.*, 2012).

Sin embargo, ninguno de ellos realizó pruebas para determinar los patógenos presentes en semilla sino, solo, cuando el cultivo ya está establecido. A la fecha no existe reporte de hongos, ni bacterias presentes en semillas de *Brachiaria* sp. dejando a un lado la importancia de la calidad fitosanitaria de la semilla siendo uno de los principales factores a analizar en la adopción de una nueva tecnología y establecimiento de cultivo (Mendez, 2007).

2.4.2 A nivel nacional

Se desconoce la transmisión de bacterias específicamente a través de la semilla de *Brachiaria*, sin embargo, en condiciones ambientales adecuadas de temperatura y humedad relativa se ha observado la presencia de síntomas bacterianos (Alvarez, 2013).

2.5 Aspectos importantes en la germinación

Peralta (2004) menciona que el proceso de germinación es una secuencia de eventos que dan como resultado la transformación de un embrión en estado quiescente hasta producir un plántula. Esta secuencia se divide en varios eventos:

2.5.1 Absorción de agua Imbibición

Es un fenómeno físico denominado difusión, y como tal, se da sí existe un gradiente de difusión. Se caracteriza por un aumento de volumen de la sustancia o cuerpo que embebe y está íntimamente relacionada con las propiedades de materiales coloidales.

Las partículas coloidales en la semilla forman una red miscelar, medianamente rígida, en la que cargas eléctricas de signos opuestos están orientadas en una manera definida. Cuando el agua penetra en la semilla, una fracción ocupa los espacios libres y otra se une químicamente a las sustancias de que están compuestas las semillas.

El volumen de las semillas aumenta con la imbibición, pero el volumen final del sistema (semilla + agua) es menor que la suma de los volúmenes individuales iniciales de semillas y agua; esta contracción del sistema es prueba de la ocupación de los espacios libres dentro de la semilla y de la absorción de agua en la matriz coloidal (Miles *et al.*, 1996).

La tasa de imbibición se ve afectada por varios factores que pueden determinar la respuesta a germinación de las semillas. La permeabilidad de la cubierta seminal de semillas cuyas cubiertas son totalmente impermeables al agua, e.g. semillas duras de leguminosas, de algodón. Sin embargo, también se dan ejemplos en que la penetración de agua es restringida y no impedida (Valle and Savidan, 1996).

En general, la imbibición es más rápida cuando la semilla está en contacto con agua pura que cuando el agua contiene solutos. El principio que opera es el de

presión de difusión del agua, las semillas absorben agua más lentamente en suelos secos o salinos, no solo porque hay menos agua, sino porque también es causa de una menor presión de difusión del agua.

La temperatura influye como fuente de energía cuando se calienta el agua que está en contacto con la semilla, parte de la energía suministrada se invierte en aumentar la difusión de agua, por lo tanto, aumenta la tasa de absorción de agua, dentro de ciertos límites.

Se ha encontrado experimentalmente que un aumento de 10 °C en la temperatura duplica la tasa de absorción al inicio del proceso de imbibición (Peralta, 2004).

Presión hidrostática conforme el agua penetra en las semillas, ésta provoca un aumento de volumen y presión en las membranas celulares. Igualmente, las membranas celulares oponen resistencia de igual magnitud, la que resulta en un aumento de la presión de difusión del agua interna, aumentando su difusión hacia afuera y por lo tanto disminuyendo la tasa de absorción de la semilla.

El área de la semilla en contacto con agua considerando otros factores constantes, la tasa de absorción de agua es proporcional a la magnitud del área de las semillas en contacto con el agua. En algunas clases de semilla ciertas regiones son más permeables que otras, e.g. el hilo en las semillas de leguminosas (Holmant, 2004).

Fuerzas intermoleculares, son en general fuerzas de naturaleza eléctrica. Cualquier aumento en estas fuerzas disminuye la presión de difusión del agua y por tanto la tasa de absorción de las semillas (Álvarez, 2013).

El efecto de estas fuerzas es más evidente en el suelo, suelos de bajo contenido de agua retienen la humedad mediante fuerzas intermoleculares. Se debe considerar que existen diferencias entre especies, algunas absorben agua más rápidamente que otras (Pérez *et al.*, 2002).

2.5.2 Características del muestreo de semillas

El muestro de semillas es de fundamental importancia. Se denomina lote a una cantidad específica de semillas, identificables físicamente. Es necesario que la muestra enviada al laboratorio sea representativa del lote completo. La toma correcta de muestras se basa en la extracción de muestras elementales, cuyo número dependerá del tamaño y peso del lote.

Las muestras elementales deberán ser mezcladas para conformar una muestra global, de un peso mínimo, la que deberá ser enviada al laboratorio bien identificado. El tamaño de la muestra obtenida deberá ser de por lo menos 1,000 g para frijol, soya, maíz y otras especies con semillas de tamaño similar; de 500 g en el caso de trigo, avena y otras semillas de tamaño similar y entre 150 a 250 g para semillas de pastos y otras semillas de menor tamaño (ISTA, 2016).

Las tomas se deben realizar en los niveles superior, medio e inferior de la estiba, vagón, contenedor, frecuencia de muestreo, lotes, tamaño del lote, número de tomas a granel hasta 500 kg de 501 a 3,000 kg de 3.001 a 20,000 kg de 20,001 a más 1 c/300 kg (5 ó más) 2 c/500 kg (10 ó más) 3 c/700 kg (40 ó más) bolsas hasta 5 de 6 a 30 de 31 a 400 de 401 a más 1 de cada bolsa 5 (1 de cada 3 bolsas) 10 (1 de cada 10 bolsas) 80 (1 de cada 7 bolsas) (ISTA, 2016).

2.6 LITERATURA CITADA

- Adamowski, E. V., Plaguiarini, M., and Borges, C. 2008. Meiotic behavior in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruzizensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Panicea). *J.Genet.* 87:33-38.
- Álvarez, E., Latorre, M., Bonilla, X., Sotelo, G., and Miles, J. W. 2013. Diversity of *Rhizoctonia* spp. causing foliar blight on *Brachiaria* in Colombia and evaluation of *Brachiaria* genotypes for foliar blight resistance. *Plant Dis.* 97:772-779.
- CIAT. 2003. Informe anual del Proyecto de Forrajes Tropicales. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali.
- FAO. 2004. Base de datos FAOSTAT. Precios al productor y Producción de leche y carne. Roma, Italia.
- Holmann, F., Rivas, L., Ángel, P., y Pérez, E. 2004. Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria* en Centroamérica y México. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. Documento de Trabajo No. 197. p. 31.
- International Seed Testing association (ISTA). 2016. International Rules for Seed Testing. Published by the International Seed Testing Association. P.O. Box 308,8303 Bassersdorf, CH-Switzerland. 243p.
- Meléndez, F. 2003. Evaluación agronómica de tres pastos bajo pastoreo en dos localidades del trópico mexicano. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). México.

- Mendoza-Cruz, L., Hernández-Garay, A., Enríquez, J. F., Mendoza-Pedroza, S. I., Quero-Carrillo, A. R., y Joaquín-Torres, B. M. 2008. Desempeño agronómico de genotipos de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt en el trópico húmedo de México. Rev. Fitotec. Mex. 34:123-131.
- Peralta, M. A. 2004. Boletín informativo *Brachiaria* potencia y mejoramiento genético. Iguala Guerrero. México. 3 pp.
- Pérez, A. J., Hussain, S. M., Pecio, L., Kowalczyk, M., Herling, V. R., and Stochmal, A. 2016. Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. J. Agr. Food Chem. 64:4686-4694.
- Torres-Gonzales, A. M., and Morton, C. M. 2005 Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urocloa* (Poeaceae). Molecular Phylogenetic Evolution 37:36-44.
- Valle, C. B. do, and Savidan, Y. H. 1996. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Briachiaria*. pp. 147-163. In: *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. Miles, J., Maass, B. L., and do Valle, C. B. (eds). Cali Colombia: CIAT/Brasilia:EMBRAPA-CNPOC.

CAPÍTULO III

GERMINACIÓN Y VIABILIDAD DE SEMILLAS DE *Brachiaria* spp.

RESUMEN

Se evaluó la germinación y la viabilidad de semillas de 10 cultivares del género *Brachiaria* sp., ocho procedentes de México (*B. decumbens* cv. Señal, Mulato II (SNICS), *B. decumbens* cv. Cayman, DRWN8A, JMLS010J, Mulato II, Papalotla, LN56 y DRWN69) y dos procedentes de Brasil (*B. brizantha* cv. Marandú, y *B. brizantha* cv. Insurgentes). La germinación se evaluó en cajas de Petri sobre papel húmedo; los datos se registraron a los 14 y 21 días. Los cultivares: Insurgentes, Mulato II México y LN56 presentaron los valores mayores (80%) de germinación y Señal el menor (48%). La evaluación de la viabilidad se efectuó mediante la prueba de Tetrazolio en la que Cayman presentó el mayor valor (80%) y Señal el menor (48%). Hubo variedades cuyas semillas presentaron altos valores de viabilidad, pero su germinación fue mermada por la presencia de bacterias.

Palabras claves: *Brachiaria* spp., calidad de semillas, forrajes, prueba de tetrazolio

ABSTRACT

Seed germination and seed viability of 10 cultivars of the genus *Brachiaria* sp. were evaluated. Eight cultivars were from Mexico (*B. decumbens* cv. Señal, Mulato II (SNICS), *B. decumbens* cv. Cayman, DRWN8A, JMLS010J, Mulato II, Papalotla, LN56 and DRWN69) and two from Brazil (*B. brizantha* cv. Marandú, and *B. brizantha* cv. Insurgentes). Germination was evaluated using Petri dishes on wet paper; data were recorded at 14 and 21 days. Cultivars: Insurgentes, Mulato II México and LN56 showed the highest values (80%) while Señal the lowest (48%). The seed viability was evaluated using the Tetrazolium test in which Cayman presented 80% viability in contrast to Señal (48%). We found some cultivars that showed high values of viability but its corresponding germination was low, probably due to the presence of some bacteria.

Key words: *Brachiaria* spp., seed quality, forage, tetrazolium test

3.1 INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Brachiaria* son los pastos más cultivados en los trópicos húmedos, subhúmedos y secos (Miles y Valle, 1998). En el año 2005 el género *Brachiaria* se ubicó como la gramínea más utilizada para forraje especialmente en América Central y América del Sur. Brasil destaca con 40 millones de hectáreas cubiertas con pasturas de *Brachiaria* de las cuales como el 85% son de *B. decumbens* y *B. brizantha* (Sahoo *et al.*, 2017).

En México, del año 2000 al 2006 la importación de semilla de este género y la superficie sembrada tuvieron una tasa anual de crecimiento del 32%. Del año 2005 al 2006 el mercado mexicano demandó 2,100 toneladas de semillas de pastos, de las cuales 70% correspondieron a *Brachiaria* sp. (Holmann *et al.*, 2004).

Una de las limitaciones para el establecimiento de las pasturas en las zonas ganaderas es la falta de semilla certificada y libre de patógeno (Rocha-Junior *et al.*, 2017).

Los fitopatógenos impiden el desarrollo de la planta, restringen el progreso de las etapas de producción animal, encarecen los costos de establecimiento y reducen el rendimiento de las praderas (Barrón, 1991; Keller-Grein *et al.*, 1998).

En la calidad de la semilla intervienen factores físicos, genéticos, fisiológicos y sanitarios. La calidad fisiológica se refiere a la viabilidad de la semilla y a su capacidad de germinación, emergencia y establecimiento de plántulas en el suelo (Andrade y Ferguson, 1983). Para mantener la viabilidad y la germinación es necesario prevenir daños de insectos, patógenos, sobrecalentamiento,

deshidratación, oxidación y reducir al mínimo el deterioro durante el almacenamiento (Hopkinson *et al.*, 1996).

Los hongos, bacterias y los insectos son los principales factores bióticos que causan deterioro fisiológico a las semillas, ya sea infestándolas o infectándolas, lo que reduce la germinación y viabilidad (Rocha-Junior *et al.*, 2017) Estos agentes también causan un deterioro físico. Los patógenos que infectan a la semilla son difíciles de controlar una vez que se establecen en el interior de la semilla (Torres y Morton, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la germinación y viabilidad de la semilla de 10 cultivares de *Brachiaria* spp. que se encuentran disponibles en el mercado nacional e internacional.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Pruebas de germinación

Se utilizaron semillas de 10 cultivares de *Brachiaria* spp. (ocho procedentes de México y dos de Brasil) adquiridas en casas comercializadoras, instituciones y productores (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cultivares de *Brachiaria* spp. empleados en el estudio de germinación y viabilidad.

Cultivares	Procedencia
<i>B. brizantha</i> cv. Marandú	Brasil
<i>B. brizantha</i> cv. Insurgentes	Brasil
<i>B. decumbens</i> cv. Señal	México
Mulato II (SNICS)	México
Mulato II (Papalotla)	México
<i>B. decumbens</i> cv. Cayman	México
DRWN 8 A	México
JMLS 010J	México
DRWN69	México
LN56	México

Se inspeccionó la semilla seca donde se tomó una muestra, la que se analizó visualmente para detectar la presencia de estructuras como esclerocios, quistes de nematodos, cambios de color debidos a patógenos y semillas perforadas por insectos o semillas que pudieran contener insectos vivos.

Se tomó una muestra de 25 semillas con tres repeticiones de cada genotipo las que se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por un minuto.

Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se depositaron en cajas de Petri de vidrio previamente esterilizadas, con papel secante humedecido con agua estéril destilada en la base. Las semillas se colocaron separadas entre sí, para que las plántulas no entren en contacto entre ellas (Figura 1a, b).

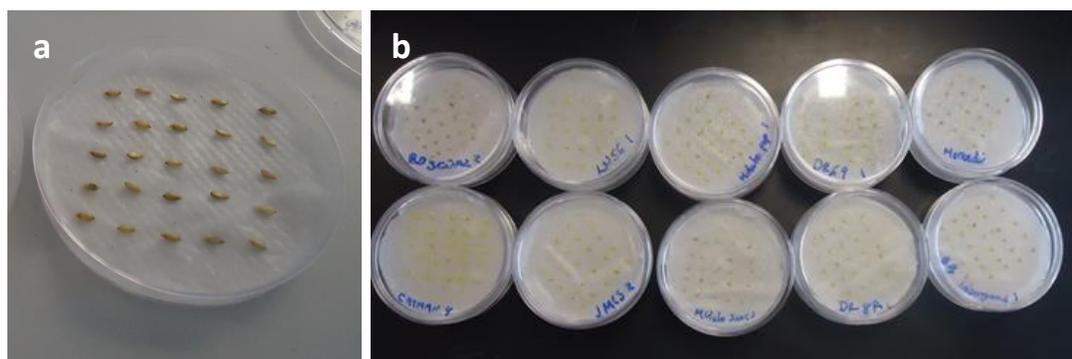


Figura 1. a) Distribución de semilla en caja de Petri, b) Cajas de Petri con semillas sobre papel húmedo de cada cultivar.

Las cajas se introdujeron en una cámara de germinación, a una temperatura constante de 28 °C, con 90% de humedad relativa y un fotoperiodo de 24 h continuas de luz blanca (Figura 2).



Figura 2. Disposición de las cajas de Petri en cámara de germinación.

Se registró el número de semillas germinadas, no germinadas y muertas a los 14 y 21 días después de la incubación (ISTA, 2016) (Figura 3).

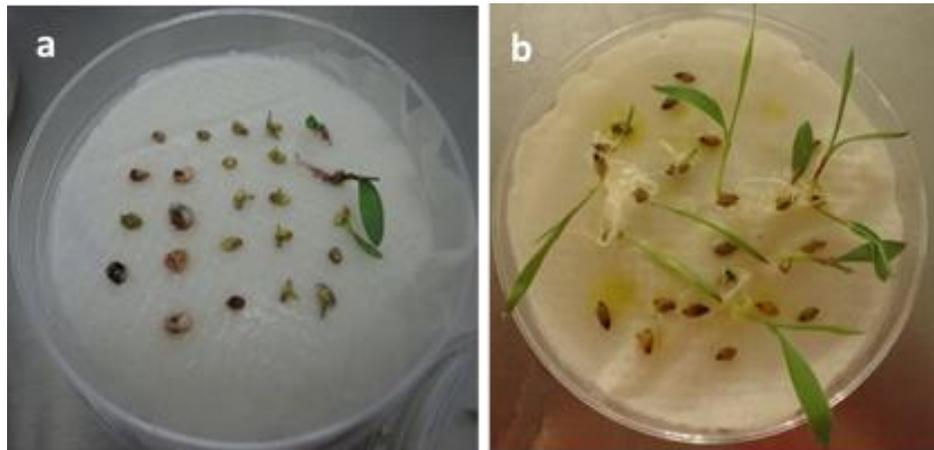


Figura 3. Semillas de *Brachiaria* spp. germinadas a los: a) 14 días y b) 21 días.

3.2.2 Prueba de viabilidad

La evaluación de la viabilidad se realizó mediante prueba de tinción con tetrazolio conforme a los lineamientos establecidos por las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2016), en una muestra de 100 semillas (4 repeticiones de 25 semillas) provenientes de la fracción de la semilla pura. Las semillas se prepararon, antes de la tinción, con base en lo indicado en el Cuadro 6A de la ISTA y después de la tinción se clasificaron en viables o no viables.

Las semillas se desinfectaron con una solución de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se embebieron en agua destilada por 12 horas (Figuras 4 y 5).



Figura 4. Lavado y desinfección de semillas de *Brachiaria* spp.

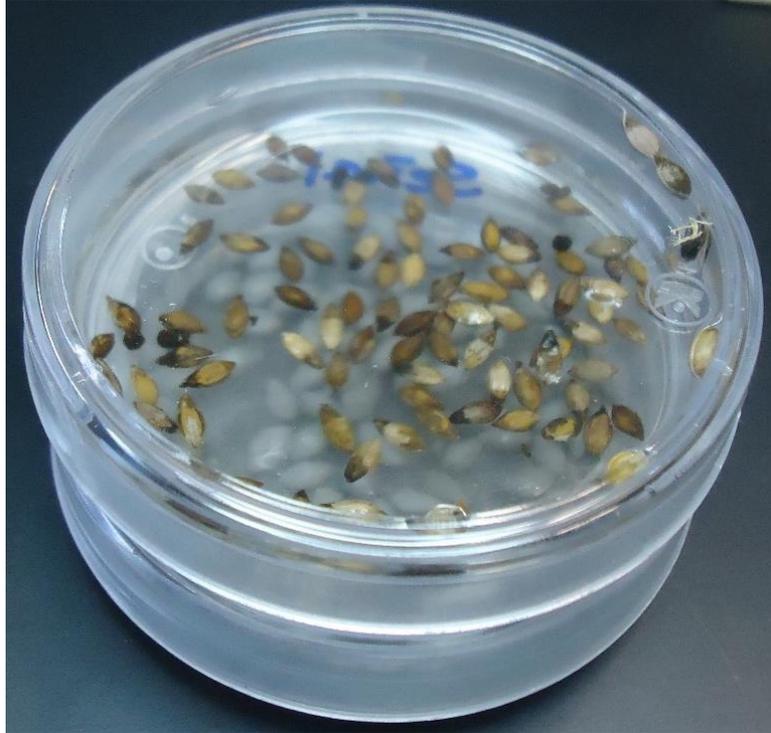


Figura 5. Imbibición de la semilla de *Brachiaria* spp. en agua destilada.

Posteriormente, cada semilla se disectó a tres cuartos de su longitud sobre una superficie limpia con un bisturí para permitir el contacto del tetrazolio (2,3,5 Dicloruro trifeniltetrazolio) al 1% con las partes internas de la semilla por inversión durante 16 horas, lapso en el que se produce una reacción entre el embrión, otros tejidos vivos y la solución, observándose la tinción de color rojo (ISTA, 2016).

Por último, las semillas se retiran de la solución y se hace un corte longitudinal completo, seleccionándose una de las mitades para evaluar el grado de tinción con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Figuras 6 y 7).

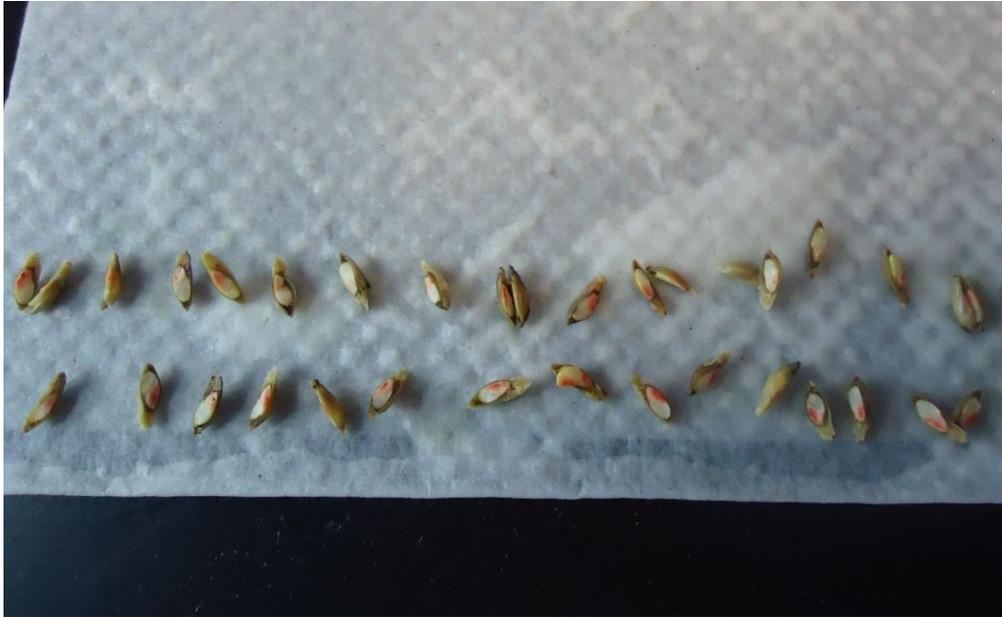


Figura 6. Semillas de *Brachiaria* spp. disectadas longitudinalmente para su inspección.



Figura 7. Acercamiento del corte longitudinal de una semilla de *Brachiaria* spp. exponiendo la tinción con tetrazolio (color rojo) en los tejidos vivos.

Se registró el número de semillas viables y no viables (teñidas y no teñidas) y se estimó el porcentaje respectivo.

En ambas pruebas se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Los datos se sometieron a análisis de varianza y pruebas de medias (Tukey $P < 0.05$) (Cuadro 4), mediante el paquete estadístico SAS (2001).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas se consideran confiables ya que se obtuvo un valor de 6 en el análisis de tolerancias; de acuerdo con las reglas del ISTA (2016) el valor máximo de tolerancia es de 10.

En el Análisis de Varianza (ANOVA) para germinación a los 14 días hubo diferencias significativas para variedades ($P < 0.0001$). Cuatro cultivares presentaron valores superiores a 50% de germinación, cinco tuvieron valores entre 10 y 30%; (Cuadro 2, Figura 7).

Cuadro 2. Analisis de varianza a los 14 días de germinación de semillas de *Brachiaria* spp.

FV	GL	SC	CM
Germinación	9	184.064	20.445**
Error	29	100.9166	3.47**
Total	38	284.92	
CV		21.76	8.56

FV:Fuente de variación, GL:Grados de Libertad, SC:Suma de cuadrados, CM:Cua-drados medios, CV:Coeficiente de Variación, **Altamente significativo.

En el Análisis de Varianza (ANOVA) para germinación a los 21 días hubo diferencias significativas para variedades ($P < 0.0001$). Cuatro cultivares presentaron valores superiores a 80% de germinación, cinco tuvieron valores entre 70 y 80%; Señal presentó la menor germinación (48%) (Cuadro 3, Figura 8).

Cuadro 3. Análisis de varianza a los 21 días de germinación de semillas de *Brachiaria* spp.

FV	GL	SC	CM
Germinación	9	2501.33	250.13**
Error	1	1267.66	212.84**
Total	10	2501.33	19.21
CV (%)		7.61	

F.V. :Fuente de variación, GL:Grados de Libertad, SC:Suma de cuadrados, CM Cuadrados medios, CV:Coeficiente de Variación, **Altamente significativo

Cuadro 4. Prueba de medias Tukey $P < 0.05$ para la variable germinación en 10 cultivares de *Brachiaria* spp.

Comparación/ cultivares	Diferencia entre medias	Límites de confianza
c-k	1.750	-2.761 6.261
a-g	-5.250	-9.761 -0.739***
a-f	-4.750	-9.261 -0.239***
a-j	-4.750	-9.261 -0.239***
a-l	-4.750	-8.761 -0.261
a-b	-4.250	-8.539 1.206
a-d	-3.667	-7.761 1.261
a-c	-2.750	-7.761 1.761
a-k	-0.050	-5.011 4.011
k-h	1.250	-3.261 5.761
k-g	-6.500	-11.011 -1.909***
k-f	-6.000	-10.511 -1.489***
k-j	-6.000	-10.511 -1.489***
k-i	-6.000	-10.011 -0.989***
k-b	-5.500	-9.789 -0.044***
k-d	-4.500	-9.011 0.011
k-c	-1.750	-8.511 0.511
k-a	-1.250	-6.261 2.761

a:Marandú, b:Insurgentes, c:mulato Mex, d:JLMS, f:DRW69, g:cayman h:In56, i:Mulato Papalotla, J:DRW8, K: Señal, *** diferencias altamente significativas.

El cultivar Cayman presentó una buena germinación en la primera lectura (14 días). Cuadro 2, pero la presencia de microorganismos redujo la germinación y desarrollo de las semillas en la segunda lectura (21 días).

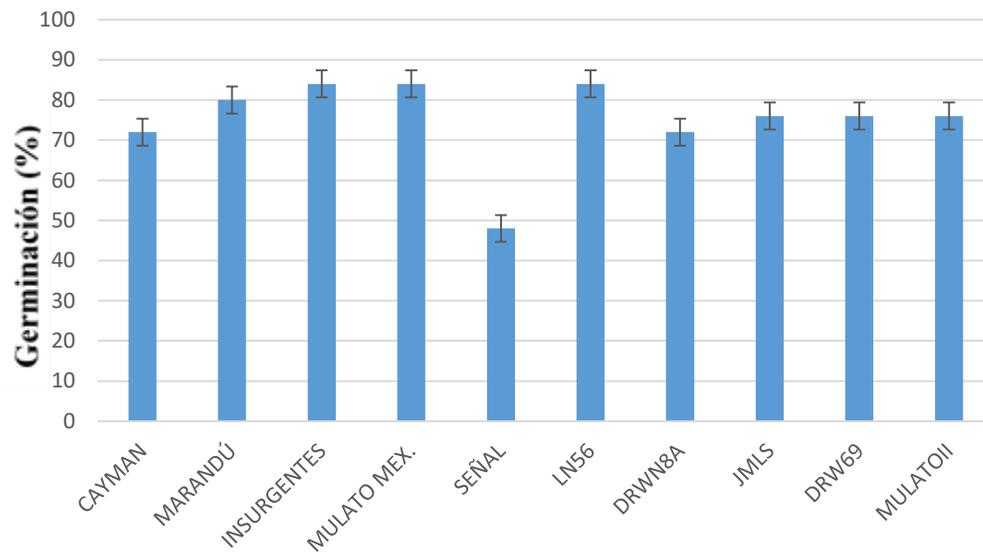


Figura 8. Germinación de semilla de 10 genotipos de *Brachiaria* spp. a los 21 días.

En cuanto a la viabilidad, hubo diferencias significativas entre cultivares ($P < 0.0001$). Cayman presentó el mayor valor de viabilidad (80%) y Señal presentó el menor (48%). Siete cultivares presentaron entre 60 y 80% de viabilidad (Figura 9).

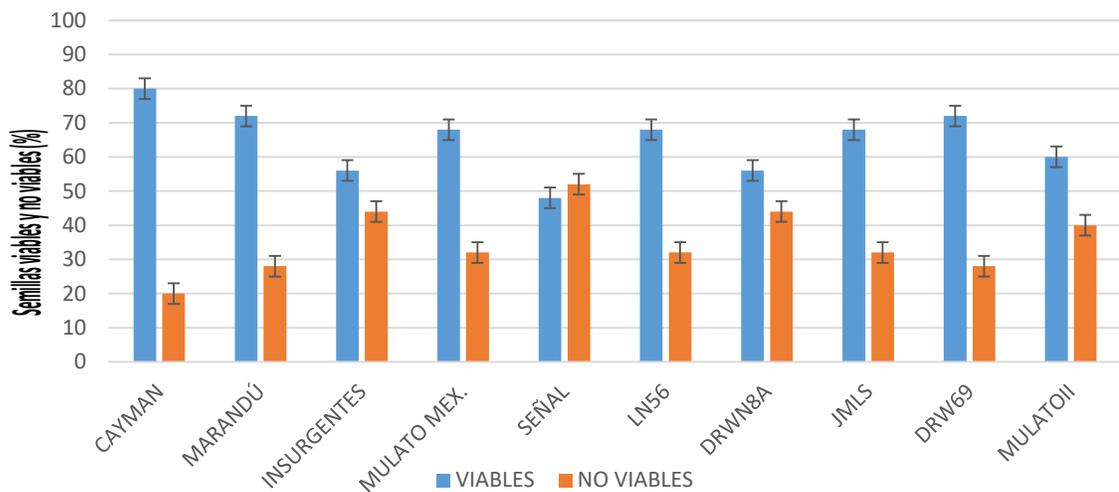


Figura 9. Porcentaje de semillas viables y no viables evaluadas con la prueba de tetrazolio de 10 cultivares de *Brachiaria* spp.

Destaca el contraste entre la alta viabilidad de la semilla del cultivar Cayman y su menor germinación, lo cual se atribuye a que en las cajas de Petri se observó que la semilla de este cultivar presentó un alta presencia de hongos.

Las variedades Insurgentes, Mulato II Méx. y LN56 presentan los mismos porcentajes de germinación, sin embargo, en la prueba de viabilidad hubo diferencias entre estas variedades (Figuras 8 y 9). Por ejemplo, las semillas del cultivar Insurgentes aun cuando presentó bajos valores de viabilidad mostró la mayor germinación.

Al respecto, Hopkinson *et al.* (1996) indica que los grupos taxonómicos de *Brachiaria* reflejan sus características genéticas mediante un comportamiento diferencial a las condiciones ambientales, y en la tolerancias en daño (deterioro) sufrido en el proceso de cosecha, post-cosecha y almacenamiento.

Es común que las semillas que presentan menor porcentaje de germinación sean aquellas con menor viabilidad debido, probablemente, al deterioro que han sufrido durante el manejo inadecuado durante la cosecha y el manejo postcosecha (Killer-Grein *et al.*, 1998).

Sin embargo, aun cuando la semilla presente altos porcentajes de viabilidad y sea desinfestada, en este estudio se demuestra que pueden presentarse algunos hongos o bacterias en el interior de la semilla que provoquen patologías que impiden la germinación y el buen desarrollo del embrión (Pérez *et al.*, 2016).

Se ha considerado que el método de cosecha influye en el deterioro de la semilla y por lo tanto, en la germinación y viabilidad (Rocha-Junior *et al.*, 2017).

También se ha documentado que el tamaño y peso de la semilla de *Brachiaria* influyen en la germinación y cambia dentro de la especie según el cultivar (Andrade y Ferguson, 1983; Pérez *et al.*, 2016). En el presente trabajo se observó que las semilla del cultivar Señal fue la más pequeña y presentó los menores valores de germinación y viabilidad.

3.4 CONCLUSIONES

Los cultivares: Insurgentes, Mulato II México y LN56 presentaron los valores mayores (80%) de germinación y Señal el menor (48%). La viabilidad de la semilla fue mayor en el cultivar Cayman (80%) y menor en Señal 48%. Hubo variedades cuyas semillas presentaron altos valores de viabilidad, pero su germinación fue mermada, probablemente por la presencia de bacterias localizadas en el interior de la semilla.

3.5 LITERATURA CITADA

Andrade, D. R. P., y Ferguson, J. E. 1983. La calidad de la semilla en el establecimiento de las pasturas. pp. 3-7. En: Red Internacional de evaluación de pastos Tropicales (RIEP) (eds.). Establecimiento y Renovación de Pasturas, Conceptos Experiencias y Enfoque de la Investigación. VI Reunión del Comité de Asesores de la RIEPT, CIAT, Cali Colombia.

Barrón, A. M. 1991. Multiplicación de semilla forrajera experimental en Balancan, Tabasco. IV Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria del CIFAP, Villahermosa, Tabasco. p 55.

Holmann, F., Rivas, L., Ángel, P., y Pérez, E. 2004. Impacto de la adopción de pastos *Brachiaria* en Centroamérica y México. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia. Documento de Trabajo No. 197. p. 31.

Hopkinson, J. M., de Souza, F. H. D., Diulgheroff, S., Ortiz, A., y Sanchez, M. 1996. Reproductive physiology, seed production, and seed quality of *Brachiaria*. pp. 124-140. In: *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. Miles J. W., Maass, B. L., and do Valle, B. C. (eds.). CIAT. EMBRAPA.

International Seed Testing association (ISTA). 2016 International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. Bassersdorf, CH-Switzerland. 246 p.

- Keller-Grein, G., Mass, L. B., y Hanson, J. 1998. Variación natural en *Brachiaria* y bancos de germoplasma existentes. pp. 18-45. En: *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Miles J. W., Maass, B. L., and do Valle, B. C. (eds.). CIAT- EMBRAPA Publicación CIAT N° 295.
- Miles, J. W., y Valle, C. B (eds.). 1998. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. CIAT- EMBRAPA Publicación CIAT N° 2.
- Pérez, A. J., Hussain, S. M., Pecio, L., Kowalczyk, M., Herling, V. R., and Stochmal, A. 2016. Ultrahigh-performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, two similar pastures with different toxicities. *J. Agric. Food Chem.* 64:4686-4694.
- Rocha-Junior, P. R., Andrade, F. V., Mendonça, E. S., Donagemma, G. K., Fernandes, R. B., Bhattharai, R., and Kalita, P. K. 2017. Soil, water, and nutrient losses from management alternatives for degraded pasture in Brazilian Atlantic Rainforest Biome. *Sci. Total Environ.* 583:53-63.
- Sahoo, D., Ummalyma, S. B., Okram, A. K., Sukumaran, R. K., George, E., and Pandey, A. 2017. Potential of *Brachiaria mutica* (Para grass) for bioethanol production from Loktak Lake. *Bioresour Technol.* pii: S0960-8524(17)30317-30326.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User Guide. Release 9.0 edition. North Carolina, USA. 1289 p.

Torres González, A., and M. Morton, C. M. 2005. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 37:36–44.

CAPÍTULO IV.

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN SEMILLAS DE

***Brachiaria* spp.**

RESUMEN

La filogenia molecular apoya cada vez más la comprensión de la diversidad y proporciona la base para la clasificación de los organismos. La clasificación filogenética de microorganismos basada en secuencias del gen 16S rRNA ofrece un marco bien definido que puede ser utilizado para desarrollar herramientas moleculares para la identificación. El objetivo del presente trabajo fue Identificar filogenéticamente y morfológicamente las poblaciones de bacterias cultivadas presentes en semillas de las *Brachiaria* spp.

Se analizaron diez genotipos de semillas del género de *Brachiaria* sp., ocho procedentes de México (*B. decumbens* cv 'Señal', Mulato II, *B. decumbens* cv 'Cayman', DRWN8A, JMLS010J, Mulato II, Papalotla, LN56 y DRWN69) y dos procedentes de Brasil (*B. brizantha* cv 'Marandú', *B. brizantha* cv 'Insurgentes'). Se aislaron y purificaron las bacterias para extraer el DNA y se amplificó el gen 16s rDNA mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se obtuvieron cuarenta y siete aislamientos de importancia de trece géneros diferentes de bacterias.

Palabras claves: *Brachiaria* sp., genotipo, sanidad, PCR

Abstract

Molecular phylogeny increasingly supports the understanding of diversity and provides the basis for the classification of organisms. The phylogenetic classification of microorganisms based on 16S rRNA gene sequences provides a well-defined framework that can be used to develop molecular tools for identification.

Percentage of germination the seeds of *Brachiaria* was influenced by bacterial population in the seeds. Our objective was to identify phylogenetically and morphologically the populations of bacteria present in *Brachiaria* spp. seeds. We analyzed ten seed genotypes of *Brachiaris* seed, eight of them came from Mexico (*B. decumbens* cv 'Señal', Mulato II, *B. decumbens* cv 'Cayman', DRWN8A, JMLS010J, Mulato II, Papalotla, LN56 y DRWN69,) and two provinces of Brazil (*B. brizantha* cv 'Marandú', *B. brizantha* cv 'Insurgentes'). Bacteria were isolated and purified to extract the DNA and the 16s gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). Forty-seven isolates of phytosanitary importance were obtained from thirteen different species of bacteria.

Keywords: *Brachiaria* sp., genotype, PCR, phytosanitary

4.1 INTRODUCCIÓN

Brachiaria spp. es un género originario de África, formado por un poco más de 100 especies que se encuentra distribuido por todas las zonas tropicales del mundo, especialmente en Brasil, Colombia y Tailandia. Destacan las especies: *B. decumbens*, *B. brizantha* y *B. ruziziensis* (Jungmann *et al.*, 2010). Estos pastos pasaron de ser una maleza a un importante cultivo por sus cualidades adaptativas con un mínimo de manejo y cuidados, por el desempeño que muestran como pasturas tropicales de alto valor nutrimental y por su adaptabilidad en suelos ácidos y pobres (CIAT, 1998; Paula *et al.*, 2016).

De 2015 a la fecha, las especies del género *Brachiaria* han tenido una participación importante dentro de la extensa lista de forrajes cultivados en el trópico húmedo, sub húmedo y seco a nivel mundial. Estas especies se han incorporado a los programas de mejoramiento genética para reducir los niveles de toxicidad que puedan afectar al ganado (Perez *et al.*, 2016). Especialmente en América central y América del sur, destacando Brasil con aproximadamente 50 millones de hectáreas sembradas con *Brachiaria*. México ha incrementado considerablemente los volúmenes de áreas de pastura establecidas de 18,000 ha a 2'616,130 ha.

Las semillas se consideran la fuente más importante para la perpetuación de microorganismos; además, permanecen más tiempo viable en las semillas que en el suelo o en residuos de cosecha, y su estrecha relación con la semilla favorece las infecciones primarias tempranas (Navarrete-Maya *et al.*, 2014). Por tal motivo es

una necesidad realizar estudios que determinen la fitosanidad de las semillas introducidas al país y distribuida a los campos de producción.

Existe poca información acerca de la presencia de bacterias en la semilla con el que se pueda establecer programas que permitan evitar la dispersión de fitopatógenos, mitigando riesgos económicos en el agro-mexicano, así como alertar a las autoridades de las condiciones fitosanitarias de las semillas de *Brachiaria* spp. Introducidas al país.

De los agentes patogénicos importantes se encuentran los microorganismos, entre ellos las bacterias por su rápida diseminación y colonización, una sola célula es suficiente para causar una epifita, además de que no solo se encuentra invadiendo las estructuras aéreas, sino también se coloniza los espacios intercelulares en la semilla.

La filogenia molecular apoya cada vez más la comprensión de la diversidad y proporciona la base para la clasificación de los organismos. La clasificación filogenética de microorganismos basada en secuencias del gen 16S rRNA ofrece un marco bien definido que puede ser utilizado para desarrollar herramientas moleculares para la identificación.

El objetivo del presente trabajo fue Identificar filogenéticamente y morfológicamente las poblaciones de bacterias cultivadas presentes en semillas de las *Brachiaria* spp. Conocer la población de bacterias presentes en semillas de *Brachiaria* spp.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material genético

Las semillas se adquirieron por medio de casas comercializadoras: semillas Papalotla, Productores de semilla en el Municipio de Iguala, Guerrero. Así como instituciones como el: Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y la Secretaría de Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), obteniendo muestras de las especies que se comercializa procedente de Brasil que han importado semilla en este año a nuestro país (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cultivares de *Brachiaria* sp. utilizados para identificar las especies de bacterias endófitas mediante PCR.

Cultivares	Procedencia
<i>B. brizantha</i> cv Marandú	Brasil
<i>B. brizantha</i> cv Insurgentes	Brasil
<i>B. decumbens</i> cv Señal	México
Mulato II (SNICS)	México
Mulato II (Papalotla)	México
<i>B. decumbens</i> cv Cayman	México
DRWN 8 A	México
JMLS 010J	México

DRWN69

México

LN56

México

4.2.2 Obtención de aislamientos

Se utilizó el método de Freezing blotter (ISTA, 2016), para lo cual se seleccionaron 25 semillas de cada uno de los genotipos con 3 repeticiones. Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron sobre papel toalla estéril en una cámara de flujo laminar a temperatura ambiente.

Posteriormente, las semillas se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo B King (1.5 g de K_2HPO_4 , 1.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 mL de glicerina, 20 g de peptona y 16 g de agar en 1 L de agua destilada) (Schaad *et al.*, 2001). Después de 5 días se observó el crecimiento de colonias bacterianas (Figura 3), las que se transfirieron a nuevas cajas de Petri con la técnica de estría cruzada para obtener cultivos puros (Figura 4). Las cajas se mantuvieron a 27 °C por 3 días para estudiar las características morfológicas de las colonias (Cuadro 2).

4.2.3 Extracción de DNA de bacterias

La extracción de DNA se realizó a partir de cultivos puros, con un asa de siembra se tomó una colonia bacteriana de 72 h y se colocó en un tubo Eppendorf conteniendo 600 μ L de CTAB al 2% (Doyle and Doyle, 1990) precalentado en un baño maría a 60 °C. Los tubos se incubaron a 96 °C por 1 h y se mezclaron con un vortex tres veces con intervalos de 20 min.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 11,150 Xg por 5 min, el sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo, previamente etiquetado al que se añadió 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), los tubos se agitaron por 10 min por inversión a temperatura ambiente, después de este tiempo se centrifugaron a 11150 Xg por 10 min.

El sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y se agregó 500 µL de cloroformo-isoamílico (24:1), se agitó por inmersión durante 10 min y se centrifugó a 11,150 Xg por 10 min. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 950 µL de etanol al 99% previamente enfriado a -20 °C por 2h. Después se centrifugó a 11,150 Xg por 30 min, se procedió a decantar el etanol, la pastilla se lavó con 800 µL de isopropanol al 70% de la misma manera que el paso anterior, la pastilla se dejó secar por 1 h. La pastilla se resuspendió en 100 uL de agua HPLC y se almacenó a -20°C.

La calidad de los DNA obtenidos se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Se consideró que el DNA es de buena calidad cuando los valores de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , se encuentran entre 1.8 y 2.1.

4.2.4 Amplificación del 16S rDNA por PCR

Se amplificó por medio de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores 8F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), que amplifican un fragmento de 1500 pares de bases (bp) aproximadamente (Turner *et al.*, 1999).

La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 15 μ L conteniendo 0.3 unidades de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Promega, USA), 0.8 mM deoxinucleósido trifosfatos, 20 ng ADN, 20 pmol de cada iniciador y 5X *GoTaq*[®] Reaction Buffer (Promega, USA).

Las amplificaciones se realizaron en un Thermal Cycler DNA Engine[®] (BioRad, Mexico), 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, se consideró una extensión final a 72 °C por 5 min. La verificación de los productos de PCR se realizó por medio de electroforesis a 110 volts en gel de agarosa al 1.5% preparado con 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) durante 1.5 h. Para estimar el tamaño de la banda se incluyó un marcador de peso molecular de 1kb (Promega, USA). El gel se tiñó con gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Alemania).

4.2.5 Secuenciación

Los productos de PCR correspondientes al 16S rDNA amplificados se limpiaron con la enzima ExoSap-IT (Affimetrix, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción para secuenciación se preparó en un volumen final de 20 μ L conteniendo 2.5X del Ready Reaction Premix, 5X del Big Dye Sequencing Buffer, 4 pmol de cada iniciador y 40 ng del DNA templado. Las condiciones de

amplificación para el PCR se realizó en un Thermal Cycler DNA Engine® (BioRad, México), con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de 10 segundos para desnaturalización a 96 °C, un alineamiento a 50 °C por 5 segundos, una extensión a 60 °C por 4 min, y una extensión final a 60 °C por 4 min.

4.2.6 Análisis de secuencias

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Las secuencias se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

4.2.7 Construcción de árbol filogenético

Las secuencias consenso se compilaron en un archivo fasta y se alinearon con el profile *mode* del Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

La reconstrucción filogenética se realizó con el programa Mr Bayes (Ronquist *et al.*, 2012) con un 1'000,000 de generaciones hasta obtener una desviación estandar menor a <0.01. En todos los casos se utilizó un modelo 4x4 y el modelo de sustitución GTR, que considera que todas transversiones y transiciones son diferentes.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Aislamientos obtenidos

Después de 5 días de mantener las semillas en medio B de King a 27 °C, se observó el crecimiento de colonias bacterianas (Figura 1).

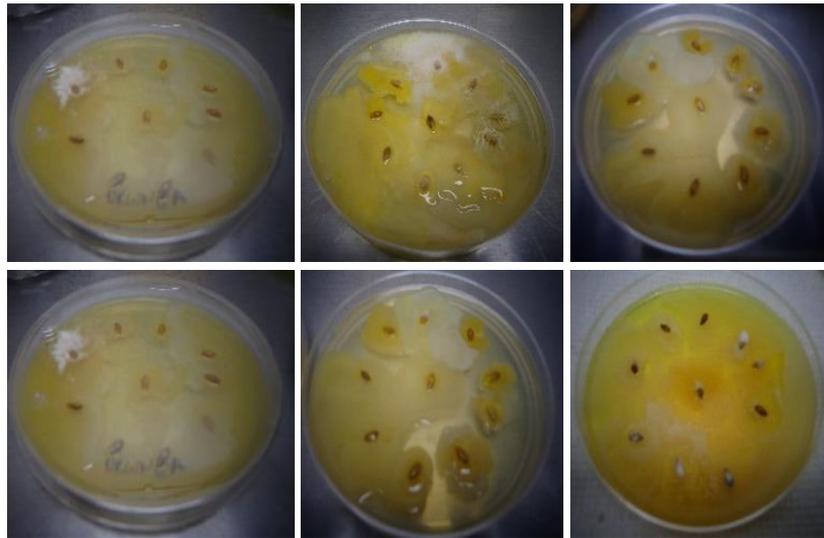


Figura 1. Colonias bacterianas de 5 días crecidas sobre medio B de King a partir de semillas desinfectadas de *Brachiaria* spp.

Cuando las colonias se purificaron se pudieron distinguir colonias blancas, cremas, amarillas, elevadas y con bordes enteros (Cuadro 2, Figura 2)

Cuadro 2. Características morfológicas y fisiológicas de bacterias aisladas de semillas de *Brachiaria* spp.

Bacteria	Tinción de Gram	Metabolismo O/F	Color de la colonia	Elevación de la colonia
<i>Pseudomonas putida</i>	Negativa	Aeróbica	Crema	Plana
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Negativa	Aeróbica	Crema	Plana
<i>Pseudomonas poae</i>	Negativa	Aeróbica	Crema	Plana
<i>Pseudomonas fulva</i>	Negativa	Aeróbica	Crema	Convexa
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negativa	Aeróbica	Amarilla	Plana
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Negativa	Aeróbica	Crema	Planoconvexas
<i>Ochrobactrum</i> sp.	Negativa	Aeróbica	incolora	Planoconvexas
<i>Acinetobacter rudis</i>	Negativa	Aeróbica	Amarillo pálido	Convexas
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativa	Anaeróbica	Violeta clara	Plana convexas
<i>Enterobacter</i> sp.	Negativa	Anaeróbica	Amarilla	Convexas
<i>Providencia rettgeri</i>	Negativa	Anaeróbica	Crema	Elevada
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Negativa	Anaeróbica	Rosado	Plana convexa
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Negativa	Anaeróbica	Rosado	Plana convexas
<i>Pantoea agglomerans</i>	Negativa	Anaeróbica	Amarilla	Plana
<i>Bacillus pumilus</i>	Positiva	Aerobio o anaeróbico facultativos	Blanco	Convexa
<i>Bacillus megaterium</i>	Positiva	Aerobio o anaeróbico facultativos	Crema	Convexa
<i>Lysinobacillus</i> sp.	Positiva	Aerobio o anaeróbico facultativos	Crema	Plano convexa



Figura 2. Obtención de cultivos puros de 72 horas después de haber sido transferidas por el método de estría cruzada.

4.3.2 Amplificación por PCR y secuenciación

Con los iniciadores universales 8F y 1492 R, se pudo obtener la banda esperada de aproximadamente 1,500 pares de bases (bp) para el total de bacterias procesadas. Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador digital, el cual permitió determinar su integridad, así como ausencia de bandas dobles, bandas fantasmas o exceso de algunos de los componentes de PCR (Figura 3).

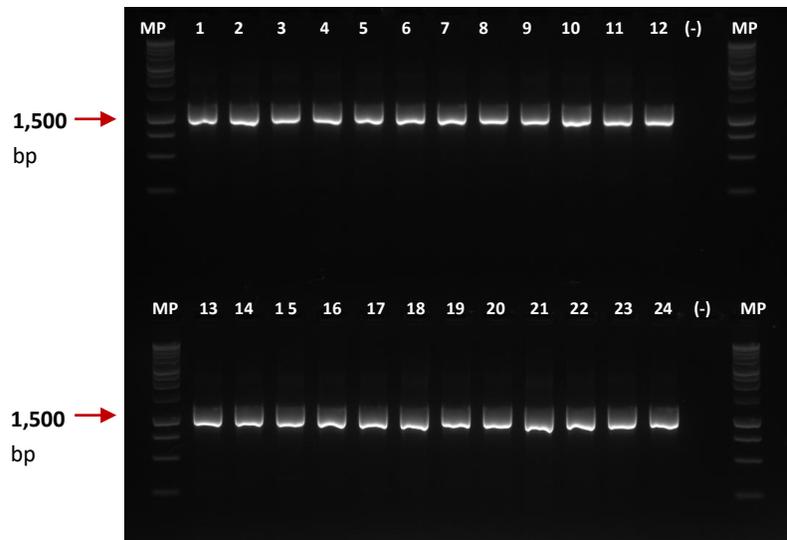


Figura 3. Amplificación del 16S rDNA por medio de PCR de bacterias aisladas de semillas desinfectadas de *Brachiaria* spp. (Carriles 1-24), (-) Control negativo. MP=marcador de peso molecular de 1Kb.

4.3.3 Análisis filogenético

Los resultados sobre la comparación de secuencias de cada uno de los aislamientos (Cuadro 3), indica que las bacterias presentes en el interior de la semilla de las diferentes especies de *Brachiaria* analizados, pertenecen principalmente a bacterias del grupo de las Gram negativas cuya principal característica es la ausencia de esporas y un pequeño grupo a bacterias Gram positivas formadoras de esporas en el interior de la célula bacteriana (Figura 4).

Cuadro 3. Relación de bacterias aisladas de semillas de los cultivares de *Brachiaria* spp.

Aislamiento	Especie	Cultivar	Identificada como
1	<i>Brachiaria decumbens</i>	Cayman-R1	<i>Pseudomonas poae</i>
2	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R1	<i>Pseudomonas poae</i>
3	<i>B. decumbens</i>	Señal-R3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
4	<i>B. decumbens</i>	JML-R2	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
5	<i>B. decumbens</i>	LN5-R2	<i>Enterobacter</i> sp.
6	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R3	<i>Pseudomonas putida</i>
7	<i>B. decumbens</i>	DRW-R1	<i>Pantoea agglomerans</i>
8	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Pantoea agglomerans</i>
9	<i>B. decumbens</i>	LN5-R3	<i>Klebsiella pneumonia</i>
10	<i>B. decumbens</i>	Señal-R3	<i>Providencia ruttgeri</i>
11	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Enterobacter cloacae</i>
12	<i>B. decumbens</i>	Mulato-R3	<i>Enterobacter</i> sp.
13	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
14	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R1	<i>Pantoea agglomerans</i>
15	<i>B. decumbens</i>	DRW-R4	<i>Pseudomonas fulva</i>
16	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R2	<i>Providencia ruttgeri</i>

17	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Providencia ruttgeri</i>
18	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Ochrobactrum</i> sp.
19	<i>B. brizantha</i>	MAR-R1	<i>Enterobcter cloacae</i>
20	<i>B. decumbens</i>	LN5-R2	<i>Providencia ruttgeri</i>
21	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Ochrobactru manthropi</i>
22	<i>B. decumbens</i>	DRW-R3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
23	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R3	<i>Enterobacter</i> sp.
24	<i>B. decumbens</i>	MUM-R1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
25	<i>B. decumbens</i>	Señal-R2	<i>Acinetobacterrudis</i>
26	<i>B. decumbens</i>	LN5-R1	<i>Bacillus megaterium</i>
27	<i>B. decumbens</i>	DRW-R1	<i>Enterobacter asburiae</i>
28	<i>B. decumbens</i>	Señal-R4	<i>Enterobacter cloacae</i>
29	<i>B. decumbens</i>	DRW-R4	<i>Enterobacter</i> sp.
30	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
31	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Pantoea agglomerans</i>
32	<i>B. decumbens</i>	LN5-R1	<i>Pseudomonas</i> sp.
33	<i>B. brizantha</i>	MAR-R4	<i>Lysinobacillus</i> sp.
34	<i>B. decumbens</i>	Señal-R2	<i>Pantoea agglomerans</i>

35	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Bacillus pumilus</i>
36	<i>B. decumbens</i>	Señal-R2	<i>Pseudomonas putida</i>
37	<i>B. brizantha</i>	Insurgentes-R1	<i>Enterobacter asburiae</i>
38	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
39	<i>B. decumbens</i>	Señal-R1	<i>Enterobacter cloacae</i>
40	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R3	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
41	<i>B. brizantha</i>	MAR-R3	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
42	<i>B. decumbens</i>	MUM-R3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
43	<i>B. brizantha</i>	MAR-R2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
44	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R1	<i>Enterobacter</i> sp.
45	<i>B. decumbens</i>	LN5-R2	<i>Enterobacter</i> sp.
46	<i>B. brizantha</i>	Insurgentes-R2	<i>Pseudomonas fulva</i>
47	<i>B. decumbens</i>	Cayman-R2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

De los diez cultivares analizados se obtuvieron 47 aislamientos correspondientes a 10 géneros de bacterias aisladas de semilla de *Brachiaria* procedentes de México: JMLS 010J, LN56, DRWN8A (Semillas Iguala, Guerrero.), *B. decumbens* var. señal, Mulato II (SNICS), mulato II semillas (semillas Papalotla) *Brachiaria decumbens* cv Cayman (SENASICA), se identificaron los géneros: *Providencia ruttgeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum* sp. *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida* (Cuadro 2).

Cuadro 4. Géneros de bacterias aisladas en semilla de dos especies de *Brachiaria* procedente de Brasil y México.

Cayman	Señal	Marandú	JMLS	LNS56	DRW	Mulato M
<i>Pseudomonas poae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Pseudomonas fulva</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Providencia ruttgeri</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		<i>Providencia ruttgeri</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Lysinobacillus</i> sp.		<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	
<i>Providencia ruttgeri</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>			<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Ochrobactrum anthropi</i>					
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Acinetobacter rudis</i>					

En los cultivares procedentes de Brasil proporcionados por SNICS, *B. brizanta* cv insurgentes y cv Marandú se identificaron los géneros: *Pseudomonas poae*, *P. fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia ruttgeri*, *Enterobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp. *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Enterobacter*, *Pantoea* sp., *Klebsiella* sp., *Providencia* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Lysinobacillus* sp. (Figuras 4 y 5).

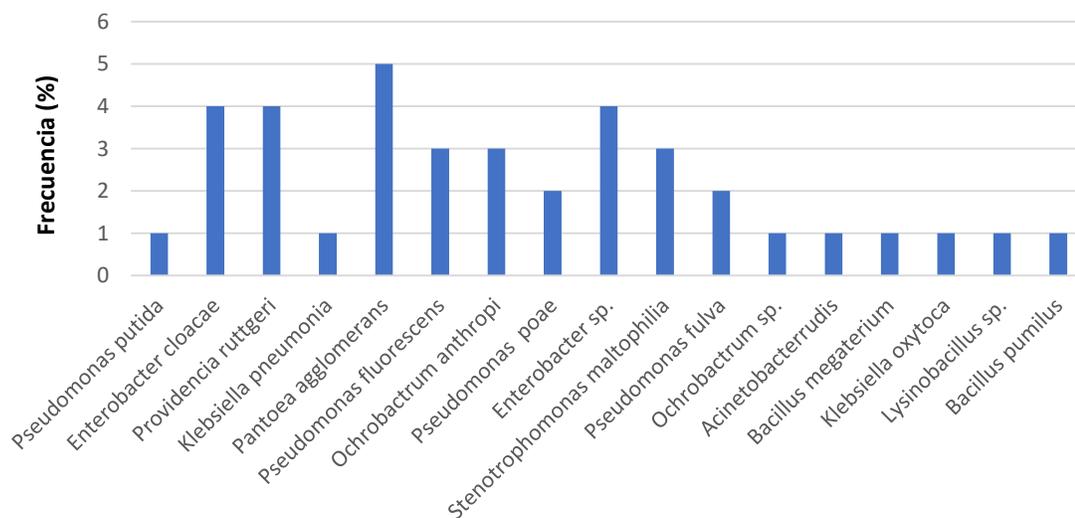


Figura 4. Frecuencias de la presencia de taxás bacterianas en los cultivares de *Brachiaria* spp. aislados de semilla desinfectada.

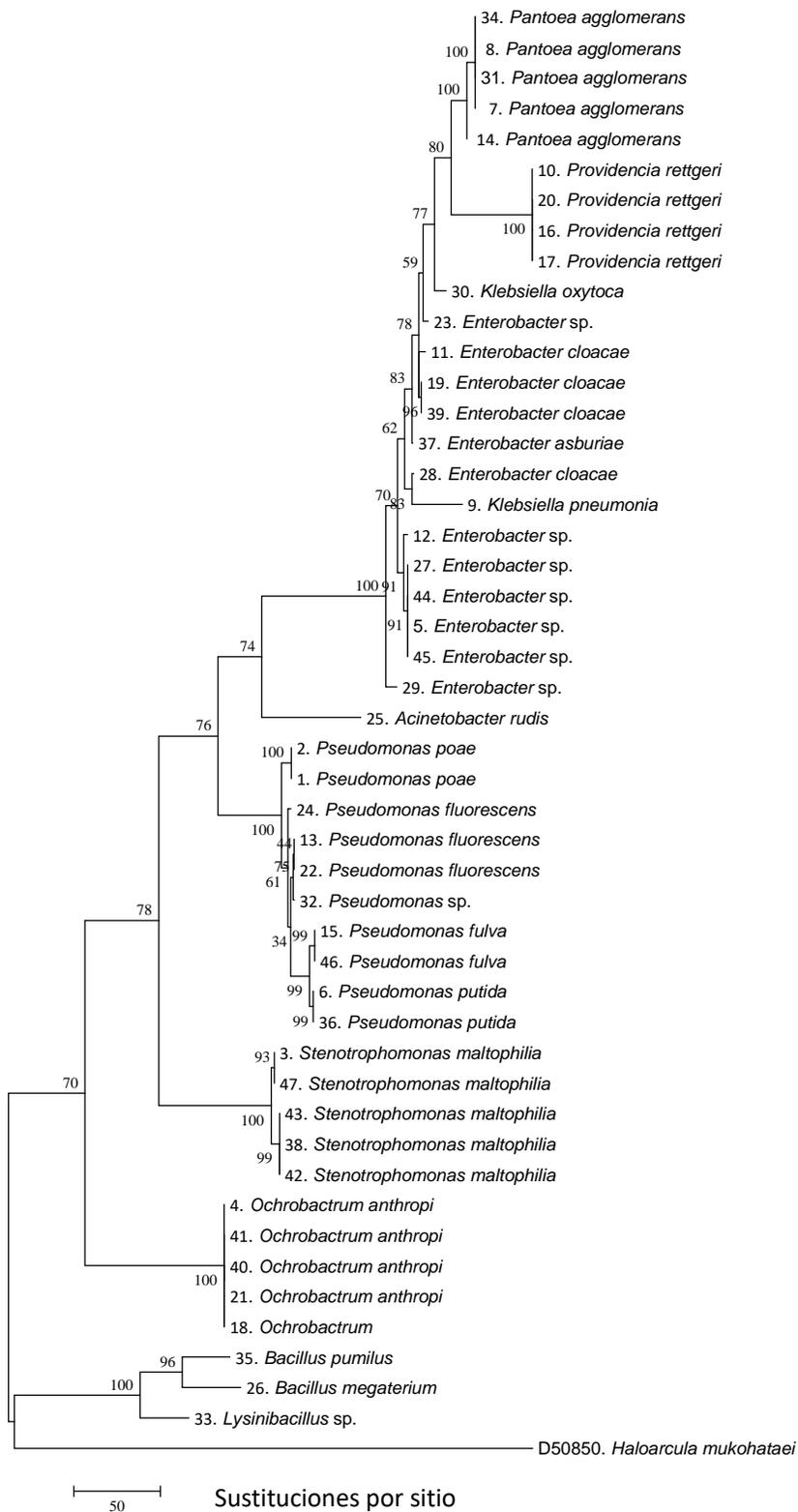


Figura 5. Árbol filogenético construido con secuencias parciales del 16S rDNA, se usó inferencia bayesiana con 1 M de generaciones.

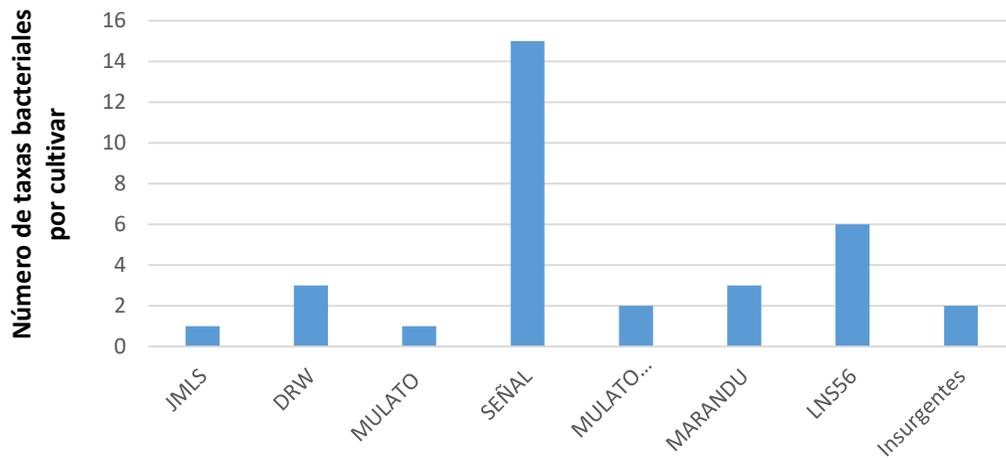


Figura 6. Identificación de taxas bacteriales aisladas en cultivares de *Brachiaria* spp.

El estudio de las poblaciones bacterianas en semilla se ha convertido en uno de los retos más importantes de la Patología de Semillas, debido a que esta puede ser portadora de bacterias patógenas con la capacidad de iniciar epidemias en condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Madden et al., 2009; Navarrete-Maya et al., 2014).

En el caso de semillas de *Brachiaria* son escasos los estudios relacionados a la identificación de bacterias en semillas, por lo que los grupos bacteriales encontrados en el presente trabajo significan una contribución al conocimiento de parte de las comunidades bacteriales cultivables en medios artificiales. Especial atención merecen los géneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Strenophomonas* debido a que se han reportado como patógenos en cultivos de importancia agrícola

como el caso de *P. agglomerans* en semilla de maíz y sorgo, esta bacteria causa estrías cloróticas en las hojas con bordes ondulados antes de la floración (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007; Silva-Rojas *et al.*, 2010). Resultados similares se han encontrado con la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* afectando maíz en la región de Valles Altos Centrales de México (Silva-Rojas *et al.*, 2015).

Estudios sobre la patogenicidad de los aislamientos identificados en el presente trabajo son recomendados para determinar si son potencialmente patogénicos a *Brachiaria* u otros hospedantes.

5. CONCLUSIONES

El estudio realizado con técnicas moleculares permitió la identificación de los géneros de bacterias asociadas a las semillas de *Brachiaria*: *Providencia ruttgeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum* sp. *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida*.

Los géneros identificados de bacterias no cambian de México y Brasil, el genotipo con mayor presencia de bacterias fue el cv Señal, quien presentó todos los 10 géneros, seguido del genotipo LNR56 y *B. decumbens* cv Cayman quienes solo presentaron 7 géneros bacterianos respectivamente, los genotipos con menor número de géneros bacterianos expresados fueron: JMLS 010J (*Ochrobactrum anthropi*), Mulato II (*Enterobacter* sp.) e insurgentes (*Enterobacter asburiae*) con la presencia de un solo género de bacterias.

6. LITERATURA CITADA

- Adamowski, E. ., Plaguiarini, M., and Borges, C. 2008. Meiotic behavior in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae:Panicea). *J. Genetic* 87:33-38.
- Borges, D. V., and Pagliarini, M. S. 2009. Biology, Cytogenetics, and Breeding of *Brachiaria*. pp. 103-151. In: Genetic recosurses, chomosome engineering, and crop improvement. Singh, R.J. (ed.). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Cabral, G. B., Carneiro, V. T., Dusi, D. M., and Martinelli, A. P. 2016. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Brachiaria brizantha*. *Methods Mol. Biol.* 1359:395-402.
- Jungmann, L., Vigna, B., and Boldridrini, K. 2010. Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grasss *Brachiaria humidicola* base done microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. *Genome* 53:698-709.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.

- Hare, M. D., and Phaikaew, C. 2007. Seed production of two *Brachiaria* hybrid cultivar in north-east Thailand.3. Harvesting method. Faculty of Agriculture, Ubon Rachathamani University. Thailand.
- Miles, J. W. 2007. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Sci.* 239:S47.
- Miles, J. W., and Valle, C. B. 1996 Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. pp. 164-177. In: *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement* (ed). Miles J. W., Maass, B. L., and Valle C. B. CIAT-EMBRAPA.
- Morales-Valenzuela, G., Silva-Rojas, H. V., Ochoa-Martínez, D., Valadez-Moctezuma, E., Alarcón-Zúñiga, B., Zelaya-Molina, L. X., Córdova-Téllez, L., Mendoza-Onofre, L., Vaquera-Huerta, H., Carballo-Carballo, A., Farfán-Gómez, A., and Ávila-Quezada, G. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. *Plant Dis.* 91:1365-1365A.
- Mutai, C., Njuguna, J., and Ghimire, S. R. 2016. Bacterial community associated with *Brachiaria* spp. in Kenya. pp. 163-178. In: *Climate Smart Brachiaria Grasses for Improving Livestock Production in East Africa – Kenya Experience*. Njarui, D. M. G., Gichangi, E. M., Ghimire, S. R., and Muinga, R. W. (eds.). Kenya Agricultural and Livestock Research Organization, Nairobi, Kenya.
- Navarrete-Maya, R., Aranda-Ocampo, S., Rodríguez-Mejía, M. L., Moya-Hernández, S. L. y González-Ochoa, M. G. 2014. Bacterias fitopatógenas en semillas: su detección y regulación. *Rev. Mex. Fitopatol.* 32:75-88.
- Paula, C. M. P., Figueiredo, K. G., Souza-Sobrinho, F., Benites, F. R.G., Davide, L. C., and Techio, V. H. 2016. Microsporogenesis analysis validates the use of

- artificially tetraploidized *Brachiaria ruziziensis* in breeding programs. Genet. Mol. Res. 19;15(3). doi: 10.4238/gmr.15038737.
- Perez, A. J., Hussain, S. M., and Pacio, K. 2016 Ultrahigh-Performance liquid chromatography-high-resolution quadrupole time of flight mass spectrometry based metabolomics reveals key differences between *Brachiaria decumbens* and two similar pastures with different toxicities. J. Agric. Food Chem. 64:4686-4694.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., and Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539-542.
- Schaad, N. W., Jones, J., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide Identification Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota. USA. 373 pp.
- Silva-Rojas, H. V., Aguirre-Rayó, P., Uribe-Cortés, T. B., Oropeza-Navarro, R., and Aguirre-Rayó, J. M. 2015. Biofilm forming *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from chlorotic streak in maize. Phytopathology 105:S4.128.
- Silva-Rojas, H. V., Mahuku, G., and Esker, P. D. 2010. *Pantoea agglomerans*, a maize seed transmitted bacterium in Mexico. Phytopathology 100:S119.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30:2725-2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Torres-Gonzales, A. M., and Morton, C. M. 2005 Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria and Urocloa* (Poeaceae). *Mol. Phylog. Evol.* 37:36-44.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., and Palmer, J. D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryotic Microbiol.* 46: 327–338.
- Valerio, J. R., Lapointe, S. L., Kelemu, S., Fernandes, C. D., and Morales, F. J. 1996. Pest and diseases of *Brachiaria* species. pp. 87-105. In *Brachiaria: Biology, agronomy and improved*. Miles, J. W., Maass, B., and do-Valle, C. B. (eds.). Cali, Colombia: CIAT/Brasilia: EMBRAPA-CNPQC.
- Valle, C. B., Calixto, S., and Amezcuita, M. C. 1993. Agronomic evaluation of *Brachiaria* germplasm in Brazil. pp. 511-512. In: *Proceeding of the International Grassland Congress*. Palmerton North: New Zealand: NZGA, TGSA, NZSAP, ASAP-Qld and NZIAS.
- Valle, C. B., and Savidan, Y. H. 1996. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Briachiaria*. pp. 147-163. In: *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. Miles, J. W., Maass, B. L., and do Valle, C. B. (eds.). Cali Colombia: CIAT/Brasilia: EMBRAPA-CNPOC.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7:203-214.