

Influencia del fotoperiodo sobre algunos parámetros demográficos y calidad de la

Cochinilla

(*Dactylopius coccus*)

pág. 34

Año 7 • Volumen 7 • Número 3 • mayo-junio, 2014

EFFECTIVIDAD <i>in vitro</i> E <i>in situ</i> DE FUNGICIDAS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS EN EL CONTROL DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> y <i>Uromyces transversalis</i> EN GLADIOLA	3
CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE KEFIR	12
CONTROL BIOLÓGICO DE GARRAPATA (<i>Boophilus</i> spp.) CON DIFERENTES CEPAS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin EN BOVINOS	21
PRODUCCIÓN DE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (<i>Hypothenemus hampei</i> Ferr.)	29
EL LINÁLOE (<i>Bursera linanoe</i> (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), ESPECIE MADERABLE AMENAZADA: UNA ESTRATEGIA PARA SU CONSERVACIÓN	42
PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN, SU CULTIVO <i>in vitro</i> Y PLANTAS CON CAPACIDAD DESFAUNANTE	52

y más artículos de interés...

Guía para autores

Estructura

Agroproductividad es una revista de divulgación, auspiciada por el Colegio de Postgraduados para entregar los resultados obtenidos por los investigadores en ciencias agrícolas y afines a los técnicos y productores. En ella se podrá publicar información relevante al desarrollo agrícola en los formatos de artículo, nota o ensayo. Las contribuciones serán arbitradas y la publicación final se hará en idioma español.

La contribución tendrá una extensión máxima de 16 cuartillas, incluyendo las ilustraciones. Deberá estar escrita en Word a doble espacio empleando el tipo Arial a 12 puntos y márgenes de 2.5 cm. Debe evitarse el uso de sangría al inicio de los párrafos.

Las ilustraciones serán de calidad suficiente para su impresión en offset a colores, y con una resolución de 300 dpi en formato JPEG, TIFF o RAW y el tamaño, dependiendo de la imagen y su importancia de acuerdo con la tabla comparativa.

La estructura de la contribución será la siguiente:

1) Artículos: una estructura clásica definida por los capítulos: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones y Literatura Citada; 2) Notas o Ensayos: deben tener una secuencia lógica de las ideas, exponiendo claramente las técnicas o metodologías que se transmiten en lenguaje llano, con un uso mínimo de términos técnicos especializados.

Formato

Título. Debe ser breve y reflejar claramente el contenido. Cuando se incluyan nombres científicos deben escribirse en *itálicas*.

Autor o Autores. Se escribirán él o los nombres completos, separados por comas, con un índice progresivo en su caso. Al pie de la primera página se indicará el nombre de la institución a la que pertenece el autor y la dirección oficial, incluyendo el correo electrónico.

Cuadros. Deben ser claros, simples y concisos. Se ubicarán inmediatamente después del primer párrafo en el que se mencionen o al inicio de la siguiente cuartilla. Los cuadros deben numerarse progresivamente, indicando después de la referencia numérica el título del mismo (Cuadro 1. Título), y se colocarán en la parte superior. Al pie del cuadro se incluirán las aclaraciones a las que se hace mención mediante un índice en el texto incluido en el cuadro.

Figuras. Corresponden a dibujos, gráficas, diagramas y fotografías. Las fotografías deben ser de preferencia a colores. Se debe proporcionar originales en tamaño postal, anotando al reverso con un lápiz suave el número y el lugar que le corresponda en el texto. Los títulos de las fotografías deben mecanografiarse en hoja aparte. La calidad de las imágenes digitales debe ceñirse a lo indicado en la tabla comparativa.

Unidades. Las unidades de pesos y medidas usadas serán las aceptadas en el Sistema Internacional.

Tabla comparativa.

Centímetros	Pixeles	Pulgadas
21.59×27.94	2550×3300	8.5×11
18.5×11.5	2185×1358	7.3×4.5
18.5×5.55	2158×656	7.3×2.2
12.2×11.5	1441×1358	4.8×4.5
12.2×5.55	1441×656	4.8×2.2
5.85×5.55	691×656	2.3×2.2
9×11.5	1063×1358	3.5×4.5
9×5.55	1063×656	3.5×2.2



Contenido

3	EFFECTIVIDAD <i>in vitro</i> E <i>in situ</i> DE FUNGICIDAS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS EN EL CONTROL DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> y <i>Uromyces transversalis</i> EN GLADIOLA
12	CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE KEFIR
21	CONTROL BIOLÓGICO DE GARRAPATA (<i>Boophilus</i> spp.) CON DIFERENTES CEPAS DE <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metchnikoff) Sorokin EN BOVINOS
29	PRODUCCIÓN DE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (<i>Hypothenemus hampei</i> Ferr.)
34	INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CALIDAD DE LA COCHINILLA (<i>Dactylopius coccus</i>)
42	EL LINÁLOE (<i>Bursera linanoe</i> (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), ESPECIE MADERABLE AMENAZADA: UNA ESTRATEGIA PARA SU CONSERVACIÓN
52	PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN, SU CULTIVO <i>in vitro</i> Y PLANTAS CON CAPACIDAD DESFAUNANTE
58	EL HONGO <i>Verticillium hemileiae</i> Bouriquet, ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LA ROYA DEL CAFETO (<i>Hemileia vastatrix</i> Berk et Br.)
63	ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE VAINILLA (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews)
69	RELATORÍA: EL QUEHACER DE LOS LABORATORIOS DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASICA)



Corrección de estilo: Hannah Infante Lagarda

Maquetación: Alejandro Rojas Sánchez

Suscripciones, ventas, publicidad, contribuciones de autores:

Guerrero 9, esq. Avenida Hidalgo, C.P. 56220, San Luis Huexotla, Texcoco, Estado de México.

Teléfono: 01 (595) 928 4013 jocadena@colpos.mx; jocadena@gmail.com

Impresión 3000 ejemplares.

©Agroproductividad, publicación respaldada por el Colegio de Postgraduados. Derechos Reservados. Certificado de Licitud de Título Núm. 0000. Licitud de Contenido 0000 y Reserva de Derechos Exclusivos del Título Núm. 0000. Editorial del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Núm. 036.

Es responsabilidad del autor el uso de las ilustraciones, el material gráfico y el contenido creado para esta publicación.

Las opiniones expresadas en este documento son de exclusiva responsabilidad de los autores, y no reflejan necesariamente los puntos de vista del Colegio de Postgraduados, de la Editorial del Colegio de Postgraduados, ni de la Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

Impreso en México • Printed in México
 PRINTING ARTS MEXICO, S. de R. L. de C. V.
 Calle 14 no. 2430, Zona Industrial
 Guadalajara, Jalisco, México. C.P. 44940
 Fax: 3810 5567
www.tegrafik.com
 RFC: PAM991118 DGO

Directorio

Said Infante Gil
Editor General del Colegio de Postgraduados

Rafael Rodríguez Montessoro[†]
Director Fundador

Jorge Cadena Iñiguez
Director de Agroproductividad

Comité Técnico-Científico

Colegio de Postgraduados—Montecillo
Fernando Clemente S.
Dr. Ing. Agr. Catedrático Fauna Silvestre

Ma. de Lourdes de la Isla
Dr. Ing. Agr. Catedrática Aereopolución

Ángel Lagunes T.
Dr. Ing. Agr. Catedrático Entomología

Enrique Palacios V.
Dr. Ing. Agr. Catedrático Hidrociencias

Jorge Rodríguez A.
Dr. Ing. Agr. Catedrático Fruticultura

Colegio de Postgraduados—Puebla
Manuel R. Villa Issa
Dr. Ing. Agr. Economía Agrícola

Instituto de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Pedro Cadena I.
Dr. Ing. Agr. Transferencia de Tecnología

Ricardo Magaña Figueroa
M. C. P. Director de Promoción y Divulgación

Confederación Nacional Campesina
Jesús Muñoz V.
Dr. Ing. Agr. Agronegocios

Instituto Interamericano de
Cooperación para la Agricultura
Victor Villalobos A.
Dr. Ing. Agr. Biotecnología



Dr. Jorge Cadena Iñiguez

Editorial

Volumen 7 • Número 3 • mayo–junio, 2014.

En este mes de junio recordamos el relevo en la revista **AP AGRO PRODUCTIVIDAD**, la cual fue fundada en el 2008, por el Dr. Rafael Rodríguez Montessoro, quien fue notable académico del Colegio de Postgraduados, y un actor importante en la ciencia, docencia y administración. Fue además un académico comprometido con la transferencia del conocimiento a los usuarios; percibiendo las complejidades de la ciencia y el compromiso de su divulgación. Uno de los objetivos iniciales fue atender el área de extensión del conocimiento hacia la sociedad, partiendo de la formación de talentos e investigación como medios de generación, transmisión y aplicación del conocimiento en forma articulada. Una premisa importante para el Dr. Rodríguez Montessoro, fue traducir los avances en ciencias agrícolas tanto del Colegio, como de otras instituciones relacionadas a un plano socialmente horizontal, reduciendo la verticalidad del conocimiento para evitar el aislamiento y pérdida de vigencia social. Con esas premisas se diseñó la revista en un formato accesible en su lenguaje gráfico y escrito, de tal forma que su contenido tuviera el alcance de transmisión del mensaje científico hacia los académicos, técnicos extensionistas, productores y público en general, de tal forma que la divulgación de la ciencia llegue hacia aquellos que requieren de sus productos; y promueva el vínculo virtuoso denominado: la culturización a través de la técnica, que ha permitido a las sociedades que la ejercitan, alcanzar el aprendizaje y madurez social de sus miembros. Actualmente Agroproductividad está inscrita en índices como CONACyT, Latindex, EBSCO, Master Journal List de Thomson Reuters, base de datos del USDA y Cengage Learning, Inc.

Jorge Cadena Iñiguez
Director de **AP AGRO**
PRODUCTIVIDAD

EFECTIVIDAD *in vitro* E *in situ* DE FUNGICIDAS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y *Uromyces transversalis* EN GLADIOLA

In vitro AND *in situ* EFFECTIVENESS OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL FUNGICIDES ON CONTROL OF *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* AND *Uromyces transversalis* IN GLADIOLA

Michel-Aceves, A.C.¹; Ariza-Flores, R.², Otero-Sánchez, M.O.¹
Barrios-Ayala, A.²; Quiroz-Millán, A.M.¹

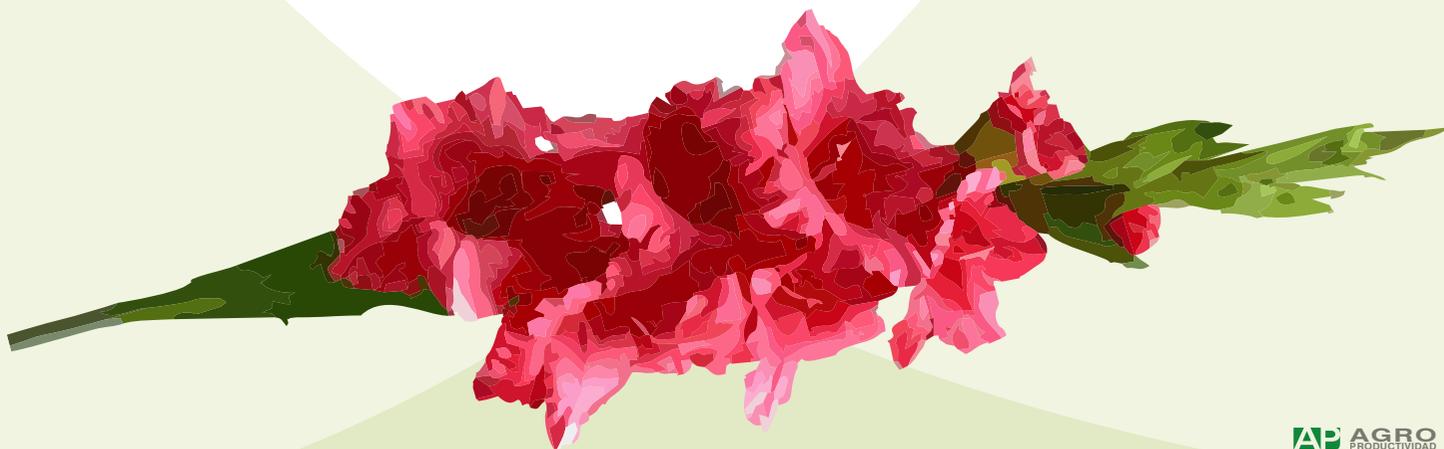
¹Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Vicente Guerrero No. 81, Colonia Centro, Iguala, Guerrero. CP 40000, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero), Campo Experimental Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan km 2. Iguala, Gro. México.

Autor responsable: amichelaceves@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se evaluó la efectividad *in vitro* e *in situ* de los fungicidas sintéticos Procloraz+Tiofanato-metilico y Metalaxil+Clorotalonil y los biológicos (*Trichoderma* spp., y *Bacillus subtilis*) en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (*Fog*) y *Uromyces transversalis* en gladiola. *In vitro* se realizaron tres ensayos: prueba de celofán, cultivo dual y prueba de fungicidas. Un ensayo *in situ* con cinco tratamientos: dos fungicidas sintéticos, dos biológicos y un testigo, unidad experimental de cuatro surcos de 0.8 m de ancho por 7 m de largo. Las variables: altura de planta, incidencia, severidad y rendimiento. Los datos de cada bioensayo se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey. *In vitro*, de los productos biológicos, *Trichoderma asperellum* cepa 8 inhibió 60.6% el micelio de *Fog* con antagonismo clase dos y *Bacillus subtilis* no fue efectivo; de los químicos la mezcla de Procloraz+Tiofanato-metilico, 98.3%. *In situ*, la incidencia y severidad de *U. transversalis* fue nula donde se aplicaron los productos. En *Fog*, la mezcla Procloraz+Tiofanato-metilico logró reducir la severidad 47% y 30.9% con *T. asperellum*. En esta zona, donde la incidencia y severidad de *Fog* es alta, se tiene un producto sintético que es bueno y requiere seguir buscando cepas nativas efectivas.

Palabras clave: *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, control biológico.



ABSTRACT

The *in vitro* and *in situ* effectiveness of Prochloraz+Tiofanato-methylic synthetic fungicides and Metalaxil+Clorotalonil, as well as biological ones (*Trichoderma* spp., and *Bacillus subtilis*), on control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (*Fog*) and *Uromyces transversalis* in gladiola, was evaluated. For *in vitro* three assays were carried out: cellophane test, dual cultivation and fungicide test. An *in situ* assessment with five treatments: two synthetic fungicides, two biological and one control, with an experimental unit of four furrows, 0.8 m wide by 7 m long. The variables: plant height, incidence, severity and yield. The data from each bioassay underwent variance analysis and Tukey test. *In vitro*, of the biological products, strain 8 of *Trichoderma asperellum* inhibited the *Fog* mycelium with antagonism class two in 60.6%, and *Bacillus subtilis* was not effective; of the chemicals, the mixture of Prochloraz+Tiofanato-methylic in 98.3%. *In situ*, the incidence and severity of *U. transversalis* was null where the products were applied. In *Fog*, the Prochloraz+Tiofanato-methylic mixture reduced the severity in 47% and *T. asperellum* in 30.9%. In this area, where the incidence and severity of *Fog* is high, there is a synthetic product that is good and it is required to continue searching for effective native strains.

Key words: *Trichoderma asperellum*, *Bacillus subtilis*, biological control.

INTRODUCCIÓN

La gladiola (*Gladiolus grandiflorus*) es una flor económicamente importante en el mundo, apreciada como ornamental por su diversidad de colores llamativos; se utiliza como planta de paisaje en jardines, exhibición y como flor de corte. En México las condiciones agroclimáticas son favorables para su cultivo; la superficie sembrada en 2011 alcanzó un total de 3,714.5 ha⁻¹, con una producción de 3,858,073.32 t ha⁻¹. Los estados productores son Puebla, México, Morelos, Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Guerrero; este último cuenta con 365 ha⁻¹ cultivadas, equivalentes a 698.8 t ha⁻¹ de producción (SIAP, 2012), y representa la fuente de empleo y sustento de hasta 80% de la población en comunidades como La Concepción, Guerrero.

En la producción de la gladiola existen problemas fitosanitarios que conllevan a pérdidas económicas y las de mayor importancia por su incidencia son *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (*Fog*), que ocasiona la pudrición del cormo; *Uromyces transversalis* (*Ut*), que provoca la roya en el follaje. De las variedades comerciales, las de color rojo y blanco son más susceptibles y para su control se aplican diversos agroquímicos, tales como carbendazim, clorotalonil (Chandel y Bhardwaj, 2000) y benomilo (Ram et al., 2004), y su uso continuo contamina el ambiente; tienen efecto residual y generan resistencia a los patógenos (Riaz et al., 2008; Nazir y Riazuddin, 2008). En este sentido se requiere evaluar métodos de control más eficientes y sustentables, tales como los biológicos y de manejo cultural que faciliten reducir o eliminar el uso de agroquímicos de origen sintético, además de integrar métodos para un manejo cultural de la enfermedad (Chandel y Deepika, 2010). Dentro de las alternativas biológicas se han evaluado especies como *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* y *T. virens*, así como al hongo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae*, la bacteria *Bacillus subtilis*, extractos vegetales e, inclusive, se ha recurrido a la transformación genéti-

ca para resistencia a la enfermedad (Chandel y Deepika, 2010). Autores como Khan y Mustafa, (2005) han reportado que, aplicada al suelo, la mezcla de *T. harzianum* (T014) y *Pseudomonas fluorescens* (PS07) reduce la infección por *Fog* e incrementa el rendimiento, comparado con el uso de carbendazim a 200 ppm; sin embargo, se requiere un uso más extensivo del control biológico y la búsqueda de agentes bio-controladores eficientes y preferentemente nativos que sean capaces de competir con el patógeno en el mismo nicho ecológico. Con base en lo anterior se evaluó la efectividad biológica de *B. subtilis*, cepa comercial y cepas nativas de *Trichoderma* spp., como alternativa de control biológico, y fueron comparados con los fungicidas sintéticos de uso común por el productor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo, aislamiento e identificación de microorganismos

Para aislar *Trichoderma* spp. nativo, en el mes de octubre se colectó suelo de un terreno donde el ciclo anterior se había sembrado gladiola en la comunidad de La Concepción, municipio de Pilcaya, Guerrero (18°46' N y 99°44' O) a 1370 m de altitud. Para aislar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* se utilizaron cormos recién cosechados con síntomas de la enfermedad. En el caso de *U. transversalis* no fue posible cultivarlo en laboratorio por tratarse de un hongo parásito obligado. El aislamiento e identificación de *Trichoderma* spp. nativo se hizo directamente del suelo por el método de dilución en placa (Singleton et al., 1992; Michel-Aceves et al., 2009) y las colonias se identificaron por su crecimiento típico y características

morfológicas (Barnett y Hunter, 1999). *F. oxysporum* f sp *gladioli* (Fog) se aisló de cormos recién cosechados con síntomas de la enfermedad (Leslie y Summerell, 2006). Las colonias se identificaron por la forma y dimensión de micro y macroconidios con claves del género (Nelson et al., 1983; Seifert, 1996; Leslie y Summerell, 2006). Para la extracción de ADN se utilizó la metodología propuesta por Arhens y Seemüller (1992), donde las secuencias de nucleótidos se compararon con las de la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Bioensayo *in vitro* I. Prueba de celofán

Se evaluaron los metabolitos de *Trichoderma* spp., (Dennis y Webster, 1971), se sembró al hongo antagonista en cajas Petri con medio de cultivo PDA y papel celofán, a los dos días se retiró el celofán y en esa misma caja se sembró a *Fog*. Se midió el diámetro del crecimiento radial hasta que el testigo llenó la caja Petri (12 días). Se tuvieron nueve tratamientos que correspondieron a ocho cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas, y el testigo *Fog*, distribuido en un diseño experimental completamente al azar, con ocho repeticiones. El crecimiento micelial de *Fog* se midió en cm y el porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación: % de inhibición = $[(D1-D2)/D1 \times 100]$ (Arzate-Vega et al., 2006); donde: D1=diámetro de la colonia de *Fog* creciendo en cajas con PDA libre de inhibidores y D2 =diámetro de la colonia fungosa de *Fog* creciendo en cajas con PDA, donde anteriormente creció *Trichoderma* spp., sobre el papel celofán, impregnando al medio de cultivo enzimas y metabolitos secundarios producidos.

Bioensayo *in vitro* II. Actividad antagonica de *Trichoderma* spp., sobre *Fog*.

Se utilizó la técnica de cultivo apareado o dual (Cherif y Benhamou, 1990). Para cada tratamiento se sembró en un extremo de cajas Petri con PDA a *Fog* y se dejó crecer durante tres días; posteriormente, en el otro extremo de la caja se sembró *Trichoderma* spp. Se tuvieron ocho tratamientos que correspondieron a las cepas nativas de *Trichoderma* spp., distribuidas bajo un diseño completamente al azar con ocho repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por una caja petri. Se tomaron lecturas cada 24 h para observar el número de días al primer contacto entre las hifas de los hongos, medir el crecimiento de *Trichoderma* spp., de *Fog* y la zona de intersección. A los 15 días después de la siembra se clasificó el tipo de antagonismo según Bell et al. (1982).

Bioensayo *in vitro* III. Evaluación de fungicidas

Se utilizaron los productos sintéticos Metalaxil+Clorotalonil (Blazon®), Procloraz (Sportak®)+Tiofanato metílico (Cercobin®) y el producto biológico a base de *Bacillus subtilis* (Serenade®) y un testigo sin productos. Los cuatro tratamientos se distribuyeron bajo un diseño experimental completamente al azar con ocho repeticiones; se generaron 32 unidades experimentales (una caja Petri). Los fungicidas se depositaron en el fondo de cada caja petri y se les agregó 15 mL de PDA líquido; se agitó suavemente hasta disolverlos y se dejó solidificar a temperatura ambiente. En el centro de la caja se sembró a *Fog* y el diámetro de la colonia se midió diariamente por diez días. Las variables fueron el crecimiento micelial y el porcentaje de inhibición.

Bioensayo *in situ*: Control biológico y químico de *Fog*. Material vegetal

Se utilizó la variedad de gladiola roja borrega (*Gladiolus grandiflorus*), la cual tiene tallo vigoroso de color verdorosado con buena aceptación en el mercado por su vistosidad y vida de anaquel; sin embargo, es muy susceptible a enfermedades.

Tratamientos y diseño experimental en campo

Se evaluaron cinco tratamientos. Los fungicidas sintéticos Metalaxil+Clorotalonil (Blazon®) y (Procloraz (Sportak®)+Metil Tiofanato (Cercobin®), así como los biológicos *Bacillus subtilis* (Serenade®), *Trichoderma asperellum* nativo (Ta8) y el testigo, distribuidos bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental consistió de cuatro surcos de 0.8 m de ancho por 7 m de largo y la parcela útil en los dos surcos centrales, dejando 0.5 m en cada extremo por efecto de orilla. Antes del sembrado se desinfectaron los cormos por inmersión de 15 min en un contenedor que contenía el producto, según su tratamiento. Éstos se sembraron en hilera a 5 cm de distancia cada uno. Se realizó la primera fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio (N-P-K) al momento de la siembra con 10 kg de la mezcla 71_N-52_P-00_K y la segunda 45



días después con 30 kg de $17_N-17_P-17_K$, además de aplicaciones foliares de micro-nutrientes con los productos comerciales Viretrol 20500 y PK Suprem.

Preparación y aplicación de los productos

La cepa de *Trichoderma* spp., fue multiplicada de la cepa nativa 8 (*T. asperellum*) en olote molido estéril (Arzate-Vega *et al.*, 2006). Se contabilizó el número de esporas en una cámara de Neubauer y se ajustó a 1×10^8 esporas mL^{-1} . El fungicida biológico con *Bacillus subtilis* (Serenade®) (3 kg ha^{-1}) y los fungicidas sintéticos Procloraz (Sportak®)+Tiofanato-metil (Cercobin®) ($0.5 \text{ L ha}^{-1}+1.0 \text{ kg ha}^{-1}$) y Metalaxil+Clorotalonil (Blasón®) ((Blasón®) (dosis 3 kg ha^{-1}), fueron adquiridos comercialmente y se aplicaron en las dosis indicadas. Los productos se aplicaron al momento de la siembra y cada 10 días por siete ocasiones en el nudo vital de la planta y al follaje. La cosecha se realizó cada tercer día durante 10 cortes. Se contabilizó el número de tallos florales por corte y el total para ser transportados y comercializados en la Central de Abastos (CEDA) del estado de México.

Variables de Estudio

Altura de la planta, incidencia de *Fog* (% de incidencia = número de plantas con síntomas $\times 100$ / número total de plantas), severidad (% de severidad = número de plantas muertas $\times 100$ / número total de plantas) y rendimiento. Los datos obtenidos de cada ensayo se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS (1999). En el caso de los datos en porcentajes, antes de someterlos al ANVA y prueba de Tukey, se les realizó la transformación con la fórmula: raíz cuadrada del promedio más 0.5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del tejido infectado del cormo de gladiolo se aisló, purificó e identificó la especie de *Fog* en PDA. El micelio es blanco con ligera pigmentación violeta pálido al reverso de la caja, microconidios de forma oval divididos en su mayoría por un septo, macroconidios de tamaño corto dividido por tres septos, de forma apical enganchado, la forma basal claramente con muesca, con una longitud de 50.5 a 67.5 μm . No se observaron clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006). Se confirmó con la identificación molecular al comparar las secuencias con el banco de genes (*F. oxysporum* f. *gladioli* DQ279795 *F. oxysporum* FJ545244). Se aislaron ocho cepas nativas de *Trichoderma* spp. con las características típicas del género (Barnett y Hunter, 1999). Se identificó a

nivel de especie la cepa nativa ocho que fue mejor en los ensayos *in vitro*, primero con base en las características morfológicas con las claves de Rifai (1969) y Bisset (1991), y correspondió a la especie *T. asperellum*. Se confirmó con la identificación molecular al comparar secuencias con las del banco de genes (gi|169117643|gb|EU280122.1|*Trichoderma asperellum* strain GJS.1110 0.0).

Estos resultados son relevantes, tal como los obtenidos por Arzate-Vega *et al.* (2006) quienes aislaron 25 cepas en 15 huertas de plátano (*Musa* spp.) en Tenexpa, Guerrero, y similares a los obtenidos por Michel-Aceves *et al.* (2009) de suelo colectado en otoño de la huerta de mango en Tuxpan, Guerrero. Es importante señalar y resaltar que la estación del año pudo influir en la densidad de población de *Trichoderma* spp. Harman (2002) ha reportado altas poblaciones en primavera y verano, comparado con otoño e invierno de zonas templadas en suelos forestales donde la temperatura y la humedad fueron parámetros de importancia en la distribución natural de *Trichoderma* spp. en suelo, además de la influencia del manejo de huertas mediante el uso excesivo de productos químicos sobre la dinámica poblacional; tal es el caso del fungicida Benomilo (Ahmad y Baker, 1987) y la aplicación de citrolina (aceite agrícola), o bien, por presencia de saprofitos que compiten por espacio y nutrientes. En el bionsayo I la cepa 8 sobresalió significativamente a los 21 días ($P \leq 0.0281$) con el menor crecimiento (Cuadro 1) y el mayor porcentaje de inhibición (60.6%). Las cepas dos y tres mostraron crecimiento semejante al del testigo y no manifestaron inhibición. En

Cuadro 1. Crecimiento micelial y porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* por *Trichoderma* spp. a los 21 días después de la siembra.

No. Tratamiento	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)
Cepa 1	3.7 ab ²	18.3 bcd
Cepa 2	4.5 a	0.0 d
Cepa 3	4.5 a	0.0 d
Cepa 4	3.2 b	37.8 b
Cepa 5	3.8 ab	12.2 cd
Cepa 6	3.6 ab	23.9 bc
Cepa 7	3.6 ab	20.6 bc
Cepa 8	1.6 c	60.6 a
Testigo	4.5 a	0.0 d

² Medias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey ≤ 0.5).

trabajos similares realizados por diferentes autores se reportan valores superiores e inferiores a los obtenidos en esta investigación; por ejemplo, Michel-Aceves *et al.* (2005a) indicaron 77.8% de inhibición en *Fo* f. sp. *lycopersici* con cepas nativas de *Trichoderma* spp. Otros, como Aquino-Martínez *et al.* (2008), evaluando *in vitro* la inhibición de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* con cepas de *Trichoderma* spp., obtuvieron valores de 42.08% a 64.81%. En otra investigación Michel-Aceves *et al.* (2009) indicaron un porcentaje de inhibición sobre *Fo* de 62.9%. Estas diferencias podrían deberse entre otras causas a la especie de *Trichoderma* spp., sitio de procedencia y potencial antagonístico ante la producción de quitinasas y glucanasas, las cuales son diferentes en cada una de ellas e inclusive en cepas de la misma especie (Harman, 2002).

Al respecto, Vargas-Hoyos *et al.* (2012) indica que de 27 aislamientos de *Trichoderma* spp., las cepas T46 y T109 de *T. asperellum* crecieron en un amplio rango de temperaturas y mostraron capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes, registrando el mayor porcentaje de inhibición entre 20 °C y 30 °C, el cual fue superior a 75% sobre *Rhizoctonia* sp. y *Colletotrichum* sp.

En el cultivo dual el crecimiento de ambos hongos fue significativamente diferente a los 17 días después de siembra (dds) (Cuadro 2); en el caso de *Trichoderma* spp. sobresalió ($P \leq 0.0032$) la cepa seis con 4.37 cm, mientras que en *Fog* ($P \leq 0.0100$) la cepa dos obtuvo el mayor crecimiento con 1.22 cm. Es importante observar la zona de intersección pues entre mayor sea el

área de contacto, mayor es la agresividad por parte del hongo antagonístico (Michel-Aceves *et al.*, 2005a). La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio (Dennis y Webster, 1971). Esta variable fue visible para las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y de las ocho aisladas, solo tres en diferente medida a *Fog*, y en cinco de ellas no existió zona de intersección. Las cepas dos y tres fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.0094$) con 3.22 cm y 3.00 cm, respectivamente (Cuadro 2).

Sousa Rocha y Oliveira (1998) reportan de 1.93 a 4.5 cm de la zona de intersección de diferentes especies de *Trichoderma* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Asimismo, Michel-Aceves *et al.* (2008) obtuvo valores de 0.54 y de 2.47 cm entre *Trichoderma* con *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*, respectivamente. Utilizando un producto comercial a base de *Trichoderma*

lignorum, *T. harzianum* cepa Thzcf-12 y *T. harzianum* Thzn-2 nativa en el control *in vitro* de *Fo* y *F. subglutinans*, agentes causales de la "escoba de bruja" del mango (Michel-Aceves *et al.*, 2009) reporta la mayor zona de intersección con *T. lignorum* (0.87 cm) contra *Fo*, Thzcf-12 (0.77 cm) y la cepa nativa Thzn-2 con 0.85 cm, todos ellos menores a los obtenidos en la presente investigación.

Las hifas de *Trichoderma* spp., tuvieron contactos con las hifas de *Fo* en diferentes tiempos; a pesar de que se dieron dos días de ventaja a *Fog* por su lento crecimiento, y se observó que *Trichoderma* spp., se comportó de forma agresiva. Los valores oscilaron significativamente entre uno y seis días para la mayoría de las cepas, excepto la cepa cinco que no mostró contacto alguno. Yates *et al.* (1999) registraron en una cepa aislada de *T. virens* seis días para el contacto en *F. moniliforme*. Michel-Aceves *et al.* (2005b), reportó sobre *Fo* f. sp. *lycopersici* valores entre cinco y siete días, y

Cuadro 2. Valores de crecimiento de las cepas en cultivos duales de *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* a 17 días después de siembra.

Cepas	Crecimiento <i>Trichoderma</i> spp.	Crecimiento <i>Fog</i>	Zona de intersección (cm)	Días 1 ^{er} contacto	Clase Antagonismo
Cepa 1	3.15 b ^x	1.05 ab	0.00 b	1 cd	2 ^y
Cepa 2	3.40 b	1.22 a	3.22 a	5 ab	1
Cepa 3	3.55 b	1.00 abc	3.00 a	6 a	1
Cepa 4	3.50 b	0.82 bc	0.00 b	4 ab	2
Cepa 5	3.52 b	0.80 bc	0.00 b	0 d	2
Cepa 6	4.37 a	0.77 c	1.07 b	4 ab	2
Cepa 7	3.55 b	0.87 bc	0.00 b	3 bc	2
Cepa 8	3.37 b	0.75 c	0.00 b	5 ab	2

^x Medias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey ≤ 0.5). ^y Clase de antagonismo según Bell *et al.*, 1982 (1=*Trichoderma* sobrecrece al patógeno y cubre toda la superficie del medio; 2=*Trichoderma* crece en 75% de la superficie del medio, detiene el crecimiento del fitopatógeno y no lo puede sobrecrecer).

Arzate-Vega *et al.* (2006) reportaron contacto a las 24 h después de la inoculación de ocho cepas de *Trichoderma* spp., a pesar de haber dado 16 días de ventaja a *M. fijiensis*. Finalmente, Michel-Aceves *et al.* (2009) registraron valores entre tres y cuatro para *Fo*, donde las cepas de *T. harzianum* Thzn-2 nativa y Thzcf-12 fueron más agresivas en comparación con *T. lignorum*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2007), quienes observaron inhibición de crecimiento de micelio y sobre posición de las colonias de *Thielaviopsis paradoxa* por cepas nativas de *Trichoderma* spp., atribuyendo este modo de acción al micoparasitismo.

Las cepas dos y tres presentaron antagonismo clase uno y todas las cepas restantes clase dos (Cuadro 2). Sousa Rocha y Oliveira (1998) reportaron de 20 cepas de *Trichoderma* spp para *C. gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii* sólo tres de clase uno y dos; en las demás cepas el fitopatógeno fue más agresivo con clase cinco (Michel-Aceves *et al.*, 2005b) y Arzate-Vega *et al.* (2006) reportaron antagonismo tipo uno en seis cepas de *Trichoderma* spp., sobre *M. fijiensis*.

En la prueba *in vitro* de los fungicidas (valores medidos a los dos, ocho y 16 dds) fueron ascendentes conforme pasaron los días (Cuadro 3). El porcentaje de inhibición a los 16 dds para la mezcla Procloraz+Tiofanato metílico provocó el menor crecimiento para *Fog* con 0.07 cm y, por consiguiente, la mayor inhibición con 98.33%, mientras que los biológicos como *B. subtilis* registraron 58.89%. Al respecto, El-Hassan *et al.* (2004) indican que *B. subtilis* presentó 69% de control de *F. oxysporum* f. sp. *Lentis* bajo condiciones de invernadero y Cao *et al.* (2011) reportaron control *in vitro* de *Fo* f. sp. *cucumerinum* con *B. subtilis* SQR 9 al obtener 65% de inhibición.

En ensayos *in vitro* con *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. contra fitopatógenos comunes en cultivos de tomate, chile y cebolla, Izzeddin y Medina (2011) demostraron que el crecimiento de *Fusarium*, *Rhizoctonia* spp. y *Phytophthora* spp. se inhibe. *Trichoderma viride* mostró la mayor eficiencia significativa que *B. subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. En este sentido, algunos autores señalan que *Trichoderma* spp. debe ser estudiada con una mayor atención en temas de control biológico, ya que su actividad resulta de una combinación de micoparasitismo y una producción de metabolitos capaces de controlar un gran número de plagas (Stefanova *et al.*, 1999).

En el ensayo de campo, la altura de planta osciló entre 69 cm y 95 cm a los 77 dds, sin diferencias estadísticas; la mayor altura se presentó donde se aplicó *T. asperellum* (Cuadro 4). Al respecto, al aplicar micorrizas (*Glomus* sp.) Zac. 19 y *G. aggregatum* para el control de *F. oxysporum* en el cultivo de gladiola variedad Fany Roja, Khalil *et al.* (2001) reportaron alturas de 80 cm a 90 cm a los 120 dds, lo cual fue coincidente con los valores registrados en esta investigación, pero en menor tiempo. Se observaron diferencias evidentes de incidencia y severidad para los fitopatógenos en estudio. En el caso de *U. transversalis* fue nula en los tratamientos, excepto en el testigo, donde se presentó al final del ciclo del cultivo en una incidencia de 10% y severidad de 1%. En cambio, la incidencia de *Fog* fue de 90% en todos los tratamientos (Cuadro 4). Respecto a la severidad, la mezcla de Procloraz+Tiofanato metílico presentó la menor cantidad de plantas enfermas (639) y redujo la severidad 47% respecto al testigo con 1206 plantas enfermas.

Vergara (2010) aplicó en árboles de manzano *B. subtilis* en dosis de 8 kg ha⁻¹ y cepas nativas de *Trichoderma* spp., en floración, cosecha y postcosecha. No reportan daños en floración; sin embargo,

Cuadro 3. Efectividad de fungicidas *in vitro* sobre el crecimiento e inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*.

Tratamiento	Crecimiento (cm)			Inhibición (%)		
	Día 2	Día 8	Día 16	Día 2	Día 8	Día 16
Metalaxil+Clorotalonil	0.1 c ^z	0.4 c	1.05 c	82.32 b	87.03 b	76.67 b
Procloraz+Tiofanato M	0.0 d	0.0 d	0.07 d	100.00 a	100.00 a	98.33 a
<i>Bacillus subtilis</i>	0.2 b	0.1 b	1.85 b	70.72 c	66.39 c	58.89 c
Testigo	0.6 a	2.9 a	4.50 a	0.00 d	0.00 d	0.00 d

^z Medias dentro de las columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey \leq 0.5).

Cuadro 4. Efectividad de productos sobre la altura de planta, porcentaje de severidad y rendimiento ha^{-1} en condiciones de campo.

Tratamiento	Altura planta	Plantas enfermas		Plantas Cosechadas ha^{-1}
		No.	Severidad (%)	
Procloraz+Tiofanato Metílico	83.70	639	28.53 b	178,683 a
Metalaxil+Clorotalonil	90.20	923	41.21 ab	146,987 ab
<i>Trichoderma asperellum</i> nativo	95.00	924	41.25 ab	146,875 ab
<i>Bacillus subtilis</i>	74.00	975	43.53 a	141,183 b
Testigo	90.25	1206	53.84 a	115,402 b

^z Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey \leq 0.5).

en cosecha indicaron una baja incidencia de *Alternaria alternata* y la ausencia total de *Botrytis cinérea*. En postcosecha (tres meses de almacenaje más siete días a temperatura ambiente) indicaron buen control, con incidencia de *B. cinérea* y de *A. alternata* de 3% y 22% respectivamente. Estos resultados fueron más relevantes en el control de la enfermedad a los obtenidos en el presente trabajo con incidencia de 90% de *Fog*.

Debe existir gran cantidad de esporas de *Fog* en los suelos de la Concepción, Guerrero, a pesar de que realizan rotación de cultivos (gladiola-frijol-maíz-cebolla) porque los beneficios de los fungicidas sintéticos y más aún de los biológicos no se ven reflejados; sin embargo, es importante seguir aplicando biológicos para que se establezcan en el lugar. En este sentido, bajo condiciones de invernadero, Cao *et al.* (2011) evaluaron el efecto del bio-fertilizante orgánico (BIO) con *B. subtilis* SQR 9 en el control de la pudrición por *Fo* f. sp. *cucumerinum*, registrando reducción significativa de la incidencia (49%-65%) de la pudrición en comparación con el testigo cuando se aplicó el BIO. Más aún, detectó por PCR la población del fitopatógeno en la rizosfera (10^6 cfu g^{-1} de raíz) y

fue significativamente menor en las plantas tratadas con BIO que en el testigo. Estos resultados indican que la cepa es capaz de sobrevivir en la rizosfera y proteger a la planta del fitopatógeno.

Se cosecharon 145,826 plantas en promedio; el tratamiento donde se aplicó la mezcla de los fungicidas sintéticos Procloraz+Tiofanato metílico obtuvo significativamente la mayor cantidad de plantas por hectárea, con 178,683 (Cuadro 4), mientras que *B. subtilis* y el testigo obtuvieron las menores cantidades. De acuerdo con Sierra (2009), en el estado de Michoacán, México se obtienen 1000 gruesas ha^{-1} de gladiolas (140,000 tallos florales), partiendo de 140,000 plantas ha^{-1} , cantidad inferior a la obtenida en la presente investigación, en la que se cosecharon 145,826 plantas ha^{-1} en promedio, a pesar de los altos porcentajes de severidad por *Fog*.

CONCLUSIONES

La evaluación *in vitro* de los productos biológicos *Trichoderma asperellum* cepa 8 inhibió 60.6% el micelio de *Fog* con antagonismo clase dos, mientras que *Bacillus subtilis* no fue efectivo; de los agroquímicos sintéticos, la mezcla de Procloraz+Tiofanato-metílico fue

efectiva en 98.3%. En la evaluación *in situ*, la incidencia y severidad de *U. transversalis* fue nula donde se aplicaron los agroquímicos. En *Fog*, la mezcla Procloraz+Tiofanato-metílico logró reducir la severidad en 47% y con *T. asperellum* en 30.9%. En ésta zona, donde la incidencia y severidad de *Fog* es alta, se tiene un producto sintético que es eficiente y se requiere continuar buscando cepas nativas con mayor efectividad.

LITERATURA CITADA

- Ahrens U., Seemüller N. 1992. Detection of DNA plant pathogenic mycoplasma by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16SrRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Ahmad J.S., Baker R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77:182-189.
- Aquino-Martínez J.G., Vázquez-García L.M., Reyes-Reyes B.G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans., con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:127-137.
- Arzate-Vega J., Michel-Aceves A.C., Domínguez-Márquez V.M., Santos-Emética O.A. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp., sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoca negra

- del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:98-104.
- Andrews J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635
- Barnett H.L., Hunter B.B. 1999. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4a Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Bell D.K., Well H.D., Markham C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
- Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372.
- Cao Y, Zhang Z, Ling N, Yuan Y, Zheng X, Shen B and Shen Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils* 47: 495-506.
- Chandel SS and Bhardwaj LN. 2000. Effect of sowing dates and fungicidal treatment on the management of *Fusarium* wilt of gladiolus. *Plant Disease Research* 15(1):24-27.
- Chandel S.S., Deepika R. 2010. Recent advances in management and control of *Fusarium* yellows in *Gladiolus* species. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18(2):361-380.
- Chérif M., Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Phytopathology* 80:1406-1414.
- Dennis C., Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57:25-39.
- El-Hassan S., Gowen S.R., Bayaa B. 2004. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* filtrate to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, the causal organism of lentil vascular wilt. *IOBC Bulletin* 27(1): 53-58.
- Harman G.E. 2002. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Cornell University, Geneva, N.Y. www.iicasaninet.net/pub/sanueg/html (Consulta: Octubre 29/10/05).
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Izzeddin A.N., Medina T.L. 2011. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus* 15:8-18.
- Khalil G.A., Centina A.V.M., Ferrera-Cerrato R., Velásquez M.J., Pérez M.C.A., Larqué S.M. 2001. Hongos micorrizicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp., en gladiola. *Terra* 19:259-264.
- Khan M.R., Mustafa U. 2005. Corm rot and yellows of gladiolus and its biomanagement. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 208-215.
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. First edition. Blackwell Publishing Profesional. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Michel-Aceves A.C., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R., Ochoa-Moreno M.E., Mesina-Escamilla J.C., Samuels G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154-160.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sanchez M.A., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A. 2005a. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 11(12):273-27.
- Michel-Aceves A.C., Reyes-De La Cruz A., Otero-Sánchez M.A., Rebolledo-Domínguez O., Lezama-Gutiérrez R. 2005b. Potencial Antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:284-291.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sánchez M.A., Martínez-Rojero R.D., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A., Rebolledo-Martínez A. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances en Investigación Agropecuaria* 12:55-68.
- Michel-Aceves A.C., Otero-Sanchez M.A., Solano-Pascacio L.Y., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A., Rebolledo-Martínez A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:18-26.
- Nazir I.A., Riazuddin S. 2008. New approaches to generate disease resistant gladiolus. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 367-378.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 193 p.
- Ram R., Manuja S., Dhyani D., Mukherjee D. 2004. Evaluations of fortified fungicide solutions in managing corm rot disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 23:783-788.
- Riaz T., Khan S.N., Javali N. 2008. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium oxysporum*. The cause of corm rot disease of gladiolus. *Mycopathology* 6: 13-15.
- Rifai M.A. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers* 116:1-56
- Sánchez V., Rebolledo O., Picaso R.M., Cárdenas E., Córdova J., González O., Samuels G.J. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. *Mycopathologia* 163:49-58.
- SAS. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- Seifert K. 1996. *Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada. Ottawa, Ontario. 65 p. Obtenido de la red: http://res.agr.ca/brd/fusarium/home_1.html. (consulta, febrero 2013).
- SIAP. 2012. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Producción Agrícola en ciclos y perennes modalidad riego más temporal para la gladiola (gruesa). Organismo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Obtenido de la red: www.siap.sagarpa.gob.mx (consulta, febrero 2012).
- Sierra A.J. 2009. La región, Periódico de la zona oriente de Michoacán. Tuxpan la cuna de la gladiola. En la red: www.laregionenlinea.com/index.php?option=com.content&view=article&id=759:tuxpan-cuna-de-la-gladiola&catid=86:tuxpan&Itemid=97. (Consulta, septiembre 2011).

- Singleton L.L., Mihail J.D., Rush Ch.M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. The American Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 265 p.
- Sousa-Rocha R.J., Oliveira N.T. 1998. In vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. Against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of antracnosis in the passion fruit (*Passiflora*). Boletín Micológico 13:103-110.
- Stefanova M., Lleiva A., Larrinaga L., Coronado M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Facultad Agronomía (LUZ) 16: 509-516.
- Vargas-Hoyos H.A., Rueda-Lorza E.A., Gilchrist-Ramelli E. 2012. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. Actualidades Biológicas 34(96):103-112.
- Vergara P.V. 2010. Evaluación de la efectividad biocontroladora de *Trichoderma* spp y *Bacillus subtilis* sobre las enfermedades *Botrytis calicinal* y corazón mohoso de la manzana. Universidad de TALCA. En la red: <http://www.bionativa.cl/pdf/bacillus-trichonativa/t6.pdf>. (consulta, agosto 2011).



AP
AGRO
 PRODUCTIVIDAD

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE KEFIR

MOLECULAR CHARACTERISATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA ISOLATED FROM KEFIR

Salas-Sánchez, S.I.; Valadez-Moctezuma, E.*

Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo México. CP 56230.

*Autor responsable: evaladez@correo.chapingo.mx

RESUMEN

El kefir es un alimento probiótico, compuesto principalmente de bacterias ácido-lácticas y levaduras. Su ingesta ayuda al buen funcionamiento del intestino humano por el incremento de la flora benéfica. Dependiendo del lugar, este producto presenta características organolépticas distintivas proporcionadas por el tipo de microorganismos asociados y la calidad de la leche utilizada. Actualmente existe interés en industrializarlo, pero es necesario seleccionar el inóculo adecuado para estandarizar su sabor y calidad. Con base en lo anterior, se caracterizaron e identificaron molecularmente bacterias ácido-lácticas aisladas de kefir artesanal. Todas las bacterias caracterizadas fueron de forma bacilar, Gram positivas, catalasa negativas, sin esporulación, y acidificaron la leche en valores de pH diferentes. La leche fermentada presentó consistencia viscosa, olor característico, y generalmente estaba gasificada. Todos los aislamientos fueron diferenciados con RAPDs, RAPD-CAFs, separados en cuatro grupos, y las secuencias del gen 16S los identificó como *Lactobacillus kefir*.

Palabras clave: leche fermentada, marcadores genéticos, RAPD-CAFs, rDNA, *Lactobacillus kefir*.

ABSTRACT

Kefir is a probiotic food composed mainly of lactic acid bacteria and yeasts; intake helps the proper function of the human intestine by increasing the beneficial flora. Depending on the geographic site, this product has distinctive organoleptic characteristics provided by the type of associated microorganisms and the quality of the milk used. Kefir has undergone industrialization, but to standardize the taste and quality, it is necessary to select the appropriate inoculum. Lactic acid bacteria isolated from artisanal kefir were identified and characterized molecularly. All the bacteria were rod shaped, Gram positive, catalase negative and with no sporulation; the bacteria also acidified the milk with different pH values. The fermented milk showed viscous consistency, characteristic odor and most frequently it was gasified. Bacterial isolates were differentiated with RAPD and DAF-PCR, and classified into four groups. The sequences of the 16S gene identified them as *Lactobacillus kefir*.

Key Word: fermented milk, genetic markers, organoleptic properties, DAF-PCR, rDNA, *Lactobacillus kefir*.

INTRODUCCIÓN

La preservación de los alimentos por fermentación es uno de los métodos más antiguos conocidos por la humanidad. La leche ha sido uno de los primeros productos pecuarios utilizados por el hombre, e incluso, de los primeros alimentos sometidos a procesos fermentativos (Cheesman, 1984). Las leches fermentadas se elaboran generalmente con leche de vaca (Liu y Lin 2000; Je-Ruei et al., 2002), utilizando selectos cultivos lácticos en modernos procesos. El consumo de estos productos a nivel mundial se ha incrementado debido a que favorecen la flora intestinal y ayudan a prevenir el incremento de organismos patógenos en el intestino por la propia acidificación del producto (Roberfroid, 2000). El kefir (de origen caucásico) es una bebida láctea viscosa, ligeramente carbonatada, que contiene pequeñas cantidades de alcohol; se conoce como kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi y kippi (Farnworth, 2005; Karagözlü et al., 2007). Se clasifica en el grupo de leches fermentadas y acidificadas por una microflora mixta basada en bacterias y levaduras (Marshall y Cole, 1985; Ot-es y Cagindi, 2003). Los gránulos de kefir, comúnmente conocidos en México como "búlgaros", se utilizan como inóculo y se obtienen a partir de la proliferación de gránulos preformados (Garrote et al., 1998), que son estructuras de polisacáridos, gelatinosas, blancas o amarillentas, irregulares y de tamaño variable (Figura 1) donde conviven en simbiosis bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y, ocasionalmente, bacterias acéticas incrustadas en una matriz formada por Kefiran (Frengova et al., 2002; Ninane et al., 2005). Las BAL se localizan principalmente en la capa superficial y las levaduras en el centro de los gránulos, ocasionando fermentación ácido-alcohólica durante la cual se acumulan metabolitos como ácido láctico (producido por las bacterias), alcohol etílico y ácido carbónico (producido por levaduras) que le confieren propiedades organolépticas distintivas a este alimento milenario (Yilmaz et al., 2006). Además de otros beneficios atribuidos a su consumo, la cantidad de microorganismos y la variedad de componentes bioactivos que pueden formarse durante la fermentación hacen del kefir un probiótico complejo (Farnworth, 2005).

El kefir es consumido principalmente en Europa, pero se produce comercialmente en otras partes del mundo. Actualmente la elaboración a escala comercial requiere de cultivos seleccionados y eficientes que permitan contro-

lar la microflora involucrada para obtener producción de calidad y estandarizada; así como extender la vida útil del producto y facilitar los aspectos nutrimentales, considerando altos valores de bacterias viables, además de buenas propiedades químicas y organolépticas. A la fecha se ha intentado producir leche similar al kefir tradicional, combinando *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* aislada de kefir con las cepas para yogur, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Beshkova et al., 2002). Con la misma finalidad, en Estados Unidos (EUA) se produce kefir comercial, que contiene *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc plantarum*, *L. casei*, *L. cremoris* y *S. florentinus* (Hertzler y Clancy 2003). Debido a las propiedades nutricionales que ofrece este producto lácteo y al interés por industrializarlo de forma estandarizada, un grupo de bacterias lácticas aisladas de kefir producido artesanalmente se caracterizó e identificó, utilizando marcadores genético-moleculares y comparando las secuencias del gen 16S del rDNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización de BAL con pruebas bacteriológicas

Se obtuvieron diferentes muestras de kefir de la Ciudad de Texcoco, Estado de México, México, producido artesanalmente. Se inoculó 10% (p/v) de gránulos de cada muestra en leche de vaca, semidescremada y ultrapasteurizada, marca Alpura®, y se incubaron a 30 °C por 48 h. Del nuevo kefir se hicieron diluciones en solución



Figura 1. Gránulos de kefir (*Lactobacillus kefir*).

de Ringer de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , se sembraron en caldo para lactobacilos MRS (De Man *et al.*, 1960) por extensión en placa y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se aislaron colonias de bacterias color blanco-cremoso, Gram positivas y catalasa negativa. Para medir la acidificación de los diferentes aislamientos, cada cultivo se inoculó al 1% (v/v) en leche semidescremada ultra pasteurizada Alpura® y se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración de células se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop, ND100 a de 550 nm.

Extracción de DNA y PCR

Se extrajo ADN de los aislamientos de las bacterias lácticas de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989), además de *Streptococcus thermophilus* (Gram positiva) y de *Escherichia coli* (Gram negativa) que se utilizaron como grupos de comparación en los análisis de DNA. Todas las muestras se trataron con Ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg mL⁻¹ (fermentas) y el ADN se re-suspendió en buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6 y 1 mM EDTA pH 8). La integridad del ADN se estimó por electroforesis en agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 µg mL⁻¹, y se observó con luz ultravioleta. El ADN se cuantificó con espectrofotómetro (ND100) a 260 nm. Para la caracterización y diferenciación de los aislamientos se utilizaron las técnicas RAPDs y una modificación a esta técnica, que consistió en digerir previamente el ADN con una enzima de restricción, con la finalidad de hacer menos compleja la topología de la molécula y facilitar el reconocimiento de fragmentos molde por parte del primer aleatorio, con el fin de incrementar considerablemente la reproducibilidad y la nitidez de los perfiles que se obtienen al separarlos en geles de acrilamida. En el presente trabajo a esta modalidad se propone el nombre de RAPD-CAFs (Random Amplified Polymorphic DNA-Claved Amplified Fragments). Esta técnica alternativa prácticamente tiene como base las que reportaron Konieczny y Ausubel (1993), quienes restringieron productos de PCR en lugar del ADN molde; y Caetano-Anollés y Gresshoff (1994), que tiñeron fragmentos DAF con sales de plata en geles de acrilamida en lugar de usar radioactividad. Los iniciadores para PCR se seleccionaron del kit L de Carl Roth Company. La mezcla de reacción para RAPD consistió en 100 ng de ADN, 20 pM de cada iniciador, 200 pM de dNTPs, 1X de amortiguador, 2.5 mM de MgCl₂ y 1.5 unidades de Taq ADN Polimerasa. El volumen final se ajustó a 25 µL con agua destilada estéril. El termociclaje consistió en: un ciclo a 94 °C durante dos minutos; 35 ciclos [94 °C, un minuto; 40 °C, un minuto; 72 °C, 1.5 minutos y un ciclo de extensión final de 72 °C por cinco minutos. Se seleccionaron los iniciadores L-03, L-06, L-07, L-08, L-10, L-12, L-18 y L-20, dada su funcionalidad para el tipo de muestras. Cabe hacer notar que aun cuando los RAPDs se alinean comúnmente entre 32 °C y 35 °C, en la presente evaluación se hizo a 40 °C con la finalidad de incrementar la especificidad y reproducibilidad (Luna *et al.*, 2007). Para RAPD-CAFs se digirió 1 µg de ADN de cada cepa con la enzima EcoRI (PROMEGA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los productos de digestión se amplificaron con los mismos iniciadores empleados para RAPD y con el mismo programa de termociclaje referido. Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida 8% y se tiñeron con nitrato de plata 0.2 % (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1994).

Análisis estadísticos de los perfiles electroforético

Se construyó una matriz binaria (0 y 1) a partir de los diferentes perfiles de ADN, donde "1" indicó la presencia de un fragmento y "0" su ausencia entre los aislamientos comparados. Se generó un dendrograma por el método de UPGMA, con coeficiente Nei & Li/Dice y 1000 re muestreos tipo Jackknife, eliminando dos bandas en cada corrida; esto se realizó con el software Free Tree 0.9.1.50 y se graficó con Tree View 1.6.6 (Hampl *et al.*, 2001; Page, 2001).

Amplificación del fragmento 16S rDNA y secuenciación

Para la amplificación del gen 16S del rDNA de las BAL se utilizaron 25 ng de ADN de cada aislamiento, 10 pM de cada uno de los iniciadores universales para bacterias, el 16S (8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3' y U1492r: 5' ACCTTGTTACGACTT-3') (Ashelford *et al.*, 2005; Sasoh, *et al.*, 2006), 200 pM de dNTPs, 1X de amortiguador, 2.5 mM de MgCl₂ y 2 U de Taq DNA Polimerasa y agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 µL. El programa de termociclaje consistió en un ciclo a 95 °C por dos minutos, 30 ciclos [95 °C, un minuto, 56 °C, un minuto; 72 °C, uno punto cinco minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C por cinco minutos. Se obtuvo un fragmento de alrededor de 1500 pb (pares de bases) y se limpió por el método Exo-Sap (Shrimp Alkaline Phosphatase-Exonuclease I de Invitrogen). Para la reacción de secuenciación se utilizaron 20 ng del fragmento purificado, 10 pM de cada iniciador U514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3') (Anzai *et al.*, 2000; Edgcomb *et al.*, 2002), 2 µL de amortiguador 5X,

4 μL de la solución RRM (incluye enzima AmpliTaq DNA polimerasa, MgCl_2 , amortiguador Tris-HCl, dNTPs y ddNTPs) y agua. La reacción de PCR se realizó por 25 ciclos [96 °C, 10s; 50 °C, 5s; 60 °C, 4 minutos]; posteriormente el ADN se limpió de acuerdo con las indicaciones del kit de secuenciación de Applied Biosystems. Las secuencias se realizaron con un Analizador Genético Applied Biosystems modelo 3130; se ensamblaron y editaron con los programas computacionales BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 y FinchTV 1.4.0 Geospiza Inc. Esta información se comparó con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias y capacidad acidificante

El medio MRS resultó adecuado para crecimiento de BAL. En la Figura 2 se muestran colonias homogéneas de color blanco-crema y forma semejante que se caracterizaron como Gram (+) y catalasa (-). La cuenta de colonias se hizo con base en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , dando un recuento en el orden de 3.8×10^5 a 1.45×10^7 ufc mL^{-1} respectivamente, lo que presupone que la forma de cultivo utilizada permite obtener la cantidad de bacterias BAL apropiadas para contribuir a la calidad del kefir. En este sentido, Siuta (2001) indica que la diferencia en cuentas microbianas en productos lácteos es un factor de determinación del sabor y aroma y, además, los probióticos de leches fermentadas deben estar presentes en cantidades apropiadas (1×10^6 UFC mL^{-1}) para prevenir adecuadamente problemas gastrointestinales.

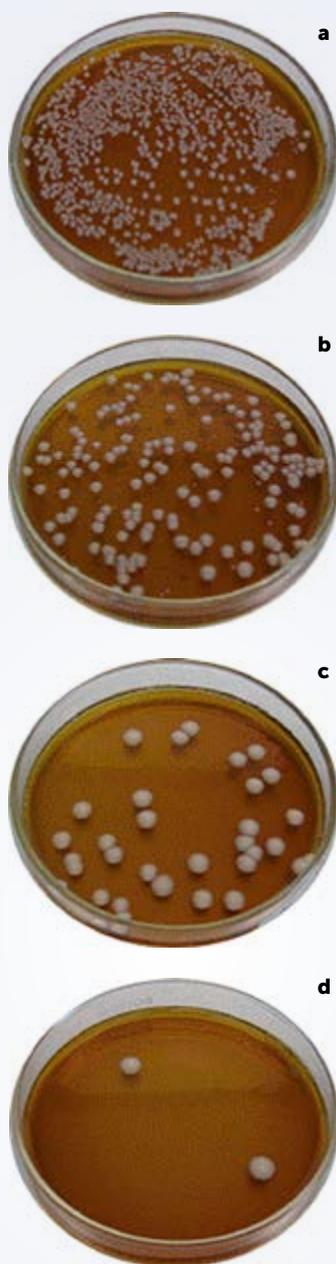


Figura 2. Desarrollo de bacterias lácticas aisladas de kefir. a-d: Diluciones a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , respectivamente.

Los valores de pH entre los 20 aislamientos variaron desde 4.9 a 6.1 (Cuadro 1). La fermentación de la leche también produjo un aumento en la viscosidad, desarrollo de olor característico y producción de gas.

Análisis de perfiles RAPDs y RAPD-CAFs

Los ocho iniciadores utilizados para

tipificar genéticamente con RAPD los 20 aislamientos de BAL mostraron pocos polimorfismos; sin embargo, fueron capaces de diferenciar claramente a *S. thermophilus* y *E. coli* (Figura 3). Con la técnica RAPD-CAFs solamente los iniciadores L-07 y L-12 fueron capaces de reconocer y amplificar todas las muestras que se compararon en el estudio (Cuadro 2).

Los perfiles de esta última técnica fueron diferentes a los obtenidos con RAPDs (Figura 3); las huellas obtenidas fueron abundantes y nítidas. La razón de esta diferencia se debió principalmente a que los iniciadores encuentran más fácilmente los sitios de alineación en los fragmentos de restricción que se utilizan en la PCR como ADN molde, favoreciendo una amplificación selectiva y proporcionando ampliaciones mejor definidas y reproducibles entre experimentos independientes. El ADN de alto peso molecular que normalmente se utiliza para obtener RAPD dificulta el potencial reconocimiento por parte de los iniciadores, dada la compleja topología de la molécula; esta es seguramente una de las razones por la que los RAPD son cuestionados entre laboratorios o experimentos. Sin embargo, en el presente caso las huellas tipo RAPD fueron capaces de diferenciar las cepas de BAL respecto a las bacterias comparadoras.

Por otro lado, los geles de acrilamida resultaron ser una excelente herramienta para la visualización de polimorfismos de ADN, ya que las diferencias entre ampliaciones con pesos moleculares cercanos se aprecian más fácilmente, proporcionando un mayor número de datos. Luna *et al.* (2007) reportaron resultados similares utilizando la misma

Cuadro 1. Valores de pH en leche acidificada por los aislamientos de bacterias ácido-lácticas obtenidas de kefir.

Cepa*	pH	Cepa*	pH
10	4.9	24	5.8
17	5.1	5	5.8
21	5.5	6	5.8
19	5.5	7	5.8
28	5.6	20	5.9
14	5.7	2	5.9
16	5.7	4	5.9
9	5.7	3	6.0
13	5.7	18	6.0
26	5.7	22	6.1

*Numeración asignada en el estudio.

técnica. Para los análisis estadísticos se utilizó un total de 105 fragmentos obtenidos en la técnica de RAPD-CAFs; 37% de éstos fueron propios de los dos aislamientos comparadores. El agrupamiento de las cepas de la Figura 4 definió seis grupos: dos independientes, donde se ubicaron los comparadores *E. coli* y *S. thermophilus*, y cuatro donde se distribuyeron las 20 cepas de BAL. El grupo principal estuvo integrado por 17 aislamientos, a su vez separados en diferentes subgrupos: [4, 17, 16, 2, 3, 7, 24, 28, 13 y 5]; [21, 22, 20, 14 y 26]; [18 y 19], pero las cepas 9, 6 y 10 se mantuvieron independientes entre sí y separadas del grupo mayor. Este nivel de diferenciación fue evidenciado solo utilizando los datos RAPD-CAFs, así como la variabilidad genética intrínseca de la especie, resultados que no se lograron con los datos RAPDs (no mostrados y no considerados). Al tratar de establecer

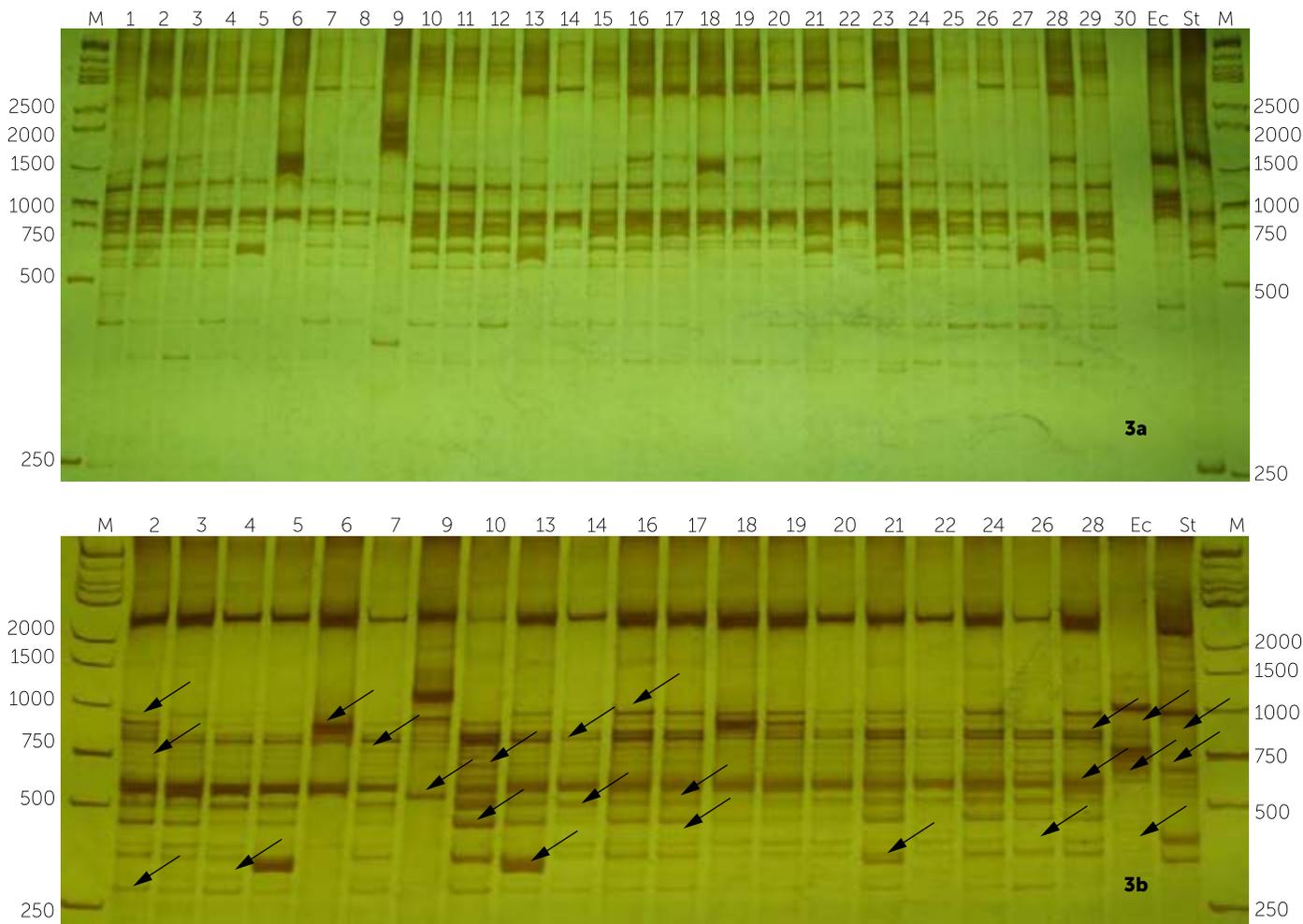


Figura 3. Perfiles RAPD (3a) y DAF-PCR (3b) obtenidos con el iniciador L-07 y separados en gels de poliacrilamida. Nótese la nitidez de los fragmentos de DNA y los polimorfismos detectados con DAF-PCR (señalados con flechas). El marcador de peso molecular (M) es de 1 kb (PROMEGA). Ec: *Escherichia coli*; St: *Streptococcus thermophilus*. Gel inferior contiene las cepas reportadas en el presente estudio. Gel superior, incluye otros aislamientos que resultaron iguales entre sí.

Cuadro 2. Respuesta de amplificación de las bacterias ácido-lácticas aisladas del kefir con ocho iniciadores aleatorios. Las hileras indican los iniciadores utilizados y las columnas, los aislamientos evaluados.

	2	3	4	5	6	7	9	10	13	14	16	17	18	19	20	21	22	24	26	28	Ec	St	
L-03							■															■	■
L-06					■			■	■														
L-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L-08					■		■		■				■									■	■
L-10					■		■									■			■	■		■	■
L-12	■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L-18		■		■	■		■		■													■	■
L-20	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

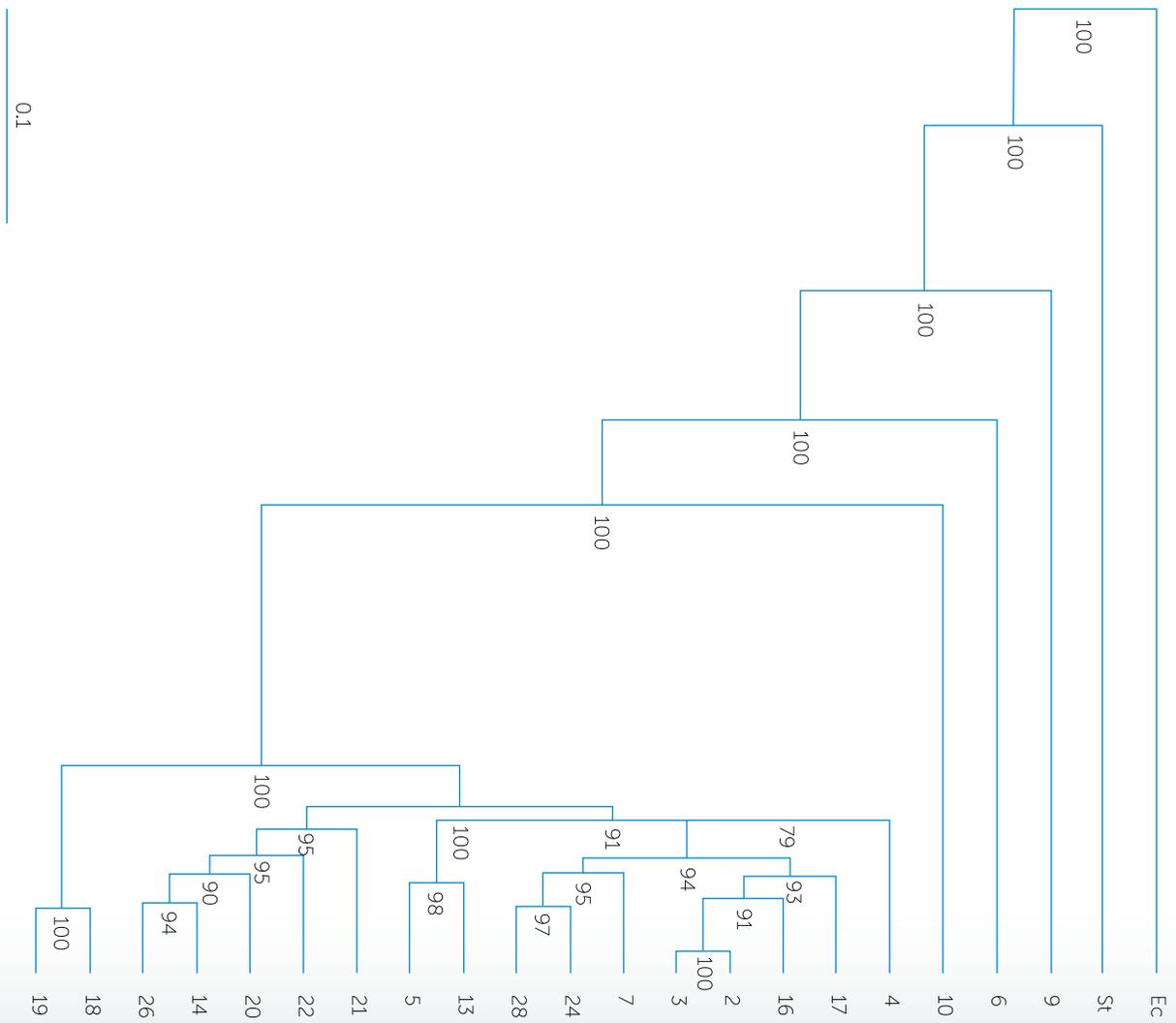


Figura 4. Dendrograma agrupado con UPGMA, utilizando 105 fragmentos RAPD-CAF de 20 cepas de *Lactobacillus kefir*, con la separación de los aislamientos 10, 6 y 9.

una correlación de los grupos de las BAL del dendrograma con los de acidificación de la leche (Cuadro 1), ésta fue negativa, a excepción posiblemente de la cepa 10 que tenía el pH más bajo (4.9).

Secuenciación. El fragmento secuenciado de alrededor de 1400 pb, correspondiente al gen 16S, que identificó con exactitud a las 20 cepas BAL, como *Lactobacillus kefiri*, de acuerdo con la base de datos NCBI (Figura 5, 6). La Figura 6 muestra el árbol de relación filogenética entre las cepas del presente estudio (LK) y algunas bacterias relacionadas, obtenidas del banco de genes GenBank; donde LK se encuentra más relacionado genéticamente con *L. kefiri*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. casei* subsp. *casei* y *L. casei* que con el resto de las especies comparadas. Indudablemente, la comparación de secuencias conservadas de ADN, como fue el gen analizado en este trabajo, tiene gran importancia porque permite comparar a los microorganismos de manera muy fina. Torriani *et al.* (1999) y Blaiota *et al.* (2008) han indicado que las inferencias basadas en este solo gen no son del todo concluyentes al comparar bacterias, por lo que se sugiere utilizar otras secuencias o genes; por ejemplo, las regiones espaciadoras intergénicas (ISR) que ayudan a identificar serotipos o las regiones en los extremos de la subunidad 16S, llamadas V1-V3 o V6-V9 e, incluso, genes codificadores de proteínas heat shock, etcétera, que muestran mayor varia-

ción y permiten asegurar la separación de las especies con más precisión. Con base en nuestros resultados y para nuestro caso, resulta muy importante considerar otras zonas del genoma de las BAL; por ejemplo, las sugeridas por estos autores para conocer si las cepas 6, 9 y 10, que mostraron perfiles de ADN diferentes tanto con RAPDs (datos no mostrados) como con DAF, representan variación inter-específica de la especie o son otras especies de bacterias ácido lácticas presentes en el kefir de la zona de Texcoco, México.

CONCLUSIONES

Aislamientos de BAL obtenidos de kefir producido de forma doméstica fueron capaces de fermentar y acidificar la leche de vaca con valores de pH 4.9 a 6.1.

- La tipificación genética realizada con RAPD y RAPD-CAF permitió apreciar claramente la variabilidad intra-específica de los aislamientos de BAL.
- Los RAPD-CAFs fueron más eficientes que los RAPDs para revelar polimorfismos claros entre los aislamientos de BAL y entre las bacterias utilizadas como grupos comparadores (*Streptococcus thermophilus* y *Escherichia coli*); particularmente, el iniciador L-07 fue el más informativo.
- Los aislamientos de BAL se separaron en cuatro grupos: el principal se integró por 17 de los 20 aislamientos evaluados: [4, 17, 16, 2, 3, 7, 24, 28, 13 y

```

ATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCATAATACATGCAAGTCGAACGCGTTTCCGTTATTG
ATTTTAGGTGCTTGCATTTAAATGATTTAACACGAAACGAGTGGCGAAGTGGTGAAGTAACACGCTG
GGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCAA
AACCACATGGTTTTTGGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGCTATTA
GCTTGTGGTAAGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGC
CACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAATG
GACGAAAGTTGTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAGTGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTG
TTGGAGAAGAACAGGTGTCAGAGTAAGTGTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAAGCCACGG
CTAACTAGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCCGGAGAAGTGCAT
CGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCC
TAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGGCGGCTGCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG
AAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCGGTAGTCCATGCCGTAAGCATGAGTGCTAAG
TGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGA
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAAGGCGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
TCGATGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTC
CCTTCGGGGACAGAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTATGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACCTTAGCAAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAAATGGACGGTACAAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAA
GCCGTTCTCAGTTCGGATTGCGAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGTG
GATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
    
```

Figura 5. Fragmento de 1397 bases correspondiente al gel 16S del rDNA de bacterias ácido-lácticas de kefir de Texcoco, México obtenido con los iniciadores universales 8 Forward 5'-

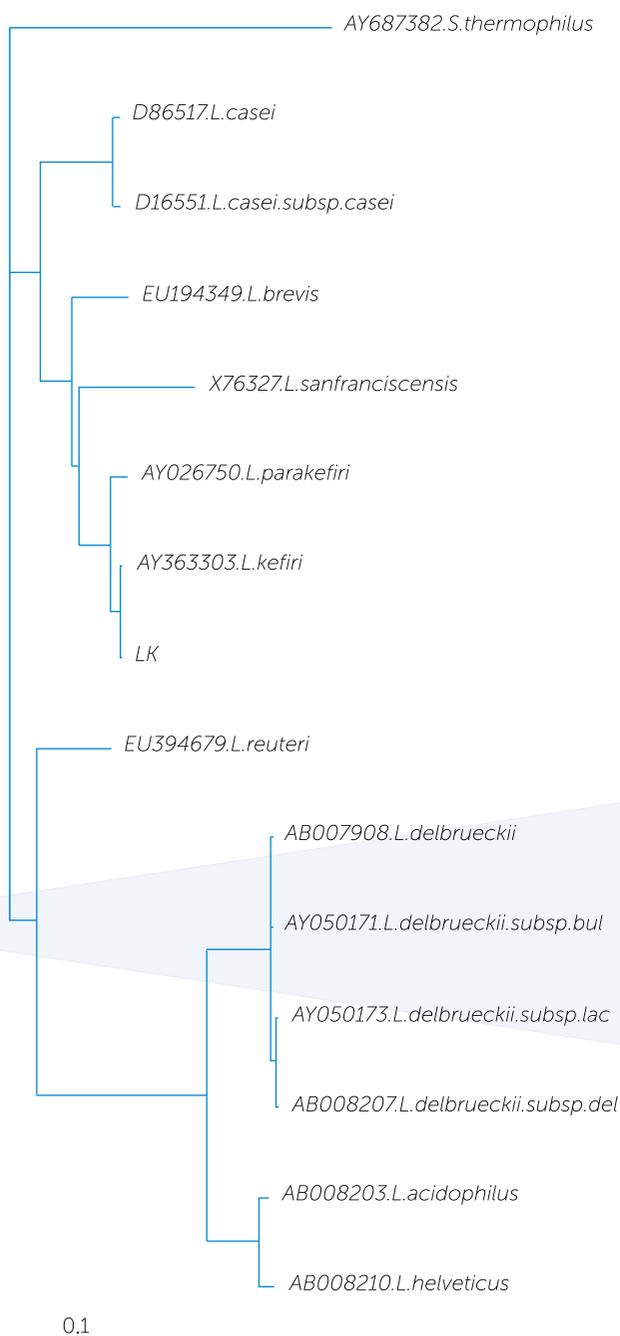


Figura 6. Relación filogenética de algunas especies de *Lactobacillus* spp., obtenidas del Genbank con cepas del presente estudio.

5]; [21, 22, 20, 14 y 26]; [18 y 19] con poca variación genómica; los otros tres grupos independientes entre sí estuvieron representados por los aislamientos 6, 9 y 10, respectivamente.

- Las 20 cepas de BAL se identificaron como *Lactobacillus kefiri*, al comparar las secuencias del gen 16S del rADN.

LITERATURA CITADA

- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 50: 1563.
- Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J., Weightman A.J. 2005. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7724-7736.
- Beshkova D.M., Simova E.D., Simov Z.I., Frengova G.I., Spasov Z.N. 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology* 19: 537-544.
- Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. 2008. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-Restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (1): 208-215.
- Cheesman M. 1984. Los Cultivos Lácticos. Traducido por Villegas, A. 1988 Universidad Autónoma Chapingo, Edo. Méx. 175 p.
- Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. 1994. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes* 45: 13-18.
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135.
- Edgcomb V.P., Kysela D.T., Teske A., Gomez A. de V., Sogin M.L. 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *PNAS.* 99 (11): 7658-7662.
- Farnworth E.R. 2005. Kefir - a complex probiotic. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* 2 (1): 1-17.
- Frengova G., Simova E.D., Beshkova D.M., Simov Z.I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch* 57: 805-810.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain [ratio] milk ratios. *Journal of Dairy Research* 65: 149-154.
- Hapl V., Pavlíček A., Flegr J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Hertzler S.R., Clancy S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* 103: 582-587.
- Je-Ruei L., Sheng-Yao W., Yuh-Yih L., Chin-Wen L. 2002. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer* 44 (2):182-187.
- Karagözlü N., Karagözlü C., Ergönül B. 2007. Survival characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation. *Czech J. Food Sci* 25, 202-207.
- Konieczny A., Ausubel FM. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR markers. *Plant J.* 4 (2): 403-10.
- Liu J.R., Lin C.W. 2000. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose or sucrose. *Journal of Food Science* 65: 716-719.
- Luna-Páez A., Valadez-Moctezuma E., Barrientos-Priego A., Gallegos-Vázquez C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp., mediante semilla con marcadores RAPD e ISSR y su posible uso para

- diferenciación. Journal of the Professional Association for Cactus Development 9: 43-81.
- Marshall V.M., Cole W.M. 1985. Method for making kefir and fermented milks based on kefir. Journal of Dairy Research 52: 451-456.
- Ninane V., Berben G., Romnee J.M., Oger R. 2005. Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 9 (3): 191-194.
- Ot-es S., Cagindi O. 2003. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. Pakistan Journal of Nutrition 2: 54-59.
- Page R.D.M. 2001. TreeView version 1.6.6. Ayudas On-Line <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.htm>, Glasgow, Escocia, Reino Unido.
- Roberfroid B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? American Journal of Clinical Nutrition 71: 1682-1687.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1659 p.
- Sasoh M., Masai S.E., Ishibashi S., Hara H., Kamimura N., Miyauchi K., Fukud M. 2006. Characterization of the Terephthalate Degradation Genes of *Comamonas* sp. Strain E6. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1825.
- Siuta C. 2001. Improving probiotic survival rates. Food technology 55: 36-42.
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* ssp. *lactics*. Appl. Environ. Microbiol. (6): 4351-4356.
- Yilmaz L., Özcan Y.T., Akpınar B.A. 2006. The sensory characteristics of berry-flavoured kefir. Czech J. Food Sci. 24: 26-32.



CONTROL BIOLÓGICO DE GARRAPATA (*Boophilus* spp.) CON DIFERENTES CEPAS DE *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin EN BOVINOS

BIOLOGICAL CONTROL OF TICKS (*Boophilus* spp.)
WITH DIFFERENT STRAINS OF *Metarhizium anisopliae*
(Metchnikoff) Sorokin IN CATTLE

Martínez-Tinajero, J.J.¹; Izaguirre-Flores, F.^{1*}; Aguirre-Medina, J.F.¹;
Ley de Coss, A.¹; Osorio-López, M.W.²; Jáuregui-Jiménez, R.².

¹Cuerpo Académico de Ganadería Tropical Sustentable, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Costera, Huehuetán, Chiapas, México. ²Centro Universitario de Oriente CUNORI de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Chiquimula, Guatemala, C.A.

*Autor responsable: fizaguirreflores@gmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar cuatro cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschincoff) Sorokin para el control garrapatas del género *Boophilus* spp., se seleccionaron dos cepas de garrapatas para su evaluación en su fase adulta sobre terneros parasitados. Se utilizó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos y diez repeticiones. En esta fase las cepas PLH y CH 93-3 fueron las que mostraron la mayor efectividad, por lo que fueron evaluadas en garrapatas adultas sobre terneros previamente parasitados; en la prueba *in vivo* se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, cuatro tratamientos (Las dos cepas seleccionadas, un compuesto químico y un placebo a base de agua) y ocho repeticiones. Los resultados mostraron que las dos cepas evaluadas presentaron una efectividad del 50% con respecto al producto químico.

Palabras clave: Garrapatas, cepa, ectoparásitos, terneros, anemia.

ABSTRACT

With the objective of analyzing four strains of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschincoff) Sorokin used to control ticks of the genus *Boophilus* spp., two tick strains were selected for their assessment during their adult phase on parasitized calves. A completely randomized design with six treatments and ten repetitions was used. In this phase, the PLH and CH 93-3 strains showed the greatest effectiveness, so they were evaluated as adult ticks on calves that had been previously parasitized; during the *in vivo* test, a completely randomized design was used, with four treatments (the two strains selected, one chemical compound and a water-based placebo), and eight repetitions. The results showed that the two strains evaluated presented an effectiveness of 50% with regard to the chemical product.

Key words: ticks, strain, ectoparasites, calves, anemia.



INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son parásitos que se alimentan de sangre de animales vertebrados. De las tres familias existentes, se han identificado en el mundo 19 géneros y más de 800 especies, correspondiendo 636, a la familia Ixodidae (Soulsby, 1988). Para América se han identificado 170 especies, de las cuales 48 pertenecen al género *Ixodidae* spp., y en Guatemala, se han identificado 13 especies de las cuales *Boophilus microplus* y *Amblyoma cajennense*, son las de mayor importancia económica para la ganadería, ya que además del daño que provocan, transmiten enfermedades de importancia económica, como la anaplasmosis y piroplasmosis bovina (Prodesa, 1988). Las garrapatas se han logrado adaptar a una gran variedad de hábitats y además poseen una distribución cosmopolita. Los hospederos parasitados por garrapatas presentan una variedad considerable, desde las asociadas a un hospedero en particular, como el caso del *Boophilus* spp. con los bovinos, hasta aquellas con un amplio rango de hospederos como *Amblyoma cajennense* con mamíferos, aves, batracios, roedores y reptiles (Prodesa, 1988).

El uso de garrapaticidas de origen químico, así como la falta de alternativas en el mercado llevan a que sea necesario desarrollar opciones que sean efectivas en el control de las garrapatas, que no contaminen los productos de la explotación bovina y que a la vez sean inocuas al medio ambiente. Los hongos entomopatógenos tienen gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fúngicas a poblaciones de artrópodos (Pucheta *et al.*, 2006). López y Hans (2001) mencionan que entre los géneros más importantes de hongos entomopatógenos se encuentran: *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Aschersonia* spp., *Entomophthora* spp., *Zoophthora* spp., *Erynia* spp., *Eryniopsis* spp., *Akanthomyces* spp., *Fusarium* spp., *Hirsutella* spp., *Hymenostilbe* spp., *Paecilomyces* spp., y *Verticillium* spp., mientras que para la FAO (2003) los géneros de importancia son *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Paecilomyces* spp., *Verticillium* spp., *Rhizopus* spp. y *Fusarium* spp. Como respuesta a lo anterior se evaluó eficiencia y efectividad de cuatro cepas del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) como una alternativa de bajo costo e inocua al ambiente, como control para garrapata *Boophilus* spp., en condiciones *in vitro*,

en su fase de vida libre e *in situ*, en su etapa parasitaria en bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro Universitario de Oriente (CUNORI) localizado en el municipio de Chiquimula, Guatemala (12° 47' 58" N y 89° 31' 05" O) a 320 m de altitud. El municipio se ubica en la zona de vida de bosque seco subtropical con una temperatura mínima de 19 °C, una máxima de 42 °C y precipitación promedio de 850 mm anuales (Cruz, 1982).

Desarrollo experimental

Se determinó *in vitro* la efectividad de cuatro cepas del hongo *Metarhizium* spp. sobre larvas (L1) de garrapatas del género *Boophilus* spp. obtenidas a partir de la incubación en laboratorio para ser inoculadas con una solución estandarizada del hongo en suspensión. En una segunda fase se evaluó con terneros estabulados utilizados como hospederos para el desarrollo de las larvas sembradas en campos delimitados por cámaras instaladas en los mismos, donde se efectuó la aplicación del hongo de las cepas que resultaron más efectivas durante la fase *in vitro*.

Manejo *in vitro*

Se recolectó, identificó, cultivó y reprodujo garrapatas del género *Boophilus* spp. con el propósito de obtener una población homogénea para la aplicación de las cepas de *Metarhizium* spp. La recolección de las hembras repletas o teleóginas, se llevó a cabo en fincas con ganado de doble propósito del municipio de Chiquimula, provenientes de bovinos parasitados; las garrapatas colectadas fueron identificadas y trasladadas posteriormente a una cámara de incubación construida para ese fin, a una temperatura entre 27 °C y 30 °C con humedad relativa promedio de 85%, para que las garrapatas repletas finalizaran su ciclo de vida dentro de frascos de vidrio con papel absorbente en el fondo, hasta llegar a la oviposición la cual se produjo



entre el segundo y quinto día posterior a la introducción de las teleóginas en la cámara de incubación.

Al finalizar la oviposición se retiraron los cadáveres de las hembras repletas y se continuó con el proceso de espera de la eclosión de las larvas (L_1), periodo que duró entre 14 y 16 días. Un día después de iniciada la eclosión de las larvas se procedió a cerrar la boca de los frascos con papel filtro y adhesivo a base de silicón para evitar el escape de las larvas de sus frascos. Las larvas estuvieron en ambiente de 85% y 100% de humedad relativa y se esperó un periodo de entre 14-18 días para obtener un mejor desarrollo de las larvas antes de la inoculación, con soluciones de las cuatro cepas del hongo a prueba.

Manejo del hongo *Metarhizium* spp.

Las cuatro cepas iniciales provinieron de laboratorios comerciales, como el del Ingenio La Unión y el CEN-GICAÑA que proporcionaron las cepas PLH y CH 93-3, respectivamente; y el del Agrícola El Sol, que aportó las cepas AESCHS y AESGC. Para llevar a cabo la inoculación de las larvas (L_1) de las garrapatas con el hongo, las cepas fueron estandarizadas mediante reproducción y multiplicación.

La unidad experimental fue formada por frascos de vidrio, conteniendo no menos de 1,100 larvas de garrapatas del género *Boophilus* spp., eclosionadas de los huevos de dos teleóginas, colocadas en un frasco de vidrio para el desarrollo controlado de su ciclo evolutivo, dispuestos dentro de una cámara de incubación con ambiente controlado. Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y 10 repeticiones, cuyos tratamientos correspondieron a las cuatro cepas del hongo en estudio, un grupo testigo a base de Amitraz y un placebo. El modelo lineal utilizado en la prueba *in vitro* fue: $Y_{ij} = \mu + \theta_i + \sum(a) + \tau_j + \theta\tau_{ij} + \sum_{ij}$, donde: Y_{ij} =variable respuesta.

μ =efecto de la media poblacional. θ_i =efecto del periodo de incubación del hongo sobre la L_1 de la garrapata. $\sum(a)$ =error asociado a los perio-

dos de incubación. τ_j =efecto de las cepas evaluadas. $\theta\tau_{ij}$ =efecto de la interacción entre el periodo de incubación y las cepas. \sum_{ij} =error experimental asociado a las unidades experimentales. Los tratamientos evaluados fueron T1=Amitraz, T2=Placebo, T3=PLH, T4=CH 93-3, T5=Cepa A.S.G.C y T6=Cepa A.E.S.CH.S.

En las pruebas *in vitro* se efectuaron conteos a las 48 y 96 horas después de la aplicación de los tratamientos sobre las larvas de garrapatas para evaluar el periodo de incubación del hongo. Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de larvas muertas de cada uno de los tratamientos evaluados en relación con el número total de larvas; estos porcentajes fueron transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Los conteos se hicieron con el estereoscopio a 40X y para determinar el crecimiento de micelio en fase de desarrollo sobre las larvas de garrapata con microscopio a 10X. Los porcentajes de las larvas de garrapata (L_1) muertas de cada uno de los periodos de incubación transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción fueron sometidos a un análisis de varianza y las diferencias estadísticas entre los factores y su interacción fueron analizadas con el procedimiento de comparación de medias mediante la prueba Tukey, con un nivel de 0.05 de significancia.

Evaluación *in vivo*

Se adquirieron ocho bovinos, jóvenes encastados con peso promedio de 195 kg vivo, que fueron estabulados individualmente y alimentados con forraje verde picado *ad libitum*, durante el tiempo que duró el experimento. Previo a la fase de experimentación se aplicó un periodo de adaptación de los animales que incluyó aplicación de vacunas (Ántrax, Pierna Negra y Edema Maligno) vía parenteral y desparasitante oral a base de Albendazole (12 mg kg^{-1}). Para mantener libre de garrapatas a los bovinos se aplicó Amitraz mediante aspersión en dosis de 2 ml L^{-1} de agua, tres semanas antes del experimento.

Cámaras de tela sobre los bovinos

Para la siembra de larvas se elaboraron 32 cámaras de tela de 20 centímetros de diámetro cada una, adheridas con pegamento de contacto en las regiones escapular y fosa paralumbar en ambos flancos de los animales, numeradas del uno al cuatro, iniciando por el lado izquierdo anterior, y en cuyo interior se llevó a cabo la siembra de las larvas de garrapata en fase de vida libre (L_1) que parasitaron al bovino huésped, desarrollándose hasta la fase de teleógina o hembra



repleta. En total se efectuaron dos siembras con un intervalo de 48 horas en las cámaras instaladas sobre los bovinos. Una vez ya colocadas en los bovinos, se inició el proceso de siembra y desarrollo de las larvas de garrapatas dentro de las cámaras. Para tal efecto se realizaron dos siembras, agregando a cada cámara las larvas nacidas de dos teleoginas adultas, cuya producción promedio se estimó en al menos 1,700 larvas por garrapata adulta. Se efectuaron dos eventos de siembra con intervalos de tres días entre sí (Figura 1).

Manejo del Hongo *Metarhizium anisopliae*

Para llevar a cabo las aplicaciones en la prueba de campo, previamente se seleccionaron dos cepas del hongo *M. anisopliae*, las cuales mostraron mejores resultados en la prueba *in vitro* y fueron sometidas a un proceso de revigorización a través de repetir fases de multiplicación y desarrollo para la aplicación en la prueba *in vivo*. La unidad experimental fue constituida por una cámara de tela de forma circular de 20 centímetros de diámetro adherida a la piel de los terneros que sirvieron de huéspedes para la siembra de no menos de 7,000 larvas de garrapata del género *Boophilus* spp, colocadas en dos siembras. Los tratamientos fueron las dos cepas del hongo que resultaron más efectivas en la fase *in vitro*, un tratamiento testigo a base de un garrapaticida y un placebo con materia inerte (T1=Amitraz, T2=Placebo, T3=PLH, T4=CH 93-3, respectivamente).

Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó el diseño de bloques completamente al azar, con cuatro tratamientos y ocho repeticiones, con el modelo: $Y_{ij} = \mu + \theta_i + \theta_j(\beta_j) + \tau_k + \theta\tau_{ijk} + \sum_{ijk}$; donde: Y_{ijk} =variable respuesta. μ =efecto de la media poblacional. θ_i =efecto del período de incubación del hongo sobre la garrapata en su fase parási-

ta. $\theta_j(\beta_j)$ =efecto anidado de los períodos de incubación dentro de las repeticiones. τ_k =efecto de las cepas evaluadas. $\theta\tau_{ijk}$ =efecto de la interacción entre el período de incubación y las cepas. \sum_{ijk} =error experimental asociado a las unidades experimentales. Se efectuó un conteo de garrapatas al momento del apareamiento de las primeras teleologías previo a la aplicación; posteriormente se efectuaron conteos diarios de garrapatas vivas y muertas por cámara/tratamiento durante, 24, 48, 72, 96 y 120 horas con el fin de evaluar el período de incubación del hongo y su efecto en los diferentes periodos. Finalmente se obtuvieron porcentajes totales de garrapatas vivas y muertas de cada tratamiento, transformados mediante el arco seno de la raíz cuadrada de la proporción, y fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias (prueba Tukey) a 0.05 de significancia.

Variables

Porcentaje de efectividad en la prueba *in vitro*

Se determinó efectuando el conteo del total de larvas dentro de cada unidad experimental y estableciendo el número de larvas de garrapata del género *Boophilus* que mostraron infestación del hongo manifestado mediante crecimiento de micelio, desarrollo de conidios y penetración de la cutícula; esto con el apoyo de estereoscopio y microscopio.

Porcentaje de efectividad en la prueba *in vivo* y de eficiencia

Se determinó efectuando un conteo previo a la aplicación de los tratamientos y luego cada 24 horas por cinco días para establecer el número de garrapatas adultas muertas y vivas que aún se hospedaban en cada cámara. El porcentaje de eficiencia de los productos



Figura 1. A: Aplicación de larva (L1) de *Bophillus* spp., en bovinos. B: Terneros sometidos a la prueba de respuesta animal. C: Frascos conteniendo L1 de *Bophillus* spp., 4000 por unidad. D: Huevos de larva (L1) invadidos por el micelio de *Metarhizium anisopliae*.

obtenidos se determinó usando la fórmula: $PE=L1-L2/L1$, donde: PE =Porcentaje de eficiencia. $L1$ =Número de garrapatas antes de la aplicación. $L2$ =Número de garrapatas vivas post aplicación por cada lectura.

Características cualitativas

Éstas se determinaron mediante pruebas documentales de los efectos del hongo, principalmente durante la esporulación sobre la garrapata. Para verificar la infección del hongo sobre las garrapatas en la prueba *in vivo* se efectuó un muestreo de 10 garrapatas muertas por tratamiento, colocadas sobre cámaras húmedas para establecer si se realizaba desarrollo del micelio y posterior esporulación del hongo, a partir de lo cual se realizaron cortes histológicos que identificaron los daños ocasionados por el hongo sobre la cutícula de la garrapata.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentaje de efectividad en la prueba *in vitro*

La prueba *in vitro* realizada para determinar la efectividad del *M. anisopliae*, en la L_1 de garrapatas del género *Boophilus* spp, mostró que los tratamientos tuvieron diferencias altamente significativas en la efectividad para el control de larvas del garrapata en estado de vida libre ($CV=8.82\%$). El comportamiento de los seis tratamientos aplicados en la prueba *in vitro* y su efectividad con respecto a los dos conteos llevados a cabo evidenciaron un incremento lineal de larvas muertas infectadas con respecto al incremento en el periodo de conteo, con porcentajes de 17.60% para la cepa proveniente de la Unión, 19.10 para la cepa de CENGICAÑA; 5.50 para la cepa AESGC y 7.30 para la cepa AESCHS, a las

96 horas post-aplicación. La Figura 2 muestra la diferencia entre tratamientos y entre las cuatro cepas sometidas a la prueba, de las cuales La Unión y CENGICAÑA fueron relevantes.

En un experimento llevado a cabo para determinar la efectividad de 12 cepas de *M. anisopliae* sobre hembras repletas de garrapatas del género *Boophilus* spp., Guedes-Frazon (2000) encontró que seis de las cepas ocasionaron ente 20 y 50% de infección a las teleóginas, entre el cuarto y el séptimo día post-aplicación de una suspensión de conidios a 10^6 y 10^5 conidios ml^{-1} . Moreno *et al.* (2001) evaluaron a *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Verticillium lecanii* sobre teleóginas de *Boophilus microplus*, donde *M. anisopliae* generó inhibición de 87% a concentración de 10^9 conidiosporas ml^{-1} . Posada y Lecuona (2009) evaluaron la efectividad de 259 aislados de *B. bassiana* obtenidos del suelo, de garrapatas muertas y de colección fúngica para el control de *B. microplus*, registrando que la CL_{50} para 98 de los aislados más virulentos fue de 1×10^7 y $1,15 \times 10^7$ conidios ml^{-1} . Fernández-Ruvalcaba *et al.* (2005) evaluaron la efectividad *in vitro* de *M. anisopliae*

a diferentes concentraciones en cepas de *B. microplus* resistente y sensible a organofosforados, hallando que una concentración de 10^8 esporas $\times ml^{-1}$ genera 100% de mortalidad a los 20 días postinfección. De igual manera, hubo reducción de los parámetros reproductivos con variación en las diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Porcentaje de efectividad en la prueba *in vivo*

En la prueba *in vivo* realizada para determinar la efectividad de *M. anisopliae* en garrapatas del género *Boophilus* spp., en su fase parásita sobre huéspedes bovinos estabulados, se observó que los tratamientos mostraron diferencias altamente significativas en la efectividad (Cuadro 2). Es de hacer notar que el efecto placebo no fue la aplicación de dicho tratamiento, sino por el efecto animal de liberarse de las garrapatas. Sin embargo, el comportamiento de las cepas del hongo *M. anisopliae* evaluadas con respecto a su efectividad en los diferentes conteos efectuados post-aplicación demostraron que ambas aumentan de forma lineal, haciéndose más notorio a partir de las 72 horas. Además, se muestra



Figura 2. Garrapatas del género *Boophilus* spp. infectadas de *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) y en pleno desarrollo de la fase de colonización (producción de conidios). Efecto de las hifas de hongo *Metarhizium anisopliae*, (Metschinkoff) sobre la cutícula de garrapatas adultas (corte histológico de la cutícula), CUNORI.

Cuadro 1. Análisis de varianza de la prueba *in vitro* para determinar la efectividad de seis tratamientos en el control de L₁ de garrapatas del género *Boophilus* spp.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Probabilidad	Significancia
Total	35	33251.108				
Periodo (A)	1	813.17	813.17	134.0157	0.0003	**
Error a	4	24.280	6.070			
Tratamiento (B)	5	31794.813	6358.963	1397.995	0.0000	**
A×B	5	527.325	105.465	23.186	0.0000	**
Error	20	90.973	4.549			

Fuente: elaboración propia.

Cuadro 2. Efectividad de cuatro tratamientos en el control de garrapatas (*Boophilus* spp.), fase parásita en bovinos estabulados.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F Calculada	Probabilidad	Significancia
Total	159					
Periodo (A)	4	7593.267	1898.317	49.979	0.0000	**
Periodo de bloques	35	1329.379	37.982			
Tratamiento (B)	3	32771.646	10923.882	280.219	0.0000	**
A×B	12	1190.086	99.174	2.544	0.0055	**
Error	105	4093.255	38.983			

Fuente: de elaboración propia, Coeficiente de Variación: 17.37 %.

la interacción existente entre las dos cepas de *M. anisopliae* revigorizadas con respecto al periodo post-aplicación, evidenciando una efectividad creciente en el tiempo, principalmente en la cepa proveniente de CENGICAÑA. En un experimento llevado a cabo para evaluar la posibilidad de incrementar la capacidad infecciosa de dos cepas de *M. anisopliae* sobre hembras repletas de garrapatas *Boophilus microplus*, Guedez-Frazon (2000) observó que después de infectar artificialmente teleóginas y a partir de ellas elaborar el inóculo para un segundo pasaje (proceso de revigorización), dos días después de la aplicación se presentó un porcentaje de efectividad de 84%, contrastando con 1.8% obtenido de las mismas cepas en la primera aplicación. En los trabajos realizados en animales, las variaciones en la efectividad de las cepas se pueden relacionar directamente con los factores climáticos y el lugar de procedencia de las cepas, ya que existen algunas que presentan una mayor tolerancia a altas temperatura y exposición a rayos UV (Fernández y Bittencourt, 2008; Biduchka *et al.*, 2001), así como al microambiente del animal, como la temperatura de la piel, ya que se ha demostrado que al

incrementarse la temperatura por encima de 34 °C, la germinación del hongo empieza a reducirse (Polar *et al.*, 2008).

Porcentaje de eficiencia

En función de los resultados se observa que las cepas La Unión y CENGICAÑA fueron las que mejor eficiencia mostraron en la evaluación *in vitro* y a partir de éstos se seleccionaron para ser evaluadas en la prueba *in vivo* o de campo. Los resultados mostrados en los Cuadros 3 y 4 evidencian el nivel de eficiencia de las cepas La Unión y CENGICAÑA, con porcentajes de 45% y 48% de lo registrado por el testigo a base de Amitraz.



Cuadro 3. Porcentaje de eficiencia (PE) de seis tratamientos evaluados *in vitro*, con base en sumatoria de conteos.

Indicador	Tratamientos					
	Amitraz	Placebo	La Unión	Cengicaña	AESGS	AESCHS
L1	9909.00	12299.00	13202.00	12164.00	16408.00	7763.00
L2	0.00	12175.00	11177.00	9886.00	15479.00	7163.00
PE	100	1.0082	15.3386	18.7274	5.6619	7.7290

Cuadro 4. Porcentaje de eficiencia (PE) de cuatro tratamientos evaluados *in vivo* con base en sumatoria de conteos.

Indicador	Tratamientos			
	Amitraz	Placebo	La Unión	Cengicaña
L1	107.00	192.00	145.00	155.00
L2	13.00	165.00	88.00	90.00
PE	87.8505	14.0625	39.3103	41.9355

Características cualitativas

En el efecto del *M. anisopliae* sobre la cutícula de la garrapata se observó una invasión de las hifas penetrando las membranas, rompiendo la continuidad del tejido; sin embargo, no se debe olvidar el efecto enzimático del hongo que a través de una histólisis favorece la penetración de las hifas y la degeneración hialina, que posiblemente sea de tipo extracelular por la precipitación de proteínas plasmáticas de los organelos que se han escapado de la pared celular de las garrapatas, ocurriendo la muerte por un proceso de consunción en la garrapata.

CONCLUSIONES

Las cuatro cepas del hongo *M. anisopliae* evaluadas en la prueba *in vitro* para el control de garrapatas en estado de larva (L_1) presentaron crecimiento de micelio sobre larvas de garrapatas del género *Boophilus* spp. En la prueba *in vitro* existieron diferencias altamente significativas entre las cuatro cepas del hongo y el control químico sobre la mortalidad de garrapatas en estado de larva (L_1); las cepas del hongo La Unión y CENGICAÑA evaluadas *in vitro* fueron las de mayor mortalidad sobre garrapatas en estado de larva (L_1) y en la prueba *in vivo* incrementaron su efectividad en el

control de garrapatas del género *Boophilus* spp. en su fase parásita, registrando hasta 50% de efectividad respecto al mostrado por Amitraz.

LITERATURA CITADA

- Bidochka M.J., Kamp A.M., Lavender T.M., Dekoning J, and De Croos J.N.A. 2001 Habitat association in two genetic groups of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering crypt species? *Applied Environmental Microbiology*; 67:1335-1342.
- CENGICAÑA. 1998 Manejo integrado de la chinche salivosa en caña de azúcar. Guatemala. COMIP, (Comité de Manejo Integrado de Plagas GT). 33 p.
- CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar Gt). 2002. Informe anual 2001-2002. Guatemala 58p.
- Cruz S., J.R. De La. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento basado en el sistema Holdridge. Guatemala, Dirección General de Servicios agrícolas. 42 p.
- Fernandez E.D., Bittencourt V.R.E.P. 2008 Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental Applied Acarology* 46:71-93.
- Fernández-Ruvalcaba M., Zhioua E., García-Vázquez Z. 2005 Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. *Técnica Pecuaria en México*, v. 43, n. 3, p. 433-440.
- FAO. 2003 Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Roma: Dirección de producción y sanidad animal de la FAO. p. 33-35.



- Guedez-Frazon A.P. 2000. In vitro assesment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus* (en línea) Brazil, Veterinary Parasitology, ELSEVIER 105 p. Consultado 10 de junio 2012 disponible en: www.elsevier.com/locate/vetpar 39
- López-Llorca I.V., Hans-Börje J. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad, v. 3, n. 6, p. 12-15, Disponible en: <http://www.ua.es/es/informacion/biodiversidad/cuadbiod06.pdf>. Acceso en: junio 2012.
- Moreno R., Hernández F., Benavides E.; Cotes A.M.; Romero A., Gómez E. I. García L.P. 2001 Evaluación *in vitro* de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* para el control de la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Mestastigmata: Ixodidae). In: CONGRESO SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGÍA, 28., 8-10 de agosto 2001, Pereira. Resúmenes. Bogotá: SOCOLEN.
- Posada J.B., Lecuona R.E. 2009 Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, v. 46, n. 2, p. 284-291, <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0213>
- PRODESA. 1988. Resumen del estudio y proyecto de control de garrapatas en Guatemala, Guatemala. p. 26.
- Polar P., Moore D., Kairo M., Ramsuhbag A. 2008 Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. Exp Applied Acarology 46:119-148.
- Puchera-Díaz M., Flores Macías A., Rodríguez-Navarro S., De La Torre M. 2006 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI, v. 31, n. 12, p. 856-860.
- Soulsby E.J.L. 1988. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7 ed. México, Editorial Interamericana. 823 p.



AP
AGRO
PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE *Beuaveria bassiana* (Bals.) Vuill. PARA EL CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei* Ferr.)

PRODUCTION OF *Beuaveria bassiana* (Bals.) Vuill. FOR CONTROL OF COFFEE BORER (*Hypothenemus hampei* Ferr.)

Díaz-Vicente V.M.^{1*}; Pérez-Quintanilla J.N.¹; Pinson-Rincón E.P.¹; Magallanes-Cedeño R.¹; De Coss-Flores M.E.¹; Cabrera-Alvarado M.E.¹

¹Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera costera Entronque Estación Huehuetán, Huehuetán, Chiapas.

***Autor responsable:** vdiaz_vicente@hotmail.com. Cuerpo Académico de Protección Vegetal.

RESUMEN

El hongo entomopatógeno (*Beuaveria bassiana*) infecta a la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en condiciones de laboratorio y campo, se puede propagar masivamente usando cereales como arroz, trigo y salvado de trigo, pues presentan una concentración mayor de 1×10^{10} conidios por gramo y una patogenicidad mayor al 90%, por lo cual cumplen con las normas de control de calidad para reproducir hongos entomopatógenos ajustando el pH de agua entre 5.0 y 6.0. La dosis que se requiere aplicar para el control de la broca es de 1.00 kg ha^{-1} , iniciando la aplicación en el mes de mayo para las condiciones del Soconusco, Chiapas, México.

Palabras Clave: control biológico, conidios, hongo entomopatógeno.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungus (*Beuaveria bassiana*) infects the coffee borer (*Hypothenemus hampei*) under laboratory and field conditions; it can be massively propagated by using cereals such as rice, wheat and wheat bran, since they present a concentration higher than 1×10^{10} conidia per gram and pathogenicity higher than 90%; therefore, they comply with the quality control regulations to reproduce entomopathogenic fungi, adjusting the water pH to between 5.0 and 6.0. The dosage required to be applied for borer control is 1.00 kg ha^{-1} , and application should begin in the month of May for the conditions of Soconusco, Chiapas, México.

Key Words: biological control, conidia, entomopathogenic fungus.



INTRODUCCIÓN

En el estado de Chiapas, México, el cultivo del cafeto (*Coffea arabica*) ocupa el primer lugar en importancia, con una superficie cultivada de 230,134 hectáreas y en la región Soconusco, con 70,000 hectáreas; es una actividad socioeconómica muy importante por la cantidad de divisas que genera (Hernández, 2000). Sin embargo, ésta se ve amenazada por problemas sanitarios, como el ataque de roya anaranjada del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) y la broca del grano de café (*Hypothenemus hampei* Ferr.); la primera está considerada como la enfermedad más importante del cultivo y la segunda como la plaga de mayor importancia. En la actualidad la broca se encuentra distribuida en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Guerrero y Nayarit. A partir de la desaparición del Instituto Mexicano del Café se crean los Consejos Estatales de Café en los estados productores, pero se descuidó el área parasitológica y, para atender esta problemática, en julio de 1993 se creó la Junta Local de Sanidad Vegetal de Productores de Café Chiapas que atendía todo el estado de Chiapas; posteriormente surgieron otras. Sin embargo, la primera, que fue creada originalmente para atender todo el estado, se concentró únicamente en el Soconusco, la región productora de café más importante del estado y del país. Dicho Organismo Auxiliar de Sanidad Vegetal opera con recursos del Gobierno Federal, Gobierno del Estado y con la aportación de los productores. Dentro de la Campaña surgen dos alternativas de control, el biológico de la broca del grano de café (*H. hampei*) mediante la cría en áreas rurales del parasitoide (*Cephalonomia stephoderis*) de origen africano, introducido a México por el Centro de Investigaciones Ecológica del Sureste (CIES), hoy Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), y con el aislamiento y la propagación masiva de una cepa nativa del hongo (*Beauveria bassiana*) (Díaz, 1995; y Barrera, 2000). En agosto de 1994 se crea el Laboratorio de Producción y Propagación Masiva del hongo *B. bassiana* y en el mes de octubre de 1994 se obtuvo la primera producción del hongo para aplicar en 155 hectáreas, el cual fue aplicado en el Ejido Guaquitepec, municipio de Chilón, Chiapas. Posteriormente, estos trabajos de investigación continuaron en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas, donde se realizaron trabajos en campo sobre dosis, efecto del pH del agua en la aplicación (Díaz, 1996; Díaz et al. 2006; y Díaz y Roblero, 2007).

Los hongos entomopatógenos son aquellos que pueden causar alteraciones fisiológicas en los insectos, causándoles la muerte. La mayoría de las especies de estos hongos están limitadas principalmente a las condiciones de temperatura y humedad relativa para su germinación y esporulación. Algunos tienen un gran rango de hospedantes y atacan a muchas especies; otros están restringidos a pocas o una sola especie (De la Rosa, 1995). La mayoría de los hongos entomopatógenos pertenecen a la clase Hyphomycetes (Deuteromycetes) (De la Rosa, 1995). La aplicación de estos microorganismos para el control de plagas insectiles lleva a la búsqueda de patógenos eficaces, desarrollo de cultivo *in vitro*, bioensayos y producción masiva a bajos costos (De la Rosa, 1995). Para dar inicio a la producción de *B. bassiana* se realizó un aislamiento de una cepa nativa de este hongo, dado que es mejor trabajar con este tipo de cepas porque ya están adaptadas al medio ambiente de la región donde son aisladas. Con base en lo anterior se evaluó el efecto del hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) en el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron muestreos en campo en huertas cafetaleras del municipio de Cacahoatán, Chiapas y se colectaron frutos de café (*Coffea arabica*) atacados por broca del café (*H. hampei*), con la presencia de un hongo de aspecto algodonoso; la muestra colectada se aisló y purificó. Se siguieron los Postulados de Koch, los cuales fueron propuestos desde 1862 y tienen vigencia hasta la fecha, para el aislamiento del hongo, la inoculación de éste a organismos susceptibles y la recuperación del patógeno de los organismos inoculados. Posterior a los bioensayos realizados en laboratorio (Postulados de Koch), el hongo se propagó masivamente; para ello se utilizaron cereales como sustratos: trigo (*Triticum aestivium*), arroz (*Oryza sativa*), salvado de trigo, maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*), en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas. Con el producto aislado e incrementado en forma masiva se realizaron aspersiones de cinco diferentes dosis del hongo en campo: 0.20 kg⁻¹, 0.40 kg ha⁻¹, 0.60 kg ha⁻¹, 0.80 kg ha⁻¹, 1.00 kg ha⁻¹ y un tratamiento testigo sin aplicación para determinar la mejor dosis que ejerciera control de la broca; también se evaluó el pH del agua (5.0, 5.5, 6.0, 6.5 y 7.0) para hacer la mezcla de aplicación. Los experimentos se realizaron usando un diseño experimental en bloques al azar (Olivares, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras colectadas en campo se aisló el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Las características principales fueron el micelio blanco, ligeramente coloreado (blanco amarillento) y de apariencia polvosa, conidióforos simples e irregulares agrupados en un verticilio donde se sitúan los conidios en forma de zigzag; los conidios son hialinos, redondeados sobre pequeños esterigmas (Barnet y Hunter 1972). El hongo en un cultivo puro presentó micelio de aspecto algodonoso de color blanco; el micelio se ramificó y formó conidióforos simples. La cantidad de conidios aumentó con el transcurso del tiempo, de tal forma que después de 18 y 20 días la colonia mostró una esporulación abundante de color blanco-crema con textura semejante al talco (Figura 1).

Para la producción masiva de *B. bassiana* se utilizó el medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y, posteriormente, en sustrato de arroz, trigo, salvado de trigo, maíz y sorgo. La concentración de conidios por gramo de *B. bassiana*

fue más alta en el trigo, seguida de arroz y salvado de trigo (Cuadro 1), trigo (6.062×10^{10}), arroz (4.716×10^{10}), salvado de trigo (3.70×10^{10}). En el caso del maíz y sorgo el crecimiento fue nulo debido a que estos granos generan aflatoxinas que evitan la germinación de *B. bassiana* (Best et al., 1990; Johnson, 1991). Investigaciones realizadas por De La Rosa (1995) muestran que este hongo es patógeno de la broca del café *H. hampei* y puede causar mortalidad de hasta 100%, dependiendo de la cantidad de conidios que se utilice (Figura 2).

El Cuadro 1 muestra que el porcentaje de patogenicidad de *B. bassiana* fue mayor en el trigo, seguido del arroz y el salvado de trigo, mientras que en maíz y sorgo crecieron los hongos *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. de ocurrencia típica en estos granos (Best et al., 1990; Johnson, 1991). La aplicación en campo mostró que la mejor dosis fue 600 g ha^{-1} a una concentración de



Figura 1. A: Frutos de café (*Coffea arabica*) con la presencia del hongo *B. bassiana* recolectados en campo. B: Cepa aislada de *B. bassiana* de aspecto algodonoso. C: Cepa de *B. bassiana* de 20 días de crecimiento con aspecto semejante al talco.



Figura 2. Hembra adulta de la broca del café infectada (*Hypothenemus hampei*) con *B. bassiana* en condiciones de laboratorio.

4.716×10^{10} , resaltando que al aplicar *B. Bassiana* se debe ajustar el pH del agua a niveles de ácidos a ligeramente ácidos (pH 5 y 6) por requerimientos propios del hongo (Cuadro 2 y 3, Figura 3).

De acuerdo con la biología, ecología de la broca y grado de madurez del fruto es necesario conocer la época de aplicación del hongo (*B. bassiana*) para que tenga mejor efecto de control de esta plaga, por lo que es necesario realizar investigaciones por región geográfica. Bajo las condiciones en que se realizó la presente investigación en la región Sierra del estado de Chiapas, la mejor época de control de la broca del café es el mes de junio (Cuadro 4) porque presentó el menor porcentaje de infestación por (*H. hampei*), pues la broca se encuentra en tránsito e inicia la perforación de los frutos y, como el hongo actúa por contacto, el control es más eficiente; una vez que la broca penetró completamente el fruto, el control es más deficiente por la forma de acción del hongo.

CONCLUSIONES

El cereal más eficiente para propagar el hongo (*B. bassiana*) en forma masiva fue el trigo, ya que presentó

Cuadro 1. Comparación de medias de la concentración de conidios por gramo de *B. bassiana* y porcentaje de patogenicidad.

Tratamiento	Concentración conidios	Patogenicidad (%)
Trigo	6.062×10 ¹⁰ a	96.00 a
Arroz	4.716×10 ¹⁰ b	94.60 b
Salvado de trigo	3.70×10 ¹⁰ c	91.80 c
Maíz	0.00 d	0.00 d
Sorgo	0.00 d	0.00 d

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Tukey a $\alpha=0.05$ de probabilidad.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. Con diferentes dosis del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en condiciones de campo.

Tratamiento	Días después de la aplicación			
	15	30	45	60
E 1.00 kg×ha ⁻¹	52.32 a	55.65 a	38.37 a	53.97 a
D 0.80 kg×ha ⁻¹	41.12 a	52.07 a	33.47 a	40.05 a
C 0.60 kg×ha ⁻¹	34.05 a	51.65 a	32.17 a	39.92 a
B 0.40 kg×ha ⁻¹	32.32 ab	48.15 a	29.80 ab	34.35 ab
A 0.20 kg×ha ⁻¹	29.62 ab	34.42 ab	22.07 ab	28.52 ab
F Testigo sin aplicación	6.75 b	7.55 b	7.10 b	6.90 b

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Tukey a $\alpha=0.05$ de probabilidad.

Cuadro 3. Efecto del pH del agua en la mezcla de *B. bassiana* sobre la mortalidad de la broca del café (*H. hampei*).

pH	Días después de aplicación			
	15	30	45	60
5.0	60.00 a	56.00 a	53.00 a	47.80 a
5.5	57.50 a	54.00 a	54.00 a	48.00 a
6.0	54.00 a	50.00 a	56.00 a	48.00 a
6.5	38.00 b	37.80 b	38.00 b	26.00 b
7.0	26.80 b	25.40 c	28.40 b	22.00 b
Testigo	7.60 c	6.40 d	6.80 c	6.60 c

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Tukey a $\alpha=0.05$ de probabilidad.



Figura 3. Presencia del hongo *B. bassiana* sobre *H. hampei* después de la aplicación en condiciones de campo.

se aplica (*B. bassiana*) en campo es necesario utilizar un pH del agua de 5.0 a 6.0.

LITERATURA CITADA

Barnett H.L., Hunter B.C. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edited. Burges Publishing Company pp. 96-97.

Barrera, J.F. 2000. Los agentes de control biológico de la broca del café en México. En Memorias del X Curso Nacional de Control Biológico del 13 al 15 de noviembre de 2000. Guanajuato, Guanajuato, México pp. 227-236.

Best F.S., Forsyth F.S., Stewart W.F. 1990. Registration requirements and safety considerations for microbial pest control agents in North America. In: Safety of microbial insecticides. Lair, M., L.A. Lacey and E.W. Davidson Eds. C.R.C. Boca Raton Florida pp. 3.10.

De la Rosa W. 1995. Hongos entomopatógenos. En: Memorias del VI Curso Nacional de Control Biológico. El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México. pp. 100-110.

Díaz V.V.M. 1995. Producción masiva de *Beauveria bassiana* para el control

mayor concentración de conidios por mililitro y mayor viabilidad, patogenicidad y pureza. El arroz también puede ser utilizado para propagar masivamente el hongo *B. bassiana*, al igual que el salvado de trigo. El maíz y el sorgo no son una alternativa para propagar este hongo. La dosis a aplicarle es de 1.00 kg ha⁻¹ a una concentración de 4.72×10¹⁰ conidios por gramo. Cuando

Cuadro 4. Porcentaje de infestación de la broca del café (*H. hampei*) cuando el hongo (*B. bassiana*) se aplica en diferentes épocas.

Tratamientos	Días después de la aplicación			
	15	30	45	60
Junio	9.00 b	16.00 b	19.70 b	18.00 b
Julio	16.00 a	40.00 a	50.50 a	38.70 a
Agosto	18.00 a	20.00 ab	20.00 b	21.00 b
Testigo sin aplicación	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.00 c

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Tukey a $\alpha=0.05$ de probabilidad.

biológico de la broca del café en Chiapas, México. XVIII Congreso Nacional de Control biológico y I Congreso Americano de Control Biológico, I Simposio sobre control biológico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) (Coleoptera:Scolytidae), 6 al 10 de noviembre de 1995. Tapachula, Chiapas.

Díaz V.V.M., Pérez Q. J.N., Pinson R E.P., Posada C S. 2006. El pH del agua en la aplicación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferr. en Cacahoatán, Chiapas. Entomología Mexicana Volumen 5 Tomo 1. pp. 630-634.

Díaz V.V.M., Roblero J.D. 2007. Épocas de aplicación del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para el control de *Hypothenemus hampei* Ferr, Quehacer Científico en Chiapas 1(4):42-47

Hernández L. 2000. Sueños de café. En Café Orgánico. Uciri-Cepco-Majomut. Fonaes. México, D.F. pp. 27-48.

Johnson D.L. 1991. Introduction, biology, ecology field experimentation and environmental impact. In: Biological control of Locusts and grasshoppers. Lomer, C.J, and C. Prior Edits. pp. 267-278.

Olivares E. 1994. Paquete de Diseños Experimentales. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) Versión 2.5. Facultad de Agronomía, Marín, N.L.



INFLUENCIA DEL FOTOPERIODO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS DEMOGRÁFICOS Y CALIDAD DE LA COCHINILLA (*Dactylopius coccus*)

INFLUENCE OF PHOTOPERIOD ON SOME DEMOGRAPHIC PARAMETERS AND QUALITY OF COCHINEAL INSECTS (*Dactylopius coccus*)

Méndez-Gallegos, S. de J.^{1*}, L. A. Tarango-Arámbula¹, R. Magallanes-Quintar², A. Carnero-Hernández³, F. Blanco-Macias⁴, y R. D. Valdez-Cepeda^{4,5}

¹Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí. A. de Iturbide # 73. Salinas de Hgo. San Luis Potosí. CP 78600. MÉXICO. ²Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ingeniería Eléctrica. Ave. Ramón López Velarde 801, Zacatecas, Zac., CP 98064. MÉXICO. ³Departamento de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 38006. La Laguna. ESPAÑA. ⁴Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro-Norte. Cruz del Sur Núm. 100, Col. Constelación. Apartado Postal 196, El Orito, Zacatecas, Zac. CP 98085. MÉXICO. ⁵Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Matemáticas. Calzada Solidaridad s/n. Zacatecas, Zac. C.P. 98064. MÉXICO.

*Autor de correspondencia: jmendez@colpos.mx

RESUMEN

Para determinar la influencia del fotoperiodo en el desarrollo, reproducción y contenido de ácido carmínico de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), se establecieron en cámaras climáticas cohortes en cladodios de *Opuntia ficus-indica* L. (Mill.), las cuales se sometieron a cinco regímenes de fotoperiodo: 0/24, 8/16, 10/14, 12/12 y 24/0 h de fotofase:escotofase, respectivamente. El fotoperiodo afectó la duración del ciclo biológico ocurriendo más rápido cuando las horas de oscuridad disminuyeron, pero los valores de supervivencia se redujeron. El régimen con 14 horas de oscuridad proporcionó las mejores condiciones para el desarrollo y reproducción de *D. coccus*. Los regímenes de fotoperiodo probados generaron un bajo porcentaje de ácido carmínico (12%), por lo que se requieren realizar otros estudios para verificar si es la cantidad y calidad de luz la que influye sobre la presencia del colorante o sobre la fisiología de la planta hospedante.

Palabras clave: Supervivencia, reproducción, colorante natural, nopal.

ABSTRACT

To assess the influence of photoperiod on the development, reproduction and carminic acid content of cochineal insects (*Dactylopius coccus*), cohorts were established in climatic chambers on cladodes of *Opuntia ficus-indica* L. (Mill.); these were subjected to five photoperiod regimes: 0/24, 8/16, 10/14, 12/12 and 24/0 hours of photophase:scotophase, respectively. The photoperiod affected the duration of the life cycle, which occurred faster when the hours of darkness decreased, although the survival values were reduced. The regime with 14 hours of darkness provided the best conditions for the development and reproduction of *D. coccus*. The photoperiod regimes tested generated a low percentage of carminic acid (12%), so further studies are required to verify if it is the quantity and quality of light that influences the presence of the dye or the physiology of the host plant.

Key words: Survival, reproduction, natural dye, cactus pear



INTRODUCCIÓN

Por varios siglos algunos insectos han sido empleados para producir ceras, lacas y colorantes; dentro de este último grupo la cochinilla (*Dactylopius coccus*) es fuente de pigmento natural (Lagowska y Golan, 2009). Esta especie contiene varias antraquinonas que incluyen como principal compuesto al ácido carmínico (CAS:1260-17-9; CI: 75470) (González *et al.*, 2002), el cual se emplea en la elaboración de cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos, así como en aplicaciones plásticas y textiles (Borges *et al.*, 2012). El uso de este colorante ha sido aprobado en la Unión Europea y en Estados Unidos de América, como aditivo alimentario (Carmen, 2007), dada su inocuidad, alto poder colorante y estabilidad.

A pesar de que México fue uno de los principales productores de cochinilla a nivel mundial, su producción declinó y su exportación desapareció. Actualmente, su producción responde al interés artesanal y con el apoyo y esfuerzo de diversas instituciones públicas y privadas, su cultivo se impulsa nuevamente (Pérez Sandi y Cuen y Becerra, 2001). Considerando que la producción de cochinilla a cielo abierto es limitada por factores bióticos y abióticos (Campos-Figueroa y Llanderal, 2003) se han diseñado "biofábricas" para su cría intensiva, las cuales se validan en diversas regiones del país (Méndez-Gallegos, 2010). Históricamente, el comportamiento poblacional de la cochinilla ha estado relacionado con el fotoperiodo. En tiempos precolombinos la cochinilla era criada usando diversos materiales para brindar sombra y promover así la colonización y desarrollo del insecto. En los períodos fríos se conservaba en cuartos oscuros para proteger al pie de cría, este principio se sigue empleando, particularmente en el estado de Oaxaca. Autores como Flores-Flores y Tekelemburg (1995) y Montiel (1995) han establecido que el fotoperiodo afecta la duración del ciclo de desarrollo del insecto y producción; sin embargo, sus resultados al respecto son contradictorios. Considerando que la cría intensiva de la cochinilla tiende a realizarse en condiciones semi-controladas, el objetivo de este estudio fue conocer la supervivencia y reproducción de *Dactylopius coccus* y su calidad, en función del contenido de ácido carmínico en diversos regímenes de fotoperiodo en cámaras climáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en condiciones de cámara climática, en el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, La Laguna, España (22° 17' N y 16° 50' O). Se empleó el sistema de cría "a penca cortada" sin suministro de agua ni nutrimentos; las condiciones de las cámaras fueron: temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa entre 60% y 70%. Para determinar la influencia de la duración diaria de la fotofase y la escotofase sobre el desarrollo de *D. coccus*, se colocaron crías de cochinilla en cinco regímenes de fotoperiodo: 0/24, 8/16, 10/14, 12/12, y 24/0 h de fotofase/escotofase, respectivamente. Para simular las condiciones naturales en las zonas de cría la iluminación, ubicada en la parte superior de la celda, fue proporcionada por seis lámpa-

ras: tres de coloración diurna y tres fluorescentes, las cuales emitieron una radiación de la zona espectral del azul al rojo, asegurando así la continuidad de los procesos biológicos. El hospedante para la cría de la cochinilla fue *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cultivar amarillo. Se utilizaron cuatro cladodios de entre seis y 10 meses de edad para cada régimen de fotoperiodo, sin daños fisiológicos evidentes o de plagas. Todos los cladodios provinieron de una sola planta, se lavaron con agua corriente y se colocaron en el contenedor para la cría del insecto donde completó su ciclo de desarrollo (Figura 1).

El material biológico utilizado como pie de cría fue seleccionado de entre hembras adultas de *D. coccus* próximas a ovipositar, provenientes de una mezcla de varios cultivares; éste fue revisado para evitar la introducción de posibles antagonistas a las cámaras climáticas. Para iniciar la cría con cohortes de la misma edad se introdujeron 2.5 g de hembras próximas a parir en contenedores de tela de tul de 4x12 cm, y se fijaron a los cladodios con una espina de nopal, donde permanecieron adheridos durante 48 h.



Figura 1. Contenedor y acomodo de los cladodios de nopal (*O. ficus-indica* (L.) Mill.) para la cría de *D. coccus*.

Para determinar la influencia del periodo de luz/obscuridad sobre la supervivencia (l_x), cada cinco días se contabilizaron los individuos sobrevivientes en cada cludodio por intervalo de edad. Asimismo, se determinó la relación hembra/macho para cada régimen de fotoperiodo. La fecundidad de la cochinilla (m_x) se estimó con base en el número de ninfas y huevos producidos por cada hembra adulta por día, de una muestra de 10 hembras adultas seleccionadas al azar en cada régimen (tratamiento) de fotoperiodo. En este proceso, los huevecillos y las crías recién emergidas se cuantificaron dos veces al día (8 y 20 h) durante todo el periodo de reproducción. Con esta información se calculó la fecundidad total (huevos hembra⁻¹), fecundidad diaria (huevos hembra⁻¹ d⁻¹) y duración del periodo reproductivo (d). Con base en Méndez-Gallegos *et al.* (2010) se obtuvieron la tasa de supervivencia (l_x) y de fecundidad (m_x), considerando los valores de supervivencia y fecundidad de cada población, aplicando las ecuaciones propuestas por Birch (1948) y Krebs (1985).

Para determinar la diferencia estadística entre las curvas de supervivencia de *D. coccus* se empleó la prueba de Log rank ($\alpha=0.01$). Las diferencias entre la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) de cada cohorte se determinaron con la prueba de traslape de intervalos ($\alpha=0.05$) (Vera y Sotres, 1991) mediante el programa SUFERTI propuesto por Colunga y Vera (1991). Para analizar las variables fecundidad total, fecundidad diaria y duración del periodo reproductivo, el diseño experimental utilizado fue completamente al azar, considerando a los regímenes de foto-

periodo como tratamientos y las hembras individuales como repeticiones. En relación con el contenido de ácido carmínico se utilizaron los regímenes de fotoperiodo como tratamientos con tres repeticiones. En ambos casos se empleó el procedimiento ANOVA (SAS Institute, 2010) y las diferencias entre medias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Para determinar el contenido de ácido carmínico (AC) se optimizó un protocolo para su extracción y determinación (Cuadro 1). Una vez optimizado se tomó una muestra de hembras secas de cada cohorte, la cual se molió en un mortero de cerámica; luego se tomaron 125 mg de cada población, se agregaron 30 mL de ácido clorhídrico 2 N y se homogenizaron en un agitador durante un minuto.

Para la extracción del AC las muestras se sometieron a baño maría a 70 °C durante 35 minutos; posteriormente, se enfriaron y centrifugaron durante 15 minutos a 7000 rpm. Este proceso se repitió dos veces y los sobrenadantes se diluyeron en 250 mL de agua destilada. El AC se determinó a 494 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (Modelo UV-160 A) en tres repeticiones para cada población. Se construyó una curva de calibración, midiendo la absorbancia de una serie de concentraciones conocidas de AC, y se usó una muestra de HCL 2N como blanco (Figura 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó una relación directa entre la colonización inicial de las ninfas migrantes y el número de horas de obscuridad. La densidad

Cuadro 1. Protocolo para la cuantificación del AC de *D. coccus*.

Factores en estudio	Nivel	Peso (g)	Absorbancia (nm)	AC (mg kg ⁻¹)	AC (%)
Temperatura °C	30	0,1256	0,702	45,40	9,0
	50	0,1253	0,823	53,21	10,6
	70	0,1250	1,004	64,88	13,0
	80	0,1253	0,715	46,24	9,2
	65	0,1250	0,959	61,98	12,4
	75	0,1250	0,536	34,69	6,9
Tiempo de extracción (min)	15	0,1259	0,634	41,01	8,1
	25	0,1255	0,754	48,75	9,7
	30	0,1255	0,834	53,92	10,7
	35	0,1254	0,953	61,59	12,3
	45	0,1250	0,753	47,34	9,5
	60	0,1258	0,791	51,14	10,2
Dosis extractiva (mL de HCl 2N)	20	0,1255	0,750	48,50	9,7
	30	0,1245	0,854	55,21	11,1
	40	0,1250	0,748	48,37	9,7
Número de extracciones	1	0,1253	1,132	73,14	14,6
Usando mezclador	2	0,1257	1,207	77,98	15,5

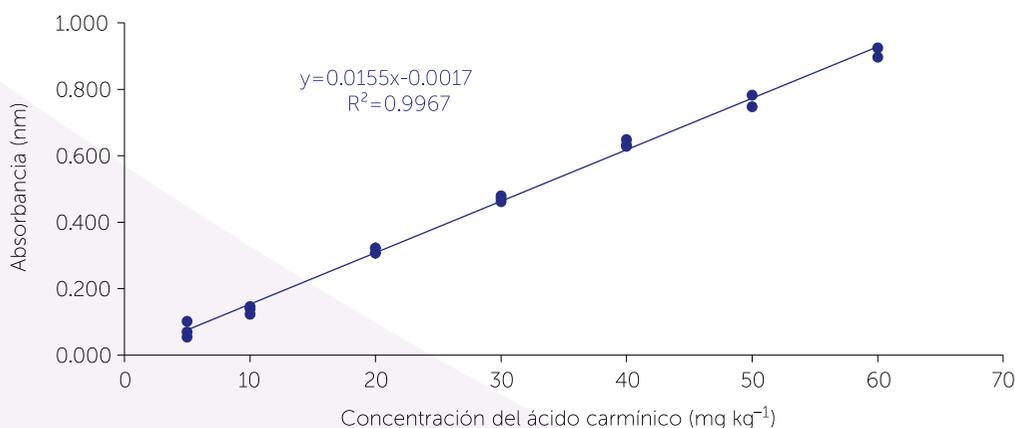


Figura 2. Calibración para la cuantificación del ácido carminico.

inicial de ninfas se incrementó de 719 en promedio por cladodio, con 12 horas de obscuridad, a 1,167 en obscuridad total, por lo que se atribuyó un comportamiento fototáctico negativo de la ninfa migrante durante su establecimiento y fijación en el cladodio. Es posible que este comportamiento esté ligado a la ausencia de una cubierta protectora (laca, cera, seda, etcétera) en esta primera fase de desarrollo, la cual puede estar presente en otros coccoideos. Otras especies como *D. austrinus* y *D. opuntiae* presentan un fototropismo negativo, dado que las ninfas se establecen en aquellos sitios donde no se presenta la incidencia de luz directa (Moran *et al.*, 1982; Moran y Hoffman, 1987; Aldama-Aguilera y Llanderal-Cázares, 2003). Por el contrario, para la misma especie, Montiel (1995) afirma que las ninfas se establecen en sitios bien iluminados, presentando fototaxia positiva. Los resultados de este estudio, sugieren que durante la infestación se debe reducir la cantidad de luz para proteger a las ninfas migrantes, favorecer su estable-

cimiento y promover la oviposición; posteriormente se recomienda moverlas a regímenes más favorables de luz a fin de evitar daños a la planta hospedante y al insecto mismo. La velocidad de desarrollo de los individuos criados en regímenes de luz continua fue más rápida. Por el contrario, cuando la cochinilla se desarrolló en obscuridad total, la velocidad se redujo y el ciclo se alargó hasta en 20 d. En aquellas cohortes desarrolladas a 12, 14 y 16 h de obscuridad, los ciclos de desarrollo fueron muy homogéneos, completando el ciclo en 75 d promedio. La mayor supervivencia (31%) hasta el estado adulto se registró con 14 h de obscuridad, disminuyendo a 10% al incrementarla a 16 h; la población desarrollada en obscuridad total presentó una supervivencia de 15%. En contraste, Montiel (1995) observó una supervivencia más alta en hembras de *D. coccus* a 12 h (41%) y 16 h (40%) de obscuridad en *O. ficus-indica*. En *D. opuntiae*, el porcentaje de supervivencia ha sido hasta de 66% (Flores-Hernández *et al.*, 2006).

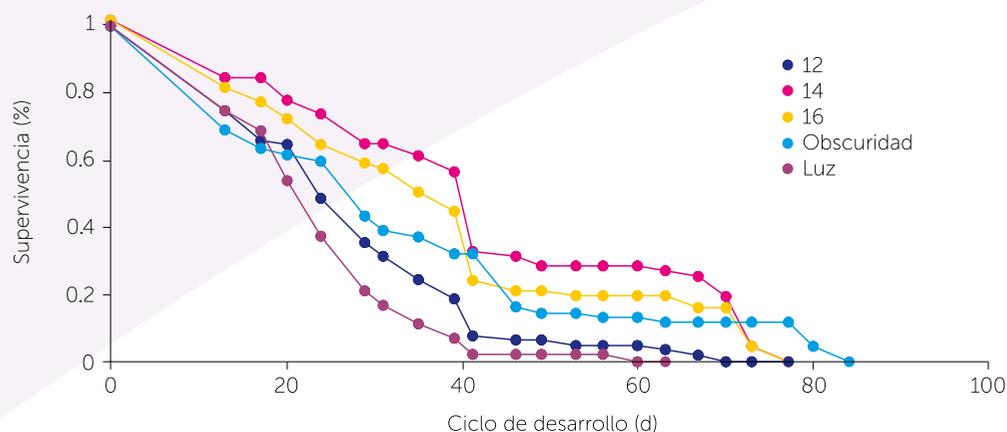


Figura 3. Curvas de supervivencia de *D. coccus* criadas en cinco regímenes de obscuridad.

Cuando la cochinilla se cría a mayor cantidad de horas luz (12 h), únicamente 6% de los individuos iniciales alcanza el estado adulto. Este comportamiento fue más evidente en la cohorte mantenida con luz continua, ya que solamente 1% de su población inicial alcanzó el estado adulto (Figura 3). La prueba de Log rank mostró que la curva de supervivencia de la cohorte desarrollada bajo el régimen de 12 h de obscuridad fue diferente al resto de las curvas de supervivencia de las poblaciones evaluadas ($X^2=6.635$; g.l.=1; $\alpha=0.01$). Las diferencias significativas de supervivencia fueron registradas entre las curvas de 14 h de obscuridad y la de luz continua, así como entre las curvas de luz y obscuridad constantes; sin embargo, entre las curvas de supervivencia de las poblaciones sometidas a 14 h y 16 h de obscuridad no hubo diferencias estadísticas. Un resultado similar se registró con las curvas de 14 h de obscuridad con la de obscuridad total y aquéllas de 16 h de obscuridad y de luz continua.



Las cohortes criadas a luz constante y a 12 h de obscuridad presentaron un efecto deletéreo en su supervivencia. A pesar de que en los otros regímenes de fotoperiodo no se encontraron valores altos de supervivencia, éstos permitieron el establecimiento y desarrollo del insecto, aunque con un retraso en el desarrollo y una disminución de la población de cochinilla. En este sentido, se resalta que, independientemente de su longitud de onda, intensidad luminosa y duración, la luz puede tener una función importante en el desarrollo de la cochinilla. Sin embargo, no se detectó si es la cantidad o la calidad de la radiación la que genera un detri-

mento sobre el insecto, o bien, la duración diaria de la escotofase. En este sentido es posible que la duración diaria de la escotofase puede ocasionar daños directos e indirectos al hospedante, tales como la reducción de la actividad fotosintética, sobre todo si se considera el metabolismo CAM de las cactáceas, las cuales requieren necesariamente de la obscuridad para el intercambio de CO_2 (Nobel, 1998).

El inicio de la reproducción con 12 h se presentó aproximadamente a los 61 d, mientras que la reproducción de las poblaciones desarrolladas entre 14 y 16 h se registró a los 62 d. Por el contrario, con el régimen de obscuridad completa la reproducción se retrasó hasta 8 d. En condiciones de campo Rodrigo *et al.* (2010) observaron que el tiempo de desarrollo fue de 78 días; mientras que Montiel (1995) registró una duración del ciclo de 84 d en los fotoperiodos de 12/12 y 8/16. Se que cuando la cochinilla es so-

metida a un proceso de luz constante, ocurre un efecto poco favorable para su desarrollo, ya que ningún individuo alcanzó la etapa reproductiva. El número total de huevecillos producidos por hembra durante el periodo de oviposición varió de acuerdo con la duración diaria de obscuridad (Cuadro 2), registrando que el número promedio de descendientes por hembra se duplicó conforme se alargó el periodo de obscuridad de 12 a 16 h (69.5 ± 66 a 130 ± 71.6 individuos). Se esperaría que aquellas hembras desarrolladas en condiciones de obscuridad completa presenten baja fecundidad; sin embargo, dicha población presentó el segundo valor medio más

Cuadro 2. Efecto de la duración diaria de obscuridad sobre la fecundidad de *D. coccus* (n=10).

Parámetros	Duración diaria de obscuridad (h)*			
	12	14	16	24
**Fecundidad media total (huevos/hembra \pm SE)	69.5 \pm 6 b	112.9 \pm 61.3ab	130.3 \pm 72 a	115.2 \pm 35 a
Fecundidad diaria(huevos/hembras/d \pm SE)	6.9 \pm 4 b	10.6 \pm 4 a	11.0 \pm 5.1 a	9.8 \pm 1.9 ab
Período reproductivo (d \pm SE)	8.1 \pm 5.1 a	10.2 \pm 3.5 a	11 \pm 3.5 a	11.7 \pm 2 a
Proporción sexual (♀/♂)	0.71	0.74	0.76	0.83

* No se incluyen los datos de 24 h luz.; ** Fila con la misma letra no son diferentes estadísticamente ($\alpha=0.05$).

alto de descendientes, pero estadísticamente igual al valor obtenido en 16 h de obscuridad. Una relación importante fue que la duración del periodo reproductivo se alargó conforme se incrementaron las horas de obscuridad, resultado que apoya la recomendación de proteger a la hembra reproductiva mediante un fotoperiodo más largo para incrementar su tasa de fecundidad (Cuadro 2). La fecundidad media total y la duración del periodo reproductivo fueron mayores a los consignados por Montiel (1995) a 12 h (38 individuos) y 16 h (48 individuos) de obscuridad, pero menores a los registrados por Méndez-Gallegos *et al.* (2010) en el cultivar Offer de 215 individuos hembra⁻¹.

La Figura 4 indica que las hembras desarrolladas a 16 h de obscuridad obtuvieron el valor más alto de huevecillos, y que las mantenidas a 12 h de obscuridad registraron el más bajo; en tanto, las hembras provenientes de 14 h de obscuridad y obscuridad total presentaron valores intermedios muy semejantes. Se observó una correlación positiva entre la dimensión de la hembra, la duración del periodo reproductivo y

el número de huevecillos ovipositados. Las hembras con una dimensión de 6×5 mm (largo y ancho) generaron en promedio 205 individuos hembra⁻¹, en contraste aquellas hembras cuya talla fue de 5×3 mm produjeron solamente 73 individuos hembra⁻¹; esta tendencia también la registraron Mathenge *et al.* (2009) en *D. tomentosus*.

Los valores de fecundidad fueron bajos, heterogéneos y variaron según la duración diaria de las horas de obscuridad. Estas tendencias podrían atribuirse a la alta proporción de hembras comparada con los machos presentes en todos los regímenes de fotoperiodo evaluados; la proporción sexual (♀/♂) osciló entre 3.5:1 a 12 h de obscuridad hasta 6:1 en los regímenes de luz y obscuridad continua. La relación hembra/macho pudo evitar baja fertilización, fecundación parcial, fertilización tardía de las hembras, o bien, que la baja cantidad de luz habría influenciado un bajo nivel de movimiento del macho. Los resultados sugieren que la variación del día corto a día largo influye en la reproducción de la cochinilla, en la fisiología de la planta hospedante y, por tanto, en la nutrición misma del insecto. La población desarrollada en 14 h de obscuridad registró el valor más alto de la tasa neta reproductiva R_0 (hembra hembra⁻¹ generación⁻¹) y de la tasa intrínseca de incremento natural r_m (hembras d⁻¹) (Cuadro 2). Asimismo, se observa que la población mantenida a 14 h de obscuridad se incrementó 3.6 veces en un periodo de 66 d, lo que indica que, teóricamente, dicha población podría multiplicarse diariamente un 2% y duplicar su tamaño en 35 d. La tasa intrínseca de incremento natural (r_m) de *D. coccus* entre poblaciones difirió estadísticamente (Cuadro 3). El valor más alto de la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) de *D. coccus* (0.0193) se obtuvo cuando la cohorte se crió a 14 horas de obscuridad (Cuadro 3). Méndez-Gallegos *et al.* (2010) determinaron un valor superior de 0.0025 hembras día⁻¹ en colonias de *D. coccus* criadas en el cultivar Offer. Este parámetro, que conjunta tanto los valores de supervivencia y de fecundidad, permiten precisar si la población puede aumentar o reducirse y, bajo esta condición de obscuridad, la población podría duplicarse en un periodo de 36 días, mientras que en el régimen de 12 de obscuridad, duplicarse le tomaría 204 días.

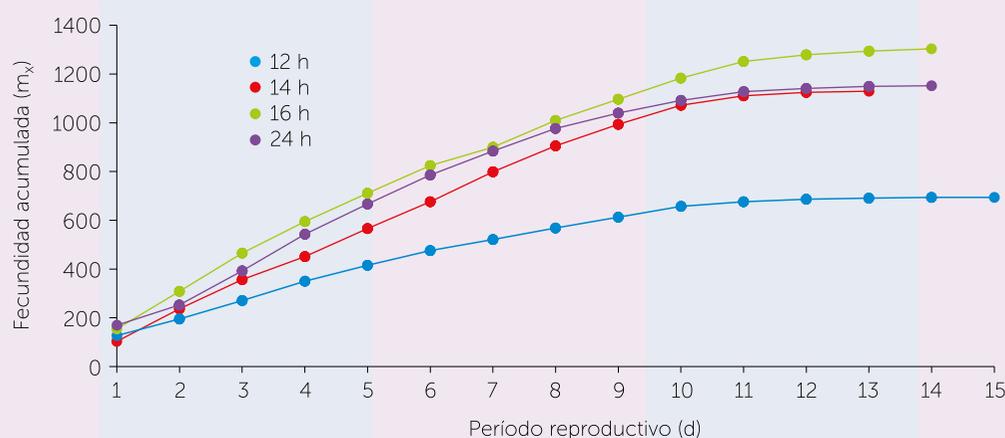


Figura 4. Curvas acumulativas de oviposición de *D. coccus* criadas en cuatro regímenes de obscuridad.

No se registraron diferencias estadísticas ($F=0.49$; $g.l.=3,11$; $Pr>0.7011$) entre los porcentajes de ácido carmínico (AC) de las poblaciones evaluadas en las diferentes regímenes de fotoperiodo. Asimismo, no se observó una tendencia clara de la duración de las horas de obscuridad y el contenido de AC en las poblaciones evaluadas; sin embargo, la presencia del AC se ve favorecida por la disminución de las horas de obscuridad, aunque no fue este el caso para la población mantenida en obscuridad total, la cual presentó un aumento muy ligero. El porcentaje de AC en este estudio fue en promedio 11.5% promedio, valor inferior al registrado por Aldama-Aguilera et al. (2005), Rodríguez et al. (2005), Briseño-Garzón y Llanderal (2008), y no reúne las características de calidad que requiere el mercado. El valor promedio más alto se obtuvo con la población desarrollada con mayor cantidad de luz (11.9%), lo que podría indicar su importancia en la producción de AC. El bajo contenido de AC registrado en este estudio pudo estar relacionado a que la cochinilla fue criada en ambiente confinado, con cladodios desprendidos de la planta madre (sin suministro adicional de nutrimentos ni agua) y provenientes de plantas sin manejo agronómico previo (sin riego y sin fertilización).

CONCLUSIONES

Con el incremento de las horas luz, la duración del ciclo de desarrollo de *D. coccus* se reduce, pero su mortalidad se incrementa. Los regímenes de 14 horas de obscuridad y 10 horas de luz favorecen la supervivencia y la fecundidad de *D. coccus*. El porcentaje de ácido carmínico en todos los tratamientos fue bajo, por lo que se recomienda verificar si la cantidad y calidad de

Cuadro 3. Parámetros demográficos de *D. coccus* criada en cuatro regímenes de fotoperiodo.

Obscuridad (h)	R_0	G	r_m	λ	TD
12	1.251	64.99	0.0034 ^c	1.0034	203.9
14	3.612	66.47	0.0193 ^a	1.0195	35.91
16	3.25	66.39	0.0170 ^b	1.0179	40.77
24	1.843	72.08	0.0084 ^d	1.008	82.51

Prueba de traslape de Intervalos ($\alpha=0.05$).

luz desempeñan un rol determinante sobre el insecto, o bien, en la planta hospedante.

LITERATURA CITADA

- Aldama-Aguilera C., Llanderal-Cázares C. 2003. Grana cochinilla: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia* 37(1):11-19.
- Aldama-Aguilera C., Llanderal-Cázares C., Soto-Hernández, M. R., Castillo-Márquez L. E. 2005. Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en plantas de nopal a la intemperie y en micro-túneles. *Agrociencia*. 39:161-171.
- Birch L.C. 1948. The intrinsic rate of natural increase on an insect population. *J. Anim. Ecol.* 17: 15-26.
- Borges M. E., Tejera R. L., Díaz L., Esparza P., Ibáñez E. 2012. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). *New extraction methods*. *Food Chemistry*. 132:1855-1860.
- Briseño-Garzón A., Llanderal C. 2008. Contenido de ácido carmínico en hembras de grana-cochinilla de diferentes edades. *In: Llanderal, C., Zetina, D., Viguera, A.L., y L. Portillo (eds). Grana cochinilla y colorantes naturales*. Colegio de Postgraduados. México. pp:16-20.
- Carmen S. 2007. *Food colorants: Chemical and Functional Properties*. Boca Raton: CRC Press. 648 p.
- Campos-Figueroa M., Llanderal-Cázares C. 2003. Producción de grana-cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia* 37(2):149-155.
- Colunga G.M., Vera J.G. 1991. SUFERTI. Programa de computación para estimar y comparar algunas estadísticas demográficas en insectos. *In: Resúmenes XXVI Congreso Nacional de Entomología*. Sociedad Mexicana de Entomología. Oaxaca, México 1991. pp: 137-138.
- Flores-Flores V., Tekelenburg A. 1995. *Dactylopius coccus* Costa dye production. *In: Barbera, G., Inglese, P., y E. Pimienta (eds) Agroecología, cultivarion and uses of cactus pear*. FAO Plant Production and Protection Paper. 132:167-185.
- Flores-Hernández A., Murillo-Amador B., Rueda-Puente E. O., Salazar-Torres J. C. García-Hernández J. L., Troyo-Diéguez E. 2006. Reproducción de cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 77:97-102.
- González M., Méndez J., Carnero A., Lobo M.G., Afonso A. 2002. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* 50:6968-6974.
- Krebs C.J. 1985. *Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 3rd. Ed. Harper Int. New York. 754 p.
- Lagowska B., Golan K. 2009. Scale insects/ Hemiptera, Coccoidea/ as a source of natural dye and other useful substances. *Aphids and other Hemipterous Insects*. 15:151-167.
- Mathenge C.W., Holford P., Hoffmann J.H., Spooner-Hart R., Beattie G.A.C., Zimmermann H.G. 2009. The biology of *Dactylopius tomentosus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Bull. Entomol. Res.* 99: 551-559.
- Méndez-Gallegos S. de J. 2010. De los montes a la biofábrica: La evolución de los sistemas de cría de la cochinilla. *In: Portillo, L., y A. L. Viguera (eds).*

- Conocimiento y Aprovechamiento de la Grana Cochinilla. Universidad de Guadalajara. México. pp: 135-144. ISBN: 978-607-7533-56-6.
- Méndez-Gallegos S. de J., Tarango-Arámbula L. A., Carnero A., Tiberi R., Díaz-Gómez O. 2010. Crecimiento poblacional de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa criada en cinco cultivares de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. *Agrociencia*. 44:225-234.
- Montiel R.L. 1995. Morfología de *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) y su biología y reproducción en dos fotoperiodos. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 104 p.
- Moran V. C., Gunn B. H., Walter H. G. 1982. Wind dispersal and settling of first-instar crawlers of the cochineal insect *Dactylopius austrinus* (Homoptera: Dactylopiidae). *Ecol. Entomol.* 12:51-60.
- Moran V. C., Hoffman J. H. 1987. The effects of simulated and natural rainfall on cochineal insects (Homoptera: Dactylopiidae): colony distribution and survival on cactus cladodes. *Ecol. Entomol.* 12:61-68.
- Nobel P. S. 1998. Los incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. México. 211 p.
- Pérez Sandi C. M., Becerra R. 2001. Nocheztli: el insecto del rojo carmín. *CONABIO. Biodiversitas*. 316:1-8.
- Rodrigo E., Catalá-Oltra M., Grandero M. 2010. Estudio comparativo de la morfología y biología de *Dactylopius coccus* Costa y *D. Opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae), dos especies presentes en la comunidad valenciana. *Bol. San. Veg. Plagas*. 36:23-35.
- Rodríguez L.C., Faúndez E., Seymour J., Escobar C., Espinoza L., Petroutsa M., Ayres A., Niemeyer H.N. 2005. Factores bióticos y concentración del ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae). *Agric. Téc.* 65(3):323-329.
- SAS. 2010. Statistical Analysis System. SAS V. 9.3 Software® Copyright (c) 2002-2010 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Vera G.J., Sotres D.R. 1991. Prueba de traslapeo de intervalos para comparar tasas instantáneas de desarrollo poblacional. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal* 2(2):7-13.



EL LINÁLOE (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), ESPECIE MADERABLE AMENAZADA: UNA ESTRATEGIA PARA SU CONSERVACIÓN

LINALOE (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski Calderon & Medina), THREATENED SPECIES WITH TIMBER AND INDUSTRIAL POTENTIAL: A STRATEGY FOR ITS CONSERVATION

Arellano-Ostoa, G.¹, González-Bernal, S². Arellano-Hernández, G.^{1*}

¹Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad–Fruticultura, Colegio de Posgraduados, *Campus* Montecillo, Km 36.5 carretera México-Texcoco, Texcoco México CP 56230. ²P.S. Ing. Agrícola egr. FESC-UNAM, Km. 2.5 de la Carretera Cuautitlán Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, México. CP. 54714.

*Autor responsable: arellano@colpos.mx

RESUMEN

El árbol de lináloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina), es una especie amenazada, debido a la sobreexplotación que ha sufrido en los estados mexicanos de Puebla, Guerrero, Morelos y Oaxaca. El uso principal es la fabricación de las artesanías de Olinalá, Guerrero, que utilizan secciones de madera necrosada o "jaspe", lo cual incrementa su valor comercial y las identifica como artesanías originales debido a su apariencia y aroma. También se obtiene aceite esencial por la destilación de la madera y frutos que se utiliza en las industrias de perfumería y farmacéutica. Estas actividades implican la explotación de las poblaciones naturales que se han realizado sin considerar programas de manejo sustentable. En este trabajo se presenta una alternativa para la propagación del lináloe, a través del enraizamiento de estacas de árboles adultos nativos seleccionados de la cuenca del río Balsas, México. Esta técnica permitirá a corto plazo establecer viveros en las zonas rurales y en forma mediata el establecimiento de plantaciones para la explotación sustentable de la especie.

Palabras clave: Estacas, enraizamiento, linalol, propagación, Burceraceae.

ABSTRACT

The LINALOE tree (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski Calderon & Medina), is a species endangered because of over-exploitation in the Mexican states of Puebla, Guerrero, Morelos and Oaxaca. Its main application is in the manufacture of handicrafts in Olinalá, Guerrero, where necrotic or "jaspe" wood sections are used, increasing their market value and identifying them as original crafts due to their appearance and aroma. Essential oil is also obtained from distillation of wood and fruits, and it is used in the perfume and pharmaceutical industries. These activities involve the exploitation of natural populations that has been conducted without regard to sustainable management programs. This study presents an alternative for the propagation of linaloe tree, through rooting of cuttings of mature native trees selected in the river Balsas basin, México. This technique will allow establishing nurseries in rural areas in the short-term, and in the mediate way establishing plantations for the sustainable exploitation of the species.

Key words: cuttings, rooting, linaloe, propagation, Burceraceae.



INTRODUCCIÓN

El género

Bursera agrupa a un centenar de especies leñosas distribuidas solo en el Continente Americano. Su centro de diversidad se localiza en México, donde hasta la fecha se conocen al menos 80 especies que habitan en los bosques tropicales a altitudes entre 650 y 1800 m, situados principalmente en la cuenca del río Balsas (Rzedowski *et al.*, 2005). El lináloe (*Bursera linanoe* (La Llave) Rzedowski, Calderón & Medina) es un miembro importante de este grupo y generalmente se trata de árboles de tamaño bajo a medio (5 a 15 m); se considera característico de comunidades maduras, ya que su presencia en los sitios perturbados es poco frecuente. Es una especie dioica, muy resinosa, con aroma agradable y penetrante. Presenta un tronco de hasta 60 cm de diámetro, con corteza gris-rojiza, no exfoliante y con ramillas lignificadas rojizas oscuras. Su floración se presenta de mayo a principios de julio y se encuentra desprovisto de follaje durante los meses de noviembre a mayo (Figura 1) (Rzedowski y Kruse, 1979).

El lináloe se conoce mundialmente por el fino aroma de su aceite esencial; en México se ha explotado de forma intensiva desde el siglo XIX, siendo Francia e Inglaterra los principales mercados para la madera y el aceite esencial. Desde fines del siglo XIX y durante la primera mitad del XX, en México se destiló el aceite que se exportaba a Estados Unidos de América y Europa para ser utilizada por la industria de la perfumería. Sin embargo, los ingleses se llevaron propágulos de plantas mexicanas de *B. delpechianum* a la India para su cultivo comercial, produciendo a la fecha cerca de 50 toneladas de aceite



Figura 1. Corteza gris-rojiza de lináloe (*Bursera linanoe*) y frutos de un ejemplar de Chiautla, Puebla, México.

al año, lo que les ha permitido abastecer de linalol a las industrias especializadas en todo el mundo y desplazar al aceite proveniente de México (Hussain, 1993; Hersch-Martínez, 2005). Además de lo anterior, la especie se usa para artesanías en los estados de Puebla, Guerrero, Morelos y Oaxaca, causando sobreexplotación, sin un programa de sustentabilidad, por lo que la especie se ha visto amenazada (Figura 2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategias de propagación

La propagación vegetativa de esta especie, así como de otras del mismo género, sería importante ya que su establecimiento en sitios perturbados aceleraría la sucesión y ayudaría a restablecer la composición y estructura de las comunidades naturales (Bradshaw, 1987; Bonfil-Sonders *et al.*, 2007). El lináloe es una especie recalcitrante para su propagación por semilla, dado que únicamente 10% de éstas germinan (Andrés-Hernández y Espinosa-Organista, 2002) debido a la dureza de las cubiertas seminales y su impermeabilidad al agua y al oxígeno. Por otro lado, en trabajos publicados sobre la propagación vegetativa de esta especie se ha mencionado un enraizamiento



Figura 2. Artesanías de Olinálá, Guerrero hechas de *Bursera linanoe*.

de entre 17% y 40%, utilizando material juvenil (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007; Castellanos-Castro y Bonfil-Sanders, 2010). Es importante considerar que el proceso de formación de raíces adventicias en varias especies leñosas es afectado por la variación genética, el estado ontogénico del tejido, características fisiológicas del brote y los tratamientos que se aplican a las estacas después de que son cortadas (Bonga, 1982), además de que las diferencias en la respuesta entre materiales del mismo genotipo se puede atribuir a: cambios fisiológicos a escala hormonal, edad ontogénica del propágulo y factores ambientales como temperatura, humedad, luz y nutrición mineral (Marks *et al.*, 1998; Howard, 1996). Al parecer, los niveles de auxina limitan el enraizamiento en muchas especies consideradas difíciles, de modo que se requiere una aplicación exógena para contrarrestar los bajos niveles y favorecer el enraizamiento (De Klerk *et al.*, 1999).

Selección de individuos nativos

Se seleccionó en campo y recolectó el material vegetativo de árboles nativos de lináloe (*Bursera linanoe*) en las localidades de Chiautla, Puebla, Olinálá, en el estado de Guerrero, y la Tigra, Morelos (Figura 3). La recolecta fue llevada a cabo durante las cuatro épocas del año (invierno, otoño, primavera y verano) para evaluar el potencial de enraizamiento *in vivo*. Se usó el hábito de crecimiento como parámetro para seleccionar a los árboles que podrían ser utilizados para la producción de madera (hábito erecto) y de aceite (hábito ramificado). Además se

consideró el sexo de los individuos para el mismo fin, es decir, individuos machos para uso potencial maderable e individuos hembra para uso industrial (Cuadro 1).

Se obtuvieron estacas procedentes de la parte basal (Rb) y de la copa (C) del mismo árbol (Ballester *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2003) (Figura 4). Las estacas se recolectaron durante los meses de octubre-noviembre (otoño), diciembre-febrero (invierno), marzo-mayo (primavera) y julio-agosto (verano) para determinar la mejor época de enraizamiento. En la mayoría de los casos la longitud final de las estacas fue de entre 15 cm a 20 cm, con presencia o no de hojas, según la época de evaluación.

Cuadro 1. Características de los árboles de lináloe (*Bursera linanoe*) seleccionados en la Cuenca del Río Balsas, México para propagación asexual.

Clon	Procedencia	Hábito/sexo	Uso
CP1	Puebla	Ramificado/macho	Maderable
JCP	Puebla	Ramificado/hembra	Industrial
2CP	Puebla	Erecto/macho	Maderable
OEAL1	Guerrero	Ramificado/hembra	Industrial
OEAL2	Guerrero	Ramificado/hembra	Industrial
OEJ	Morelos	Ramificado	Industrial



Figura 3. Individuos seleccionados de lináloe (*Bursera linanoe*) recolectados en localidades de: A: Guerrero, B: Morelos, C: Oaxaca y D: Puebla.

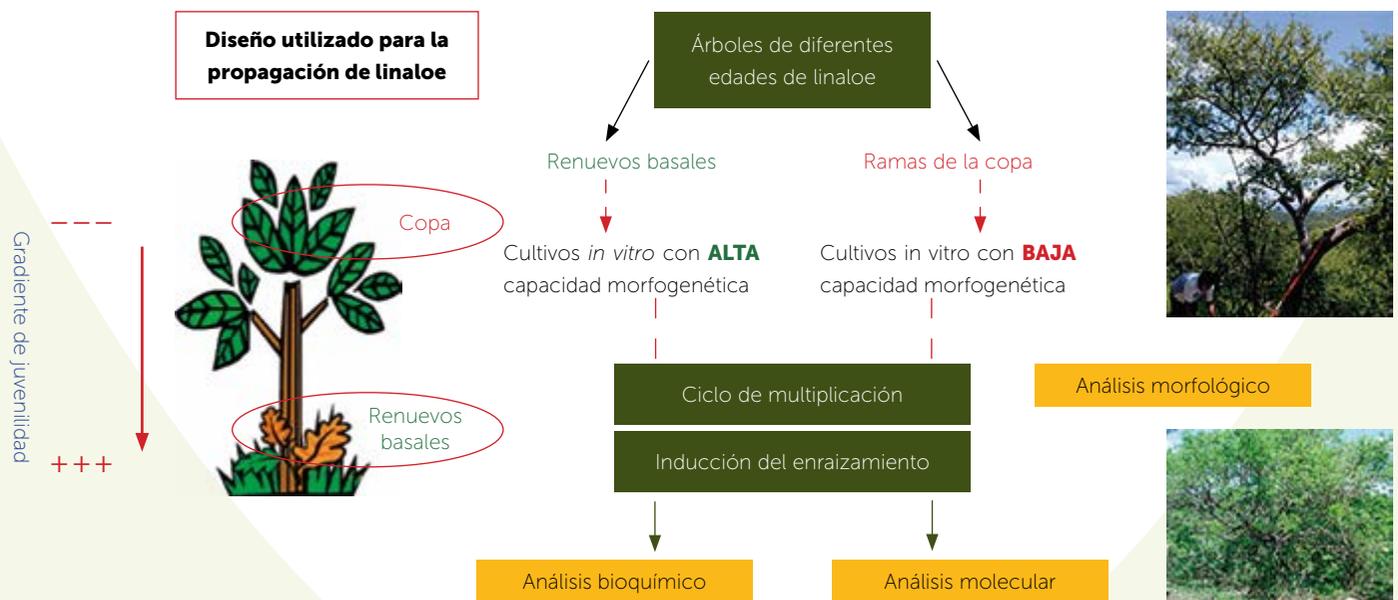


Figura 4. Modelo experimental utilizado para la clonación de árboles de lináloe (*Bursera lináloe*) seleccionados para propagación asexual. Modificado de Ballester *et al.* (1999).

En cada época del año se realizaron dos experimentos independientes. Se evaluó la aplicación del producto comercial Radix® 10,000 (i.a. ácido indol-3-butírico (AIB) 10,000 ppm) y para conformar los tratamientos (T0-T4) el p.c. se diluyó con talco al 0%, 10%, 20%, 40% y 80%. Se evaluó la aplicación a nivel reactivo de AIB y el ácido nafalén acético (ANA) en concentraciones de 10,000 mg kg⁻¹; el RAIZONE* PLUS (i.a. 3% AIB y 0.06% Alfa-naftilacetamida) en polvo; la mezcla líquida de 5,000 mg kg⁻¹ ANA+5,000 mg kg⁻¹ AIB y el testigo sin hormonas. Para cada clon o árbol seleccionado se usaron entre 20 y 35 estacas por tratamiento, según la cantidad de material disponible por individuo.

En la preparación de las estacas se retiraron dos terceras partes de las hojas, (verano); posteriormente se realizó un corte transversal en la base de la estaca en la parte inferior donde se ubicara una yema, y un corte inclinado por arriba de otra yema en la parte superior. Las estacas se trataron con una solución de 2 g L⁻¹ del fungicida a base de benomilo por 30 minutos. Posteriormente se les aplicó el tratamiento con el enraizador a la concentración indicada, en forma de polvo o líquido (Figura 5, 6).

Las estacas se establecieron en una cámara de enraizamiento bajo condiciones de invernadero, manteniendo la humedad relativa cercana a 100% con la ayuda de un sistema de nebulización intermitente y la temperatura

del sustrato a 28 °C, por medio de resistencias eléctricas. La temperatura media del aire en la cámara fue de 25 °C y la mínima de 18 °C. Se utilizó una mezcla base de sustrato de 2:1 v/v peat moss y agrolita, la cual no requiere esterilización. Después de 60 días se evaluaron las siguientes variables por tratamiento y por época del año: Porcentaje de enraizamiento (% ER), número de raíces por estaca (NR), longitud radical (LR), porcentaje de estacas vivas sin enraizar (EV), porcentaje de estacas muertas (EM), porcentaje de estacas con callo (% Callo) y número de estacas brotadas con y sin raíz (PB). Cada siete días se realizaron aplicaciones de fungicidas y bactericidas a las estacas, excepto en las épocas donde no había hojas. Con relación a los sustratos, se usaron materiales del lugar de origen de la especie y otros comerciales para producción de plantas en vivero.

RESULTADOS

Efecto de la concentración de Radix® (verano)

El porcentaje máximo de enraizamiento obtenido (27%) fue muy bajo, comparado con los valores registrados en otras especies del género *Bursera* spp., lo que demuestra que el lináloe es una especie de difícil enraizamiento. Bonfil-Sanders *et al.* (2007) encontraron que el rango en la formación de callo fue de entre 40% y 100% en siete especies de *Bursera*, mientras que el de raíces osciló entre 18% y 70%. Esta dificultad se agrava cuando



Figura 5. Secuencia de la preparación de estacas de lináloe (*Bursera lináloe*) con enraizador en polvo: A, B, C: Enraizamiento en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. D, E, F: Enraizamiento en Vivero en Olinálá, Guerrero.

se parte de material adulto que procede de áreas rurales, por lo que es necesario el diseño de estrategias adecuadas de propagación para obtener individuos con calidad que reciban un mantenimiento correcto dentro de un programa de manejo de viveros. La Figura 7 muestra que las estacas con hojas colectadas en el verano, de los árboles nativos seleccionados en Puebla, tuvieron un enraizamiento diferente. El clon CP1 en su modalidad (Rb), es decir, con características juveniles, fue el

que obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento (27%) con el producto Radix® 10,000 diluido al 80%. Con esta concentración, el mismo material CP1 en su modalidad (C), que presentó características adultas, tuvo un enraizamiento ligeramente mayor (14%) al resto de los clones evaluados (JCP y 2CP). Estos resultados sugieren que el lináloe presenta variabilidad genética para la capacidad de enraizamiento, resultados que fueron constatados cuando se evaluaron individuos

procedentes de los estados de Guerrero y Morelos.

Cabe indicar que las estacas de todos los clones evaluados que sirvieron como testigo no formaron raíces adventicias, lo que puso de manifiesto que el uso de las auxinas es imprescindible para inducir la formación de raíces. Se observó también que sin la aplicación de auxina o enraizador se produjo mayor porcentaje de callo en la base de las estacas de los clones evaluados.



Figura 6. Preparación de las estacas con hojas de lináloe (*Bursera lináloe*). A: Enraizador líquido, B: Enraizador en polvo, C: Condiciones de nebulización.

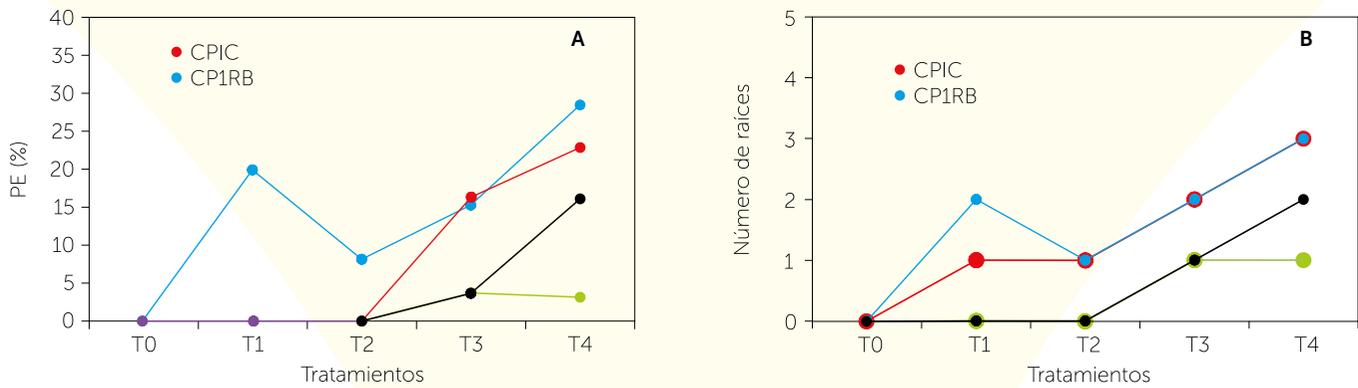


Figura 7. Estacas enraizadas de *Bursera linanoe* durante la época de verano con diferentes diluciones del enraizador Radix® 10,000. T0= Testigo; T1=10%; T2=20%; T3=40% y T4=80%. A: Porcentaje de enraizamiento (PE) y (B) número promedio de raíces por estaca, de los clones evaluados de lináloe colectados en Chiautla, Puebla.

Algunos autores mencionan que la formación de callo podría suponer que existe un mayor potencial para obtener éxito en el desarrollo de las raíces (Bonfil-Sanders *et al.*, 2007); sin embargo, en este estudio se observó que en todos los clones evaluados se presentó alto porcentaje de callo el cual, aun después de 60 días, no culminó con el desarrollo de raíces (Figura 8, 9). Estos resultados están en línea con lo mencionado por Hartmann *et al.* (1990) y Vidal *et al.* (2003) en el sentido de que la formación de callo en muchos casos no conlleva a la formación de raíces, o bien, son eventos antagónicos.

Se pudo observar que en las épocas de otoño e invierno no hubo enraizamiento; por tal motivo, se tomó la decisión de evaluar nuevamente la época de verano, la cual sí había presentado un efecto positivo en la formación

de raíces en los árboles colectados en Chiautla, Puebla. Para este estudio se colectaron muestras de árboles seleccionados en la región de Ixcamilpa, Puebla y Olinalá, Guerrero y fueron sometidos a tratamientos con enraizador, aplicados tanto en forma de polvo como líquida.

Efecto del tipo de enraizador en forma líquida (verano)

La Figura 10 muestra que existió un comportamiento diferencial entre clones en la respuesta al enraizamiento. Los clones tuvieron su mejor respuesta con Radix® 10,000 (OEJ1 con 33%) y ANA 10,000 ppm para OEAL1 (25%) y OEAL2 (21%). Sin embargo, el clon OEAL1 enraizó con todos los tratamientos probados, excepto con el testigo. Los tratamientos que mejor respondieron a la formación de raíces fueron el Radix® 10,000 en polvo sin diluir y la aplicación líquida de ANA 10,000 mg kg⁻¹.

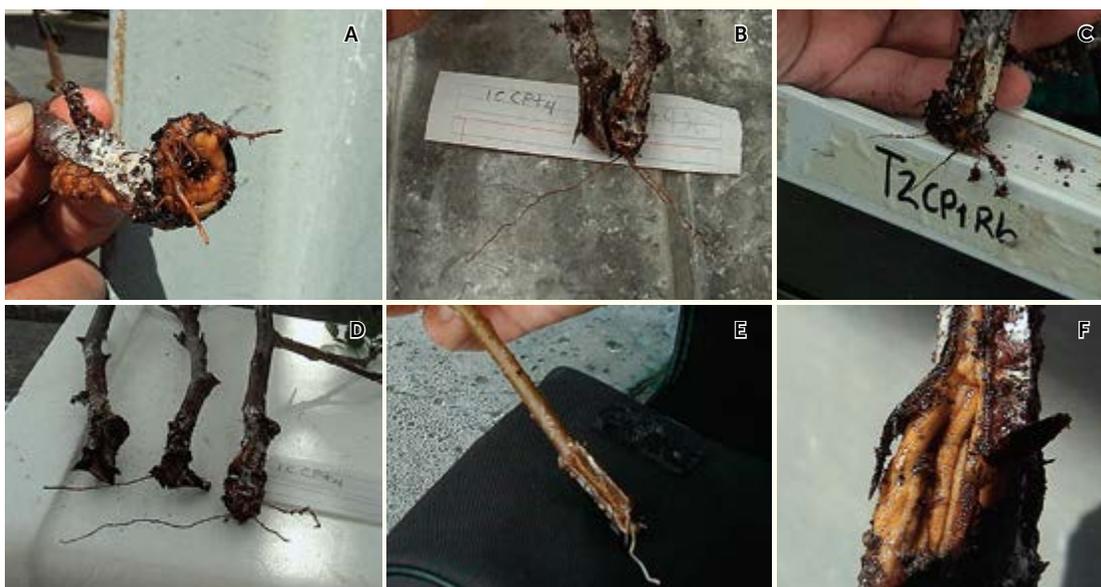


Figura 8. Estacas enraizadas de lináloe (*Bursera linanoe*) en época de verano con Radix® 10000 al 80%. A: Estaca juvenil con tres raíces, después de 10 semanas de iniciado el proceso. B, C, D: Estacas enraizadas derivadas de la copa del clon CP1. E: Estaca que formó una raíz muy débil y F: Estaca que generó solo callo.

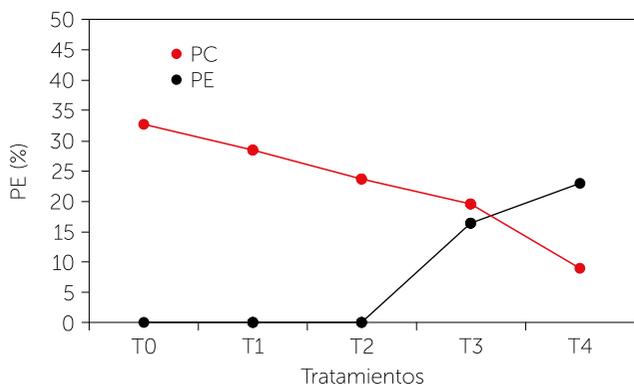


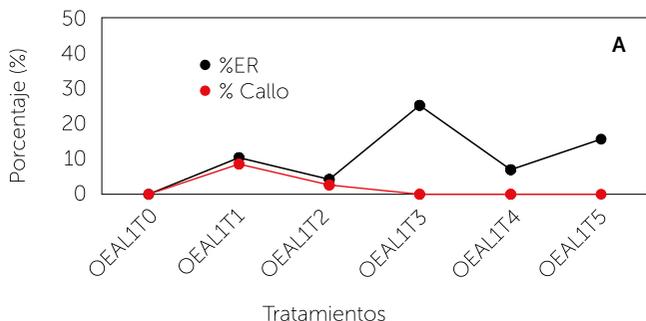
Figura 9. Evaluación de enraizamiento en el clon CP1c de lináloe (*Bursera lináloe*), mostrando la relación inversa entre (% ER) y producción de callo (% Callo). Se usaron diferentes diluciones de Radix® 10000. T0= Testigo; T1= 10%; T2= 20%; T3=40% y T4=80%.

El tratamiento testigo sin aplicación de auxina no logró generar raíces. Estos datos coinciden con aquellas especies que enraízan con dificultad, las cuales requieren

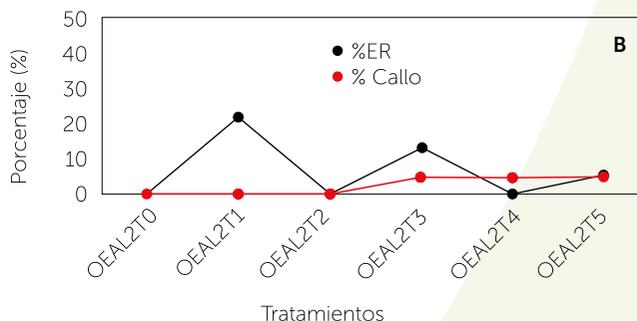
de un tratamiento con algún producto que contribuya a mejorar el porcentaje de estacas enraizadas y la calidad del sistema radical formado. Hatmann y Kester (1988) mencionan que al tratar las estacas con sustancias reguladoras de crecimiento (fitohormonas) del tipo auxínico aumenta el número de las que forman raíces y se acelera su iniciación, así como el número, la calidad y la uniformidad del enraizamiento.

La aplicación líquida de ANA a una concentración de 10,000 ppm (T3) se usó en los clones OEJ1, OEAL1 y OEAL2, practicando un anillado en la base de las estacas antes de la aplicación de la auxina. Los resultados indicaron que la forma de aplicación de la auxina puede ser un factor importante en la respuesta al enraizamiento ya que las estacas que fueron anilladas y tratadas posteriormente con el regulador líquido presentaron un incremento significativo en la respuesta, logrando 46% de enraizamiento con cinco y seis raíces por estaca de buena calidad (Tratamiento OEAL 1 y 2) (Figura 11).

Enraizamiento de estacas del clon olinala adulto límite 1 (OEAL1) tratadas con diferentes auxinas y formulaciones a 10000 mg/L en la época de verano. Localidad Guerrero 2009



Enraizamiento de estacas del clon olinala adulto límite 2 (OEAL2) tratadas con diferentes auxinas y formulaciones a 10000 mg/L en la época de verano. Localidad Guerrero 2009



Enraizamiento de estacas del clon olinala juvenil 1 (OEJ1) tratadas con diferentes auxinas y formulaciones a 10000 mg/L en la época de verano. Localidad Guerrero 2009.

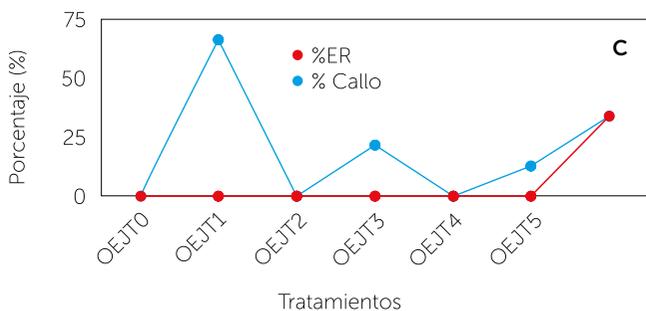


Figura 10. Respuesta de las estacas enraizadas de tres clones de *Bursera lináloe* colectados durante la época de verano en Olinalá, Guerrero. (T1)=Radix® polvo 10000 al 100%; (T2)=ácido indol-3- butírico (AIB) 10,000 mg kg⁻¹ forma líquida; (T3)=ácido naftalén acético (ANA) 10,000 mg kg⁻¹ forma líquida; (T4)=Raizone Plus en polvo; (T5)=Combinación líquida de 5,000 ppm ANA+5,000 mg kg⁻¹ AIB y (T0)=Testigo.

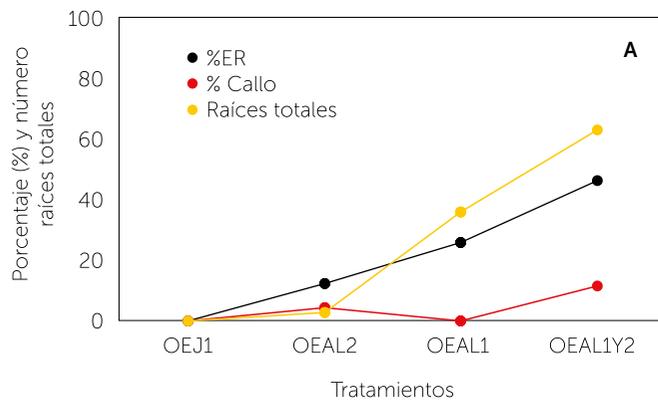


Figura 11. A: Porcentaje de enraizamiento de estacas de los clones de *Bursera linanoe* tratadas con ANA 10,000 ppm en forma líquida colectados en verano en Olinalá, Guerrero. B: El anillado de la estaca incrementó el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces. C: Estacas enraizadas y establecidas en maceta.

Castellanos-Castro y Bonfil-Sanders (2010) mencionan que estacas de un clon juvenil de Cuicatlán, Oaxaca recolectadas a mediados de primavera, cuando el árbol aún permanecía sin hojas, se dejaron orear durante 15 días al ambiente en condiciones de sombra y, posteriormente, se colocaron en una tina con enraizador en solución durante 48 horas. Después de ese tiempo las estacas se mantuvieron en agua más fungicida durante dos meses. El resultado fue el enraizamiento de 60% de las estacas con 3-5 raíces por estaca a partir de la sexta semana, atribuido al estado juvenil del árbol donante. La condición sanitaria es otro factor importante que debe considerarse, sobre todo cuando el material proviene de sitios naturales no perturbados, ya que la presencia de patógenos no sólo reduce el porcentaje de enraizamiento, sino también el número de raíces que podrían formar las estacas. El mantenimiento de las condiciones ambientales durante el proceso de enraizamiento es muy importante, sobre todo en las épocas donde las estacas tienen hojas. Es esencial que éstas mantengan su turgencia y que tengan un potencial de agua elevado, ya que representan un fuerte estímulo para la formación de raíces por la producción de carbohidratos y auxinas. Por el contrario, la pérdida de agua puede reducir la turgencia de las estacas a un nivel tan bajo que provoque la muerte antes de formar raíces. Es recomendable mantener saturada la atmósfera (100% H.R.) durante las primeras cuatro semanas del proceso, disminuyendo gradualmente la humedad en las siguientes dos hasta 75%. Las temperaturas registradas en la cámara durante el proceso de enraizamiento oscilaron entre 21 °C y 25 °C en el día y de 15 °C a 18 °C por la noche. El calor de fondo tuvo

El largo tiempo requerido para el enraizamiento es otra característica de esta especie, ya que en todos los ensayos se observó que se requiere de un periodo de ocho a diez semanas para la formación de raíces adventicias. Un dato relevante fue el efecto marcado de la temporada del año en la que se colectaron las muestras. A pesar de tratarse de una especie caducifolia, en el caso del lináloe la época de reposo no fue adecuada para inducir el enraizamiento en ninguno de los árboles evaluados. El comportamiento de esta especie es más parecido al que guardan las perennifolias de hoja ancha, las cuales tienen uno o más periodos de crecimiento durante el año; se pueden obtener estacas en las épocas relacionadas con dichos periodos (finales de primavera y verano). Se podría incrementar el éxito de enraizamiento si las estacas se toman después de que se ha completado un ciclo de crecimiento y la madera está parcialmente madura, lo que puede ocurrir de primavera a fines de verano. Se registró que la brotación de las estacas no es una variable confiable para evaluar el enraizamiento de la especie, ya que hubo algunas brotadas después de dos meses de aplicados los tratamientos con auxinas; sin embargo, 80% de las estacas no presentaron raíces adventicias, pero sí callo abundante. Esto podría atribuirse a la acumulación de reservas que tiene la estaca al momento de la recolecta y al alto contenido de aceite en tallos y hojas. Probablemente esta sustancia se use para obtener la energía necesaria que permita la supervivencia de las estacas por largo tiempo en el sustrato, sin la emisión de raíces (Figura 12).

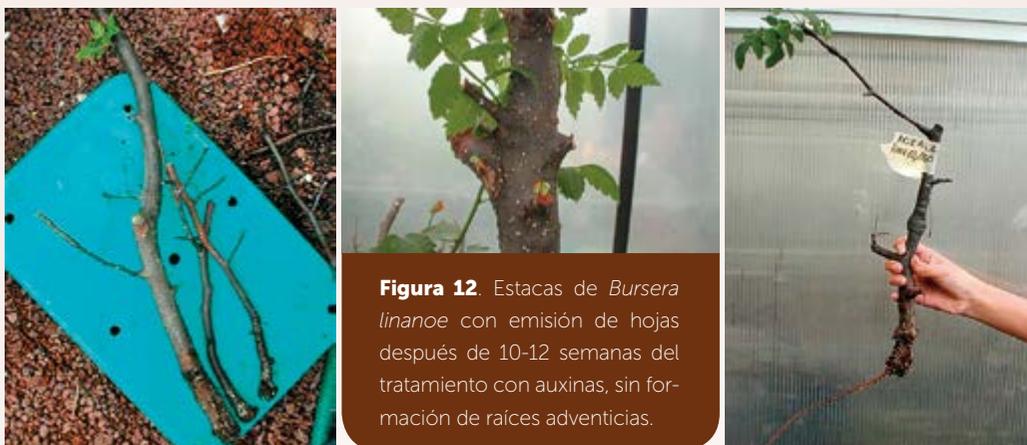


Figura 12. Estacas de *Bursera lináloe* con emisión de hojas después de 10-12 semanas del tratamiento con auxinas, sin formación de raíces adventicias.

como objetivo que las temperaturas elevadas en el ambiente tendieran a estimular el desarrollo de las yemas vegetativas con anticipación al inicio y desarrollo de las raíces adventicias, por lo que se mantuvo en 27 °C durante las primeras cuatro semanas del proceso.

Efecto del diámetro de las estacas

En relación con la mezcla de sustrato, la realizada a partir de tierra del lugar más tierra de vega de río y arena, en proporción de 1:1:1 v/v, provocó un ambiente negativo para la estaca ya que, dependiendo de la humedad, ésta puede tener cierta dureza y dificultar la aireación y el drenaje, mientras que la comercial de peat moss, tezontle y agrolita en proporción 1:1:1 v/v fue la que mejores resultados ofreció para el enraizamiento y el mantenimiento de humedad y aireación durante el proceso. Independientemente del tipo y de la concentración del enraizador y sustrato, las estacas con diámetros menores a 2 cm presentaron menor porcentaje de raíces, mientras que aquéllas con diámetros entre 3-4 cm fueron las que mejor respondieron al enraizamiento.

CONCLUSIONES

El árbol de lináloe presenta variabilidad en la capacidad de enraizamiento y requiere un tratamiento con auxinas para lograrlo. Las épocas de primavera y verano son las más propicias para inducir el enraizamiento y cuando se trate de árboles adultos se debe utilizar material con características juveniles. La concentración óptima de auxina para enraizamiento oscila entre 8,000 y 10,000 mg kg⁻¹. Se pueden establecer viveros en las comunidades rurales de la selva baja caducifolia para establecer plantaciones comerciales en los estados de Puebla, Guerrero, Oaxaca y Morelos, México.

LITERATURA CITADA

- Andrés-Hernández A.R., Espinosa-Organista D. 2002. Morfología de plántulas de *Bursera* Jacq. Ex L. (Burseraceae) y sus implicaciones filogenéticas. Bol. Soc. Bot. México 70:5-12.
- Ballester A., San-José M.C., Vidal N., Fernández-Lorenzo J.L. y Vieitez A.M. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Ann. Bot. 83: 619-629.
- Bonfil-Sanders C., Mendoza-Herández P., Ulloa-Nieto J. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. Agrociencia 41:103-109.
- Bonga J.M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: Tissue culture in forestry. Bonga J.M., Durzan, D.J. (eds). Martinus Nijhoff/W. Junk Publishers. The Hague. 387-412.
- Bradshaw A.D. 1987. The reclamation of derelict land and the ecology of ecosystems. In: Jordan III, W. R., Gilpin M. E., and J. D. Aber (eds). Restoration Ecology. Cambridge University Press. Cambridge. pp: 53-74.
- Castellanos-Castro C., Bonfil-Sanders C. 2010. Establecimiento y crecimiento inicial de estacas de tres especies de *Bursera* Jacq. ex L. Rev. Mex. Cien. For Vol. 1 (2): 93-108.
- Davies F.T., Hartmann H.T. 1988. The physiological basis of adventitious root formation. Acta Hort. 227: 113-120.
- De Klerk G.J., Van Der Krieken W., De Jong J.C. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 35: 189-199.
- Hackett W.P. 1985. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. Hort. Rev. 7: 109-155.
- Haissig B.E. 1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. En: New root formation in plants and cuttings. Jackson, M.B. (Ed). Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp: 141-189.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. 1990. Plant propagation: Principles and practices. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Hersch P.M. 2005. Lináloe En: La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. Experiencias de comunidades rurales. López C., S. Chanfón, G. Segura (eds). SEMARNAT-CONAFOR pp. 40-47.

- Howard B.H. 1996. Relationships between shoot growth and rooting of cuttings in three contrasting species of ornamental shrub. *J. Hortic. Sci.* 71: 591-605.
- Hussain A. 1993. Linaloe (*Bursera depelchiana* Poisson ex Engl.; Family Burceraceae. En: Essential oil plants and their cultivation. CIMAP Lucknow, India pp.11-13.
- Marks T.R., Cameron, R.W.F., Harrison-Murray, R.S., Ford, Y-Y. y Fordham, M.C. 1998. Rooting cuttings; practical benefits from physiological research. *Rhizopon* 30.
- Rzedowski J., Kruse H. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon* 28:103-116.
- Rzedowski J., Medina L., Calderón de Rzedowski G. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera*. *Acta Bot. Mex.* 70:85-111.
- Vidal N., Arellano G., San-José M.C., Vieitez A.M., Ballester A. 2003. Developmental stages during the rooting of *in-vitro*-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiology* 23:1247-1254.



PROTOZOARIOS CILIADOS DEL RUMEN, SU CULTIVO *in vitro* Y PLANTAS CON CAPACIDAD DESFAUNANTE

CILIATED RUMEN PROTOZOA, THEIR *in vitro* CULTURE,
AND PLANTS WITH DEFAUNING CAPACITY

Ley de Coss, A.^{1*}, Aguirre-Medina, J.F.¹, Marroquín-Agreda, F.J.¹,
Toledo-Toledo, E.¹, Aguilar-Fuentes, J.², Guerra-Medina, E.³

¹Cuerpo Académico en Productividad de Agroecosistemas Tropicales, Facultad de Ciencias Agrícolas, *Campus IV* y ²Centro Mesoamericano de Estudios en Salud Pública y Desastres, Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas, México. ³Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor responsable: aleycoss@gmail.com

RESUMEN

Con el fin de tener un método para evaluar la capacidad desfaunante (CD) de los compuestos químicos presentes en las plantas multipropósito, se ha evaluado la factibilidad y la efectividad de usar medios de cultivo *in vitro* enriquecidos con minerales, vitamínicos y fuentes de proteína, dosis mínimas de antibióticos y como única fuente de energía el extracto de diferentes plantas (*Avena sativa*, *Manihot esculenta*, *Musa spp.*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* y *Dactylis glomerata*). En la mayoría de los trabajos, el extracto de las plantas evaluadas sólo redujeron la cantidad de protozoarios (a menos de 10^2 mL⁻¹ de medio), mientras que otras plantas tuvieron un efecto desfaunante total, pero un tercer grupo de plantas, incluso con mayor contenido y variedad de compuestos químicos presentes, no presentaron efecto alguno sobre los protozoarios del rumen; por tanto las plantas evaluadas tienen diferencias en la CD durante los periodos de evaluación. Esta CD en muchos casos fue o ha sido atribuida a la presencia de compuestos secundarios con posible efecto tóxico sobre los protozoarios ciliados del rumen; sin hasta el momento esto haya sido ratificado.

Palabras clave: silvopastoril, plantas tóxicas, taninos, saponinas, microorganismos.

ABSTRACT

With the goal of having a method to evaluate the defauning capacity (DC) of the chemical compounds present in multipurpose plants, the feasibility and effectiveness of using *in vitro* mediums enriched with minerals, vitamins and protein sources has been evaluated, as well as minimum doses of antibiotics and extracts from different plants (*Avena sativa*, *Manihot esculenta*, *Musa spp.*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* y *Dactylis glomerata*) as the single source of energy. In most studies, the plant extracts assessed only reduced the amount of protozoa (to less than 10^2 mL⁻¹ medium), while other plants had a total defauning effect, yet a third group of plants did not present any effect on the rumen protozoa, even with higher content and variety of chemical compounds present; therefore, the plants evaluated have differences in the DC during the periods of evaluation. This DC in many cases was or has been attributed to the presence of secondary compounds with possible toxic effect on the ciliated rumen protozoa, although this has not been ratified until now.

Keywords: forest grazing, toxic plants, tannins, saponins, microorganisms.

INTRODUCCIÓN

La alimentación de los rumiantes en las regiones tropicales se basa principalmente en el consumo de especies forrajeras como su principal fuente de energía y proteína; sin embargo, dado el bajo contenido energético y proteico, además de la baja tasa y extensión de la degradación de estas especies vegetales (Leng, 1990), generalmente ocasiona bajo consumo voluntario, desequilibrio en los nutrientes aportados y, por consiguiente, reducción en los indicadores productivos del hato. Bajo estos esquemas de producción se ha reportado que existe un mayor aporte y mejora en el cociente de proteína-energía cuando se reduce la población o se elimina a los protozoarios ciliados (Díaz *et al.*, 1994). A pesar de que los protozoarios contribuyen en la degradación de la fibra y el aporte de mayor contenido energético para el animal, existe un proceso conocido como “**secuestro de protozoarios**” que impide su salida de rumen y, con ello, se reduce su aporte nutrimental hacia el animal (Hsu *et al.*, 1991).

Características generales del rumiante

Los rumiantes pertenecen a un grupo de animales que tienen un tubo digestivo con cuatro compartimentos (rumen, retículo, omaso y abomaso) que permite aprovechar alimentos con alto contenido de fibra (FDN, celulosa, hemi-celulosa y lignina). Esta adaptación ha permitido al rumiante utilizar distintas fuentes de alimentos (forrajes) no aprovechable para otros animales no rumiantes como los cerdos y las aves y, además, generar bienes para el hombre, como carne y leche. El rumen es un compartimento donde el alimento es degradado y fermentado hasta 80% por la acción de enzimas microbianas. El contenido ruminal contiene, además de partículas de alimento, un gran número de bacterias (10^{10} a 10^{12} mL⁻¹), protozoarios ciliados (10^6 mL⁻¹), protozoarios flagelados (10^2 mL⁻¹) y hongos anaerobios (10^3 mL⁻¹); algunas de sus propiedades son: alto potencial de oxido-reducción (-250 a -450 vM), un pH de 5.3 a 7.2, además de una concentración, según el tipo y la cantidad de alimento consumido de gases disueltos, tales como bióxido de carbono, metano, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, de amoníaco, de bicarbonato, y de ácidos grasos volátiles (AGV; acético, propiónico y butírico), además de ácidos orgánicos (láctico, succínico) (Cobos, 2007).

Protozoarios ciliados del rumen

A estos microorganismos se les atribuyen diversas funciones, como regular la población bacteriana, la con-

centración de amonio, el pH, volumen y tasa de dilución ruminal (Jouany *et al.*, 1988); sin embargo, pueden causar efectos negativos por alta ingestión de bacterias ruminales y por ser retenidos dentro del rumen (secuestro); lo que disminuye la disponibilidad de nutrimentos para el animal. Según Bird *et al.* (1979), sólo 30% de los ciliados que habitan el rumen llegan a nivel del duodeno y con su eliminación (desfaunación) se podría incrementar el aporte de nutrientes, principalmente proteína de mayor valor biológico por parte de estos microorganismos (Eugene *et al.*, 2004). Lo anterior ha permitido la búsqueda de estrategias para desfaunar a los rumiantes y con ello contribuir a esclarecer la importancia o no, de la fauna, en el ecosistema ruminal (Ley de Coss *et al.*, 2011a, 2011b). Se han evaluado muchas técnicas (*in vitro* e *in vivo*); sin embargo, no existe una que sea eficaz y clara para desfaunar rumiantes y que permita además, evaluar el desempeño de éstos en la productividad animal (Chaudhary y Srivastava, 1995). Más bien, los resultados obtenidos han contribuido a aumentar la controversia que existe respecto a las mejoras en la degradación de la materia seca (MS) y la orgánica (MO; Van Nevel *et al.*, 1993), en la digestibilidad aparente de la fibra (Bird *et al.*, 1994) y en la degradación del almidón (Mendoza *et al.*, 1993). Para esclarecer la función de los protozoarios en el rumen, se presenta una revisión de trabajos de investigación relacionados con el cultivo y la sobrevivencia fuera del ambiente ruminal para conocer algunos requerimientos nutricionales y factores de crecimiento esenciales para su cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo *in vitro* de protozoarios y efecto desfaunante

Se han usado como fuente de nutrimentos las harinas de yuca (*Manihot esculenta*), plátano (*Musa spp.*), arroz (*Oryza sativa*) (Coleman, 1981; Dehority, 2003) paja de avena (*Avena sativa*) (Chandramoni *et al.*, 2002) y paja y gluten de trigo (*Triticum aestivum*) (específico para *Epidinium ecaudatum*; Michałowski *et al.*, 2001), heno de Orchard (*Dactylis glomerata*) (Lee *et al.*, 2000) y almidón de *A. sativa* (Ley de Coss *et al.*, 2011a, 2011b), más la adición de 20000 UI de penicilina y 25 mg de estreptomycin para mantener contralada una población de 10^8 bacterias mL⁻¹ de medio (Fondevila y Dehority, 2001); esto ha permitido mantener un pH estable de 6.8 ± 0.2 y la sobrevivencia de protozoarios ciliados. Se realizaron pruebas en medios de cultivo, usando la técnica anaeróbica descrita por Hungate (1950), y el medio evaluado (Cuadro 1) permitió mantener entre 7.5×10^3 y

1.22×10^4 protozoarios por mililitro con una viabilidad de 88 a 90% durante más de 72 h; además, el medio de cultivo no fue específico, ya que se identificaron protozoarios de las órdenes Entodiniomorfa (*Entodinium* spp.) (Figura 1 A) y Tricostomatida (*Holotricos* spp.) (Figura 1B), lo que contrasta con los reportes de Fondevila y Dehority (2001), quienes indicaron mayor presencia en los medios de cultivo de ciliados del género *Entodinium* spp. Autores como De León (2012) registraron una población de 2.24×10^4 protozoarios por mililitro de medio de cultivo, similar a los valores registrados en el Cuadro 1, usando como fuente de energía a la planta tropical *Parmentiera edulis*.

El cultivo *in vitro* han permitido evaluar la capacidad desfaunante (CD) del extracto soluble de plantas forrajeras y no forrajeras que existen en las regiones del trópico seco y húmedo de México y otros países. De diferentes resultados publicados se infiere que existen diferencias estadísticas en las concentraciones de protozoarios entre las plantas y por tiempos de incubación (Figura 2). Por ejemplo, el extracto de *Datura innoxia* tuvo una nula CD, manteniendo una cantidad por 72 h de 1.61×10^4 protozoarios por mL^{-1} de medio, valor similar al testigo, seguida del extracto de *Buddleia cordata*, la cual sólo redujo la población de protozoarios al finalizar el tratamiento (72 h), mientras que *Verbesina perymenioides* tuvo el mismo efecto a las 48 h de incubación; sin embargo, los extractos de *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare* y *Mentha piperita* redujeron la cantidad de protozoarios desde las 24 h, pero 24 h más tarde eliminaron totalmente a estos microorganismos en comparación con el resto de los tratamientos. Al respecto, se reportó que el extracto soluble de *V. perymenioides*, *Montanoa leucanta*

Cuadro 1. Composición del medio cultivo anaerobio con extracto de *A. sativa*.

Compuesto	Cantidad para 100 mL^{-1} de medio
Agua destilada, mL	47.42
Líquido ruminal clarificado ⁽¹⁾ , mL	30.0
Solución mineral I ⁽²⁾ , mL	5.0
Solución mineral II ⁽³⁾ , mL	5.0
Carbonato de sodio, solución 8% ⁽⁴⁾ , mL	5.0
Acetato de sodio, 1.5 % ⁽⁵⁾ , mL	5.0
Solución sulfido-cisteína ⁽⁶⁾ , mL	2.0
Solución rezarsurina al 0.1% ⁽⁷⁾ , mL	0.1
Tripticasa-peptona, g	0.20
Extracto de levadura, g	0.10
Fuente de energía (planta tropical), mL	0.20

(1) Líquido ruminal clarificado, previamente filtrado en una gasa triple y centrifugado a 17664 g durante 15 min a 4 °C, esterilizado 20 minutos a 15 psi, 121 °C; (2) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de K_2HPO_4 ; (3) Conteniendo (por 1000 mL) 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO_4 y 1,6 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; (4) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada; (5) 1,5 g de acetato de sodio en 100 mL de agua destilada; (6) 2,5 g de L-cisteína (disuelta en 15 mL de 2N NaOH)+2,5 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (en 100 mL de H_2O); (7) 0,1 mL de resazurina en un volumen final de 100 mL.

y *B. cordata* tuvieron un efecto sobre la concentración de protozoarios por la presencia de taninos, saponinas, entre otros compuestos en las plantas evaluadas.

Plantas forrajeras desfaunantes

Se han reportado compuestos químicos secundarios en plantas arbustivas multipropósito (leña, forraje y

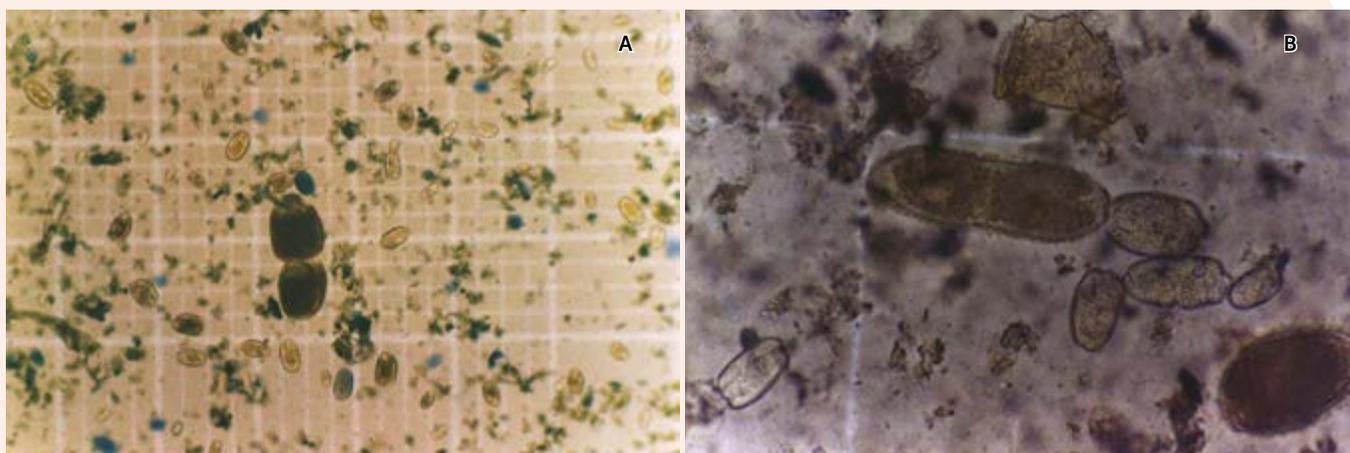


Figura 1. Protozoarios ciliados del rumen de la orden Entodiniomorfa. A: Protozoarios de las órdenes Entodiniomorfa (*Entodinium* spp.). B: Tricostomatida (*Holotricos* spp.).

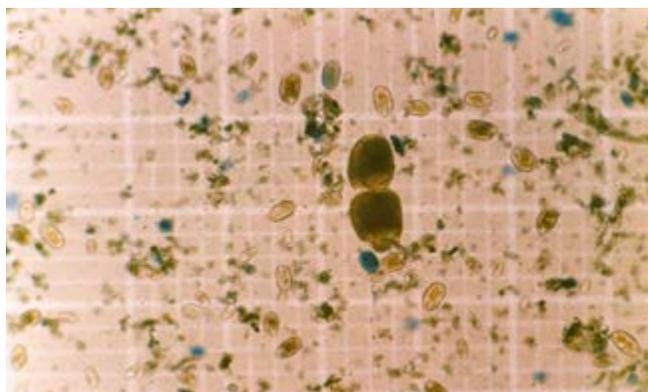


Figura 2. Protozoarios en fase reproductiva (fisión binaria) en un medio de cultivo *in vitro*.

medicinal), con propiedades tóxicas contra los protozoarios, aunque en la mayoría de los casos con poca eficacia y sin datos que afirmen dicho efecto (Navas-Camacho *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997). Por tanto, la CD de los agentes químicos reportados en la literatura ha sido puesta en duda (Ley de Coss *et al.*, 2011a; 2011b). Metabolitos secundarios tales como, alcaloides, saponinas, taninos, aminoácidos no proteínicos, micotoxinas, terpenoides, esteroides, lecitinas, inhibidores de proteasas y fenoles son producidos por las plantas como un mecanismo de defensa contra otras plantas, animales, insectos depredadores e infecciones microbianas (D'Mello, 1992; Newbold *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1994) y compuestos análogos de la tirosina (mimosina) y los productos de su degradación (3,4 dihidroxipiridina) que están en *Leucaena leucocephala*, *Mimosa púdica* y *Pittosporum undulatum*, y la 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA), presente en *Vicia faba*, *Mucuna spp* y *Stizolobium deeringianum* (ahora *Mucuna aterrima*), se ha identificado que tienen un efecto tóxico para el animal, pero no para los protozoarios ciliados. Mientras tanto, los efectos de estos compuestos producen cambios en el metabolismo ruminal con aumentos en la concentración de ácidos grasos voláti-

les (AGV) y reducción en amoníaco (Domínguez, 1993; Navas-Camacho *et al.*, 2001). El efecto defaunante ha sido atribuido a la presencia de: saponinas para *Sapindus saponaria* y *Medicago sativa*, taninos condensados para *B. cordata* y *V. perymenioide*, y glucósidos cianogénicos en *B. cordata*, aunque la CD del extracto de ciertas plantas han mostrado efecto variable; en otras se ha reportado eliminación o disminución en la población de protozoarios del rumen (Thi, 1998; McSweeney *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 1994). Los compuestos antihelminéticos, como la antitripanosoma y la amebicida, identificados como monoterpentenos (ascaridole) y aceites esenciales con efecto defaunante, han identificado en algunas plantas como *C. ambrosioides*. En la menta (*M. piperita*), planta sin efecto defaunante (Ley de Coss *et al.*, 2011a), identificaron más de 100 compuestos químicos con efecto bactericida, fungicida, antiviral y vermífugo, además de mentol, mentona, metil-ésteres y monoterpentenos (puleguna, piperitona, mentofurano y jasmona) (Schmelzer y Gurib-Fakin, 2008). Por lo anterior, es poco confiable asegurar que la CD esté relacionada con los compuestos químicos presentes, ya que se ha reportado la presencia de éstos en las plantas que han eliminado protozoarios, como *B.*

cordata y *V. perymenioides*, y en aquellas donde no hay tal efecto, como *D. inoxia*. En estas tres últimas plantas se han reportado diversos compuestos químicos; por ejemplo, en *B. cordata* los que tienen capacidad analgésica, diurética y antiséptica (Ortiz, 1996; Schmelzer y Gurib-Fakin, 2008), bactericida y amebicida (Ordaz, 1996), mientras que en *D. anoxia* se han identificado compuestos con efectos alucinógenos, además de sustancias con efecto desparasitante, principalmente contra amibas (Bonde, 2001), compuestos como atropina, daturina, hiosciamina, hioscina, escopolamina (Janthangvith *et al.*, 2000), alta concentración de alcaloides (ácido cafeínico, clorogénico, para-cumárico y ferúlico), además de esteroides (campesterol, datura lactona y estigmasterolilla) y triterpenos en cantidades de 0.5% a 1.1% (Chaudhary y Srivastava, 1995). En *Argemone mexicana*, que es una planta tóxica para el ganado, se encuentran alcaloides que atacan el sistema nervioso central, tales como berbecina, protopina, protopinahidroclorina, sanguinarina y dihydro-sanguinarina (Schmelzer y Gurib-Fakin, 2010). También se ha observado que la fracción soluble en agua de *Yucca schidigera* contiene un alto contenido de saponinas, resveratrol (3,4,5 trihidroxistilbeno), fenoles, 3,3,5,5, tetrahidroxil-4-metoxitilbeno y yucaols A y C (Sen *et al.*, 1998). En un estudio *in vitro*, con el extracto de saponina proveniente de esta planta, usando dosis de 0.5 mg mL⁻¹, la cantidad de protozoarios fue reducida drásticamente, aunque no se logró una eliminación total de la fauna del rumen (Wang *et al.*, 1988).

Otro grupo de plantas evaluadas como *A. mexicana*, *B. vaccinioides*

e *Y. schidigera* presentaron CD, mientras que *Hibiscus rosa-sinensis* y *M. alba* mantuvieron una cantidad similar a la observada en el tratamiento testigo (1.22×10^4 protozoarios mL^{-1}). Se ha reportado que los extractos de *B. vaccinioides* y *M. leucanta* tienen CD desde las 24 h de incubación en medios de cultivo *in vitro* (Dehority, 2003). Por lo anterior, más que la presencia de múltiples compuestos secundarios "tóxicos", se podría sugerir que es la concentración lo que estaría afectando la población de protozoarios, aunque también se ha reportado que en las poblaciones en rumen se adaptan y metabolizan compuestos secundarios presentes en las plantas forrajeras (Thi, 1998; McSweeney *et al.*, 1999).

Otras técnicas de desfaunación

En la búsqueda de técnicas para desfaunar rumiantes se han evaluado distintos métodos, como el retiro del contenido ruminal y posterior lavado con ácido acético o láctico (Klita *et al.*, 1996), o la adición de diocil sulfato de sodio (jabones) (Chandramoni *et al.*, 2002); en la mayoría de los casos han ocasionado problemas en la salud o muerte de los animales (Lovelock *et al.*, 1982), sin llegar a eliminar o reducir significativamente la cantidad de protozoarios (Osdemir *et al.*, 2006), otro agente químico antiprotozoario con una alta CD fue el Secnidazol[®], con una efectividad de 100% en menos de 24 h (Ley de Coss, 2003). La efectividad para desfaunar ha sido variable; otras técnicas han sido el aislamiento desde el nacimiento del becerro (Abou-Akkada *et al.*, 1968), adición de peróxido de calcio al rumen (Demeyer, 1982), o bien, aceites minerales (Newbold y Chamberlain, 1988), pero sin efecto alguno sobre la población de protozoarios.

CONCLUSIONES

Es posible mantener una población de protozoarios viables superior a 10^3 durante 72 h en un medio de cultivo anaerobio. Los resultados obtenidos bajo condiciones experimentales permiten sugerir que las plantas evaluadas tienen diferente capacidad desfaunante y que ésta podría no estar directamente relacionada con el tipo de metabolito, sino con la concentración de estos compuestos. La CD de las plantas podría estar también relacionada con factores nutritivos ya que, por ejemplo, la degradación de la materia seca (DMS) resultó afectada principalmente por la cantidad de fibra en la dieta y el porcentaje de proteína cruda (PC). En este caso se encontró que a mayor cantidad de PC se aumentó la DMS ($r^2=0.53$; $p<0.01$); por el contrario, a mayor cantidad de fibra se tuvo una disminución en la DMS ($r^2=-0.54$; $p<0.01$); en este sentido, un bajo contenido de

nutrientes y/o baja degradación puede afectar la supervivencia de los protozoarios, sin que esto indique la presencia de un compuesto tóxico. De acuerdo con los resultados revisados, se puede considerar que las plantas multipropósito con actividad desfaunante pueden tener uno o varios metabolitos tóxicos que afecten a los protozoarios; por ello, se sugiere que la técnica de cultivo *in vitro* de protozoarios debería mantener poblaciones por arriba de 10^4 microorganismos por mL^{-1} de medio y hacer pruebas cualitativas o de identificación del o de los compuestos tóxicos involucrados. Es recomendable continuar estudiando el efecto sobre las poblaciones microbianas (protozoarios, hongos y bacterias) del rumen y los compuestos secundarios presentes en las fracciones soluble e insoluble de plantas forrajeras.

LITERATURA CITADA

- Abou A.A.R., Barthey E.E., Berube R., Fina L.R., Meyer R.M., Henricks D. Julius F. 1968. Simple method to remove completely ciliate protozoa of adult ruminants. *Appl. Microbiol.* 16: 1475-1477.
- Leng R.A. 1990. 1990. Factors affecting the utilization of poor quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Reviews.* 3:277-303.
- Bird S.H., Romulo B., Leng R. A. 1994. Effects of lucerne supplementation and defaunation on feed intake, digestibility, N retention and productivity of sheep fed straw-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45: 119-129.
- Bird S.H., Hill M.K., Leng R.A. 1979. The effect of defaunation on the growth of lambs on low-protein, high energy diets. *British Journal of Nutrition* 42:81-87.
- Bonde K. 2001. The genus *Datura*: From research subject to powerful hallucinogen. Online:http://www.leda.lycaeum.org/Documents/The_Genus_Datura:_From_Research_Subject_to_Power. April 10, 2010.
- Chandramoni S.B., Tiwari M.C. Haque N., Lal N., Jadhao B., Khan M.Y. 2002. Energy balance in faunated and defaunated sheep on a ration high in concentrate to roughage (good quality) ratio. *Pakistan J. of Nutr.* 1: 31-33.
- Chaudhary L., Srivastava A. 1995. Performance of growing Murrah buffalo calves as affected by treatment with manoxol and the presence of ciliate protozoa in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51: 281-286.
- Cobos M.A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. *In*: Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. (Eds). *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Ed. Trillas. 498-516 pp.
- Coleman G.S. 1981. Cultivation of rumen Entodiniomorphid protozoa on tropical animal feeds. *Trop. Anim. Prod.* 6:11-14.
- D' Mello J.P.F. 1992. Chemical constraints to use of tropical legumes in animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38:237-261.
- Dehority B.A. 2003. Distribution, specificity and role of the rumen protozoa. *Rumen Microbiology*. Ed. Nottingham Univ Press. London. 129-155 pp.
- Dehority B.A. 2003. Metabolism, nutrition and growth of rumen protozoa. *Rumen Microbiology*. Ed. Nottingham University Press. London. 101-127 pp.

- Díaz A., Avendaño M., Escobar A. 1994. Evaluating of *Sapindus saponaria* as a defaunation agent and its effects on different ruminal digestion parameters. *Livest Res. Rural.* 5:1-10.
- Dominguez B., Jean G., Jovang P., Michelangch F., Chemello M.E. 1993. *In*. Toxicity in MA- 104 cells and rumen protozoa of some phytotoxins. Their Effects on fermentation by faunated and defaunation rumen Inocula. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2045-2050.
- De León L.W. 2012. Nivel de Cuajilote (*Parmentiera edulis*) en un medio de cultivo *in vitro* para mantener vivos a los protozoarios ciliados del rumen. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV. Universidad Autónoma de Chiapas. Huehuetán, Chiapas, México.
- Demeyer D.I. 1982. Influence of calcium peroxide on fermentation pattern and protozoa in the rumen. *Arch. Fur Tierer.* 32: 579-593.
- Eugene M., Archimede H., Michalet-Doreau B., Fonty G. 2004. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Anim. Res.* 53:187-200.
- Fondevila M., Dehority B.A. 2001. Preliminary study on the requirement of *Entodinium exiguum* and *Entodinium caudatum* for live or dead bacteria when cultured *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:41-45.
- Hungate R.E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev.* 14:1-49. 1950.
- Hsu J.T., Fahey G.C. Jr, Berger L.L., Mackie R.I., Merchen N.R. 1991. Manipulation of nitrogen digestion by sheep using defaunation and various nitrogen supplementation regimens. *J. Anim. Sci.* 69:1290-1299.
- Janthangvith J., Chumsri P., Kraisintu K., Pongpan A. 2000. Comparison of tropane alkaloid production by *Datura innoxia* and *Datura metel* varieties of White, soil, hydroponic, *in vitro* plant cultura and tranformed root cultura. Mahidol University anual Research Abstracts. Online: <http://www.hahidol.ac.th/abstracts/annual1999/0355.thm>. January 20, 2010.
- Jouany J.P., Demeyer D., Grain J. 1988. Effect of defaunation the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:165-172.
- Klita P.T., Mathison G.W., Fenton T.W., Hardin R.T. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74:1144-1156.
- Lee S.S., Ha J.K., Cheng K.J. 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3807-3813.
- Ley de Coss A. 2003. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. Tesis de Grado. 98 pp.
- Ley de Coss A., Cobos-Peralta M., Hernández-Sánchez D., Guerra-Medina E. 2011a. Formulación de un medio de cultivo anaerobio para protozoarios ruminales y valuación *in vitro* en la capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Rev Científ. FCV-LUZ.* XXI (1): 43-49.
- Ley de Coss A., Martínez-Tinajero J.J., Marroquín-Agreda F.J., García-Castillo C.G., Montañez-Valdez O.D., Guerra-Medina E. 2011b. La capacidad desfaunante del extracto de plantas. *Rev Científica FCV-LUZ.* Vol. XXI (5): 414-420.
- Lovelock L.K.A., Buchanan-Smith J.G., Forsberg C.W. 1982. Difficulties in defaunation of the ovine rumen. *Can. J. Anim. Sci.* 62:299-303.
- Mcsweeney C.S., Palmer B., Bunch R., Krause D.O. 1999. Isolation and Characterization of Proteolytic Ruminal Bacteria from Sheep and Goats Fed the Tannin-Containing Shrub Legume *Calliandra calothyrsus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:307-3083.
- Mendoza G.D., Britton R.A., Stock R.A. 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 71:1572-1578.
- MichaEowski T., Rybicka K., Wereszka K., Kasperowicz A. 2001. Ability of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for *in vitro* growth. *Acta Protozool.* 40:203-210.
- Navas-Camacho A., Cortes J.E., Gutiérrez A. 2001. Efecto de la reducción de la población de protozoarios ciliados sobre el funcionamiento ruminal en ovinos alimentados con tamo de trigo. Programa Nacional de Nutrición Animal. C.I. CORPOICA. Bogotá. Colombia. 7. 12-17 pp.
- Navas-Camacho A., Laredo M.A., Cuestas A., Ortega O., Romero M. 1994. Evaluation of tropical trees with high or medium saponin content as dietary alternative to eliminate ciliate protozoa from the rumen. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3:204-212.
- Newbold C.J., El Hassan M.S., Wang J., Ortega M.E., Wallace R.J. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Brit. J. Nutr.* 78:237-249.
- Newbold C.J., Chamberlain D.G. 1988. Lipids as rumen-defaunation agents. *Proceeding of Nutrition Society*, 47:154A.
- Ordaz P. 1996. Evaluación *in vitro* de la actividad amebicida de compuestos obtenidos de *Buddleia cordata* sobre varias especies de *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. Tesis de Grado. 59 pp.
- Ortiz Z. 1996. Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México. Tesis de Grado. 75 pp.
- Osdemir M.M., Cinar M., Haliloglu S., Eryavuz A. 2006. Effects of defaunation and dietary nitrogen source on sodium, potassium, iron and zinc in the rumen fluid, plasma and wool of lambs. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30: 1-7.
- Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A. 2008. Medicinal Plants. PROTA Foundation. Plants Resources of Tropical Africa. Backhuys publishers. Wageningen, Netherlands. Pp 105-108. Online: <http://www.book.google.com.mx>. November 8, 2010.
- Sen S., Makkar H.P., Muetzel S., Becker K. 1998. Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 27:35-38.
- Thi H.N.N. 1998. Effect of *Sesbania grandiflora*, *Leucaena leucocephala*, *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ceiba pentadra* on intake, digestion and rumen environment of growing goats. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria (CIPAV). Cali, Colombia. *Livestock Research for Rural Development*.10 (3):12-24. Online: <http://www.cipav.org.co/lrrd>. April 10, 2010.
- Van Nevel C.J., De Smet S., Demeyer D.I. 1993. Digestion in defaunated and refaunated sheep fed soybean oil hydrolysate or crushed toasted soybeans. *Neth. J. Agri. Sci.* 41:205-219.
- Wang Y., Mc Allister T.A., Newbold C.J., Rode L.M., Cheeke R.P., Cheng K.J. 1988. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:143-153.

EL HONGO *Verticillium hemileiae* Bouriquet, ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LA ROYA DEL CAFETO (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.)

THE FUNGUS (*Verticillium hemileiae* Bouriquet), ALTERNATIVE FOR THE CONTROL OF COFFEE RUST (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.)

**Díaz-Vicente V.M.^{1*}; Pinzón-Rincón E.P.¹; Pérez-Quintanilla J.N.¹;
Cabrera-Alvarado M.E.¹; Magallanes-Cedeño R.¹; De Coss-Flores M.E.¹**

¹Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Costera Entronque Estación Huehuetán, Huehuetán, Chiapas.

*Autor responsable: vdiaz_vicente@hotmail.com. Cuerpo Académico de Protección Vegetal.

RESUMEN

Se aisló el hongo *Verticillium hemileiae* Bouriquet asociado a pústulas de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en muestras colectadas en el municipio de Cacaohatan, Chiapas, México. En el aislamiento creció únicamente *V. hemileiae*, ya que en el caso de *H. vastatrix* como parásito obligado no se desarrolla en medio de cultivo. Se realizaron trabajos en laboratorio y vivero, usando un diseño experimental completamente al azar, y en campo con una distribución en bloques al azar. El mejor medio de cultivo para propagar (*V. hemileiae*) fue Sabouraud Dextrosa Agar más extracto de malta; se observó una germinación de 90% con una concentración de 2.57×10^5 conidios mL⁻¹. El pH del medio fue de 5.5, con el cual presentó germinación de 91.8%, patogenicidad de 92.2% y concentración de 2.56×10^5 conidios mL⁻¹. El mejor sustrato para propagar en forma masiva a *V. hemileiae* fue el salvado de trigo, en el cual se registró concentración de 2.31×10^5 conidios mL⁻¹, viabilidad de 90.96%, crecimiento de 66.2% y patogenicidad de 91.1%. Al aplicar en plantas en condiciones de vivero y campo, la mayor infección y número de pústulas se presentó en el testigo sin aplicación.

Palabras clave: Uredosporas, parásito obligado, virulencia, patogenicidad.

ABSTRACT

The fungus (*Verticillium hemileiae* Bouriquet) associated with pustules of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) was isolated of samples collected in the municipality of Cacaohatán, Chiapas, México. In the isolation grew only (*V. hemileiae*), since in the case of (*H. vastatrix*) as obligate parasite does not develop in culture medium. Work was carried out in laboratory and nursery, using a completely randomized experimental design, and in field with a randomized block distribution. The best culture medium to propagate (*V. hemileiae*) was Sabouraud Dextrose Agar plus malt extract, spore germination of 90% was observed at a concentration of 2.57×10^5 conidia per milliliter. The medium pH was 5.5 with which presented 91.8% germination, pathogenicity 92.2% and a concentration of 2.56×10^5 conidia per milliliter. The best substrate to propagate massively (*V. hemileiae*) was wheat bran, which recorded concentration of 2.31×10^5 conidia per milliliter, viability of 90.96%, growth of 66.2%, pathogenicity 91.1%; and applying plants in nursery and field conditions the largest number of pustules and infection occurred in the control without application.

Key words: Uredosporas, obligate parasite, virulence, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

El cafeto (*Coffea arabica*) es un cultivo de importancia económica mundial, debido a que genera gran cantidad de divisas para los países productores. Brasil es el primer productor del mundo. México ocupa el quinto lugar en la producción mundial y, junto con la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), representa el cultivo de mayor relevancia socioeconómica. Su cultivo involucra regiones de 12 estados de México en una superficie aproximada de 665,837 ha⁻¹; el estado de Chiapas es el primer productor con una superficie de 230,134 ha⁻¹, sobresaliendo la región del Soconusco (costa de Chiapas) con 70,000 ha⁻¹. De la superficie cultivada con café, 84% corresponde a pequeños productores que cuentan con un promedio de tres hectáreas que aportan 29% de la producción. El cultivo es una fuente de trabajo para cerca de 282,593 productores que generan más de 300,000 empleos rurales y asalariados en actividades del cultivo, tales como podas, control de maleza, fertilización, control de plagas, cosecha y beneficiado (Nolasco, 1998; Anónimo, 2001; Aranda, 2004; y Anónimo 2008). El cafeto se caracteriza por cultivarse en terrenos de topografía muy heterogénea, desde terrenos planos, con pendientes moderadas y de hasta 50%, con intensas precipitaciones (hasta 5,200 mm anuales) distribuidas de mayo a noviembre y una altitud de 300 a 1500 m. Dentro de las limitantes que afectan al cultivo están las de mercadeo y las fitosanitarias, y entre los segundos se encuentra la roya anaranjada del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. et. Br.), reportada como la enfermedad más importante del cultivo por causar la muerte de la planta por defoliación. Para reducir la fuente de inóculo de la roya es necesario realizar el control de maleza, ampliar la distancia de siembra, y realizar podas, fertilización y regulación de la sombra arbórea, sin embargo, las condiciones ambientales de la región del Soconusco han favorecido la propagación de la roya (Díaz, 2012). Investigaciones sobre epidemiología han indicado que la roya tiene un crecimiento sigmoidal, donde el máximo crecimiento de la enfermedad se observa entre los meses de enero y febrero; después entra en decadencia, debido a que se establece una época seca y calurosa y no existen condiciones favorables para su desarrollo (Durán y Medel, 1985). Para el control de esta enfermedad se han evaluado diferentes fungicidas, sistémicos y preventivos donde el Triadimefon 25% P.H. y el Oxicloruro de cobre al 50% que han dado los mejores resultados (Regalado y Ponce, 1983); sin embargo, también se ha observado presencia del hongo *Verticillium hemileiae* Bouriquet en campo sobre las uredosporas

de *Hemileia vastatrix* en forma natural (Díaz, 2012). Con base a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue aislar el hongo (*Verticillium hemileiae*), evaluar diferentes medios de cultivos, propagarlos de forma masiva y aplicarlo en viveros de café y en cafetales para el control de la roya del cafeto (*H. vastatrix*).

MATERIALES Y METODOS

La investigación se desarrolló en los municipios de Cacaohatan y Huehuetán, Chiapas, México. Con base en la observación en campo del hongo de tonalidad blanquecina asociado a pústulas de la roya del cafeto (*H. vastatrix*) se realizó una recolecta para su aislamiento en el Laboratorio de Microbiología, Fitopatología y Nematología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas, con el fin de evaluar su efecto sobre el patógeno. Se evaluaron seis medios de cultivo para el crecimiento del hongo *Verticillium hemileiae*, concentración de conidios, pH del medio de cultivo y producción masiva en un diseño experimental completamente al azar (Olivares, 1994).

Evaluación en plantas de vivero

El hongo (*Verticillium hemileiae*) aislado y propagado en laboratorio se aplicó en cinco diferentes dosis (2.0 g l⁻¹, 4.0 g l⁻¹, 6.0 g l⁻¹, 8 g l⁻¹, 10 g l⁻¹) y un tratamiento testigo en plantas de cafeto de vivero a las cuales se les habían inoculado uredosporas de *H. vastatrix*; se utilizó un diseño experimental completamente al azar (Olivares, 1994).

Evaluación en condiciones de campo

El hongo *V. hemileiae* se aplicó en huertas comerciales de café infectadas con *H. vastatrix* en cinco dosis diferentes: 0.6 kg ha⁻¹, 1.2 kg ha⁻¹, 1.8 kg ha⁻¹, 2.4 ha⁻¹, 3.0 kg ha⁻¹ y un testigo sin aplicación. Ésta se dirigió hacia el envés de la hojas infectadas por la roya del cafeto, con la finalidad de que *V. hemileiae* estuviera en contacto con las uredosporas de *H. vastatrix*, aplicando un diseño experimental en bloques al azar (Olivares, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hongo recolectado y aislado fue identificado como *Verticillium* spp. con la clave propuesta por Romero (1998). Presenta conidios producidos en conidióforos (libres o agrupados); el orden Moniliales ha sido subdividido en familias, principalmente por el color de los conidióforos, y la familia Moniliaceae presenta conidios y conidióforos hialinos o de colores brillantes. Locci et al. (1971) reporta el hiper-parasitismo de *V. hemileiae* sobre

H. vastatrix; Sobero (2006) menciona que la pérdida del color amarillento-anaranjado típico en esporas de roya se acelera con un hongo blancuzco parasítico identificado como (*V. hemileiae*) (Figura 1 y 2).

El género *Verticillium* tiene las siguientes características morfológicas: conidióforos delgados ramificados, por lo menos algunas ramas verticiladas, conidios ovales a elipsoidales, hialinos, unicelulares, producidos apicalmente, solitarios o en pequeñas cabezuelas; para el presente estudio la especie correspondió a *Verticillium hemileiae* Bouriquet.

El Cuadro 1 muestra la mayor germinación de conidios de *V. hemileiae* (90%) a la mayor concentración de 2.57×10^5 conidios por mL^{-1} en el medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar más Extracto de Malta. Lo anterior coincide con lo reportado por Carballo (1999), quien señala que el hongo (*Verticillium* spp.) crece bien en medios de cultivo como Extracto de Malta Sabouraud y Papa Dextrosa Agar. De forma semejante, Hall (1981) menciona que las colonias de *Verticillium* spp. crecen bien en un medio de cultivo a base de agar malta, harina de avena o papa dextrosa agar, en los cuales se desarrolla un micelio delgado blanco o crema que forma colonias blancas con apariencia algodonosa.

Un dato relevante en el proceso de aislamiento y multiplicación del hongo parasítico fue determinar el pH del medio de cultivo en el cual (*V. hemileiae*) generara mayor concentración de conidios, resultando que es necesario ajustar el pH de la solución del medio de cultivo a 5.5 porque es donde presentó mayor formación de conidios con 2.56×10^5 , germinación de 91.80%



Figura 1. Hoja de cafeto (*Coffea arabica*) afectada por roya (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) con pústulas color amarillo. El micelio color blanco corresponde a *Verticillium hemileiae* Bouriquet.

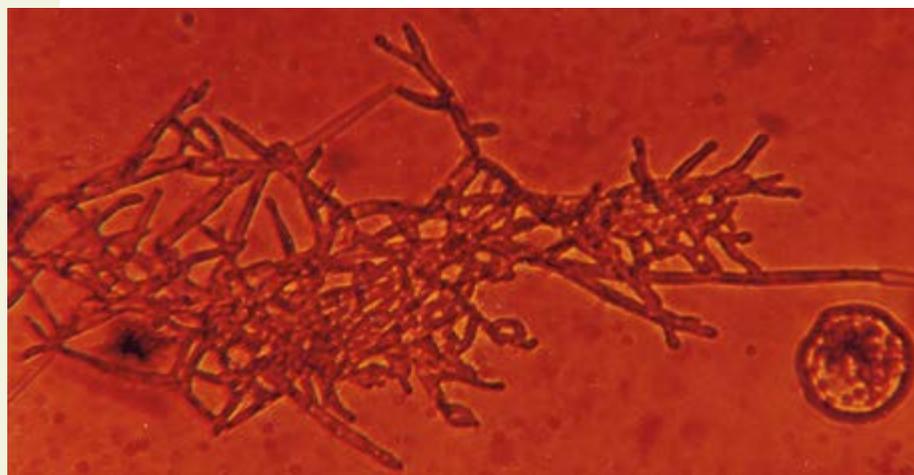


Figura 2. Micelio septado y "verticilios" del hongo (*V. hemileiae*) tomadas al microscopio de luz 40X.

Cuadro 1. Porcentaje de germinación y concentración de conidios del hongo (*V. hemileiae*) en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Germinación (%)	Medio de cultivo	Concentración
SDA+E. de Malta	90.0 a	SDA+E. de Malta	2.57×10^5 a
SDA+E. de Levadura	78.0 b	SDA+E. de Levadura	1.74×10^5 b
SDA	71.0 c	SDA	1.59×10^5 c
PDA	50.0 d	PDA	1.47×10^5 d
PDA+E. de Malta	49.0 d	PDA+E. de Malta	1.32×10^5 e
PDA+E. de Levadura	39.0 e	PDA+E. de Levadura	1.20×10^5 f

* Promedio con la misma letra son estadísticamente iguales, según la Prueba de Tukey a una α de 0.01 de probabilidad.

y patogenicidad de 92.20%; para la propagación masiva, el hongo (*V. hemileiae*) debe ser propagado en salvado de trigo porque fue donde este hongo presentó mayor concentración de conidios por mililitro (2.31×10^5), mayor viabilidad

(90.96%), crecimiento (66.20%) y patogenicidad sobre (*H. vastatrix*) (91.10%) (Figura 3) (Cuadro 2 y 3).

La aplicación de *V. hemileiae* en plantas cafeto en vivero infectadas previamente con *H. vastatrix* mostró



Figura 3. A: Matrices (Botellas Roux) con salvado de trigo inoculadas con el hongo (*V. hemileiae*). B: Bolsas de plástico de alta densidad lineal inoculadas con salvado de trigo con el hongo (*V. hemileiae*).

que el mayor nivel de infestación, cantidad de pústulas de roya por hoja y defoliación se observó en el tratamiento testigo, el cual se inoculó con *H. vastatrix* sin *V. hemileiae* (Figura 4).

V. hemileiae propagado en laboratorio se aplicó en diferentes dosis (Cuadro 4) y la mayor infección se observó en el tratamiento testigo sin aplicación.

CONCLUSIONES

El hongo *Verticillium hemileiae* Bouriquet es un parásito de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.); el medio de cultivo más efectivo para producirlo es Sabouraud Dextrosa Agar más extracto de Levadura y, para propagarlo masivamente, el salvado de trigo. El pH del medio de cultivo se tiene que ajustar a 5.5. Su aplicación a plantas de café (*Coffea arabica*), vivero y campo (*V. hemileiae*) ejerce control de *H. vastatrix*.

LITERATURA CITADA

Anónimo 2001. Censo de productores de café del Estado de Chiapas. Consejo Estatal de Café (COESCAFÉ) Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
 Anonymous 2008. US Department of Agriculture Foreign Agriculture Services

Cuadro 2. Comparación de medias de la concentración, porcentaje de germinación y patogenicidad de conidios del hongo (*V. hemileiae*) en diferentes medios de cultivo.

pH	Concentración	pH	Germinación (%)	pH	Patogenicidad (%)
5.5	2.56×10 ⁵ a	5.5	91.80 a	5.5	92.20 a
6.0	2.22×10 ⁵ b	5.0	89.80 ab	6.0	89.80 ab
5.0	1.42×10 ⁵ c	6.0	89.20 b	5.0	80.40 b
6.5	1.04×10 ⁵ d	6.5	58.80 c	6.5	79.80 c
7.0	1.76×10 ⁴ e	7.0	52.80 d	7.0	70.00 d

* Promedio con la misma letra son estadísticamente iguales, según la Prueba de Tukey a una a de 0.01 de probabilidad.

Cuadro 3. Propagación del hongo (*V. hemileiae*) en diferentes sustratos.

Tratamiento	Concentración (%)	Viabilidad (%)	Crecimiento (%)	Patogenicidad (%)
Salvado de trigo	2.31×10 ⁵	90.96 a	66.20 a	91.10 a
Trigo en grano	2.31×10 ⁵	63.63 b	59.20 b	53.40 b
Arroz en grano	2.31×10 ⁵	45.53 c	41.70 c	40.80 c

* Promedio con la misma letra son estadísticamente iguales, según la Prueba de Tukey a una a de 0.01 de probabilidad.

Cuadro 4. Porcentaje de infección de (*H. vastatrix*) con aplicación del hongo (*V. hemileiae*).

Tratamientos	Días después de la aplicación				
	0	15	30	45	60
A 0.6 kg ha ⁻¹	5.00	6.15	8.12	15.15	5.68
B 1.2 kg ha ⁻¹	13.55	12.02	15.62	20.49	9.40
C 1.8 kg ha ⁻¹	8.78	9.17	10.65	16.57	7.65
D 2.4 kg ha ⁻¹	9.03	14.48	16.92	21.72	12.10
E 3.0 kg ha ⁻¹	18.82	13.45	19.55	24.92	12.62
F Testigo sin aplicación	18.52	20.55	20.10	21.27	16.40



Figura 4. A: Hojas de cafeto con menor cantidad de pústulas de roya (*H. vastatrix*). B: Hojas de cafeto con tratamiento testigo, mostrando mayor con mayor cantidad de pústulas de roya. C: Presencia del hongo (*V. hemileiae*) después de su inoculación. D: Pústulas de (*H. vastatrix*) en el tratamiento testigo sin aplicación en condiciones de campo.

Aranda J. 2004. El sistema campesino indígena de producción de café (*Coffea* spp) importancia económica.

Carballo V.M. 1999. Utilización de (*Verticillium* spp) para el control de plagas. Proyecto PFNOS. CATIE. Turrialba, Costa Rica C.A.

Díaz V.M. 2012. Control microbiano de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) con el hongo (*Verticillium hemileiae* Bouriquet.) Tesis de Doctorado en Ciencias en Agricultura Tropical. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV, 110 p

Durán L.C. y A. Medel L. 1985. Epidemiología de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. et. Br.) en el Istmo

de Tehuantepec, Oaxaca. Instituto Mexicano del Café. Xalapa, Veracruz, México. pp. 1, 11-13.

Hall R.A. 1981. The fungus (*Verticillium lecanii*) as a microbial insecticide against aphid and scales. In: Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980. Burges, H.D. (ed). Academic Press. London, New York. pp. 483-498.

Locci R.G., Minervin F., Rodriguez Jr.C.J. 1971. Studies by transmissiions and scanning electron microscopy on the (*Hemileia vastatrix*), (*Verticillium hemileiae*) association. Riv. Patol Veg. 7: 127-140

Olivares S.E. 1994. Paquetes de diseños experimentales versión 2.5. Facultad de Agronomía. Universidad

Autónoma de Nuevo León, Marín, Nuevo León.

Regalado O.A., Ponce D.P. 1963. Evaluación de fungicidas para el control de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. et. Br.) en México. En: IV Simposio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras, Portugal. Comunicoes Centro de Investigacao das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal. pp. 569-582

Romero C.S. 1988. Hongos fitopatógenos. 1ª. Edición Editorial Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.

Sobero L. 2006. La roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. et. Br). Distribución e impacto en América Latina.

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE BIORREACTORES PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE VAINILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews)

ESTABLISHMENT OF A BIOREACTOR SYSTEM FOR VANILLA (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) MICROPROPAGACIÓN

Jericó J. J.¹, Bello-Bello, J. J.¹, Spinoso-Castillo, J.¹, Iglesias-Andreu, L. G.^{2*}

¹Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348, Congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, C. P. 94946, Veracruz, México. ²Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Xalapa, Veracruz México.

*Autor responsable: xliglesias@gmail.com

RESUMEN

Se diseñó e instaló un sistema de biorreactores para la micropropagación a gran escala de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews, una orquídea de importancia económica. Se comparó la eficiencia del protocolo de cultivo *in vitro* empleando el método convencional en medio sólido con el sistema de inmersión temporal en medio líquido. Los resultados mostraron que el cultivo en biorreactores permitió alcanzar en 30 días de cultivo una tasa más elevada de multiplicación (12 brotes/explante) mientras que en medio semisólido la tasa de multiplicación fue menor (7 brotes/explante), indicando que el sistema de cultivo en biorreactores es una excelente alternativa para la propagación *in vitro* de esta valiosa especie.

Palabras clave: propagación, inmersión temporal, SIT, vainillina.

ABSTRACT

A bioreactor system was designed and installed for the large-scale micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. an orchid of economic importance. The efficiency of the *in vitro* culture protocol using the conventional method in solid medium was compared with the temporary immersion system in liquid medium. The results showed that cultivation in bioreactors allowed to reach a higher rate of multiplication (12 shoots/explant) in 30 days of cultivation, while in the semisolid medium the rate of multiplication was lower (7 shoots/explant); this indicates that the cultivation system in bioreactors is an excellent alternative for *in vitro* propagation of this valuable species.

Key words: propagation, temporary immersion, SIT, vanilla.



INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) es una orquídea que se cultiva comercialmente por sus silicuas aromáticas de las cuales se extrae la vainillina, una sustancia saborizante ampliamente demandada para su uso en la industria alimenticia y como cosmético (Bory, 2008). A pesar de su importancia esta especie se encuentra amenazada (NOM-ECOL-059-2001) debido a que las poblaciones silvestres han sido diezmadas con la recolecta excesiva para establecer plantaciones comerciales. En México es una especie subutilizada, ya que actualmente sólo se produce cerca de 1% de la producción mundial y no se ha aprovechado la denominación de origen "Vainilla de Papantla" que el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) le otorgó en 2009 para su protección (Soto, 2006). Una de las limitantes actuales de esta especie es que no se cuenta con protocolos eficientes para su propagación masiva. En la actualidad esta especie se propaga comercialmente por la vía asexual mediante el uso de esquejes (segmentos de tallo) que se obtienen de plantaciones comerciales, sin embargo, dada la importancia económica, social y cultural del cultivo, así como el desabasto de propágulos resulta importante contar con un protocolo eficiente para propagar comercialmente la especie (Figura 1).

La micropropagación de plantas

La micropropagación o clonación *in vitro* de plantas es una de las aplicaciones biotecnológicas más desarrollada en los últimos años. En la actualidad constituye una de las herramientas más utilizadas. Por esta vía, es posible obtener un gran número de individuos libres de plagas y enfermedades en menor tiempo y empleando espacios reducidos. Actualmente la industria biotecnológica agrícola en México cuenta con potencial productivo para la propagación masiva de plantas. Sin embargo, el empleo de la micropropagación a escala comercial se ha limitado cada vez más, debido principalmente a los altos costos por mano de obra, baja eficiencia biológica y falta de automatización durante los procesos de la micropropagación. Existen reportes para micropropagación de *V. planifolia* (Philip y Nainar, 1986; Tencio, 1992; Lee-Espinosa *et al.*, 2008; Mino 2009; Palama *et al.*, 2010; Chin Tan *et al.*, 2011). Sin embargo, los protocolos de micropropagación que se han desarrollado en este cultivo tienen baja tasa de multiplicación; además, el uso de sistemas de inmersión temporal no ha sido reportado en esta especie.

Sistemas de inmersión temporal (SIT)

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) es el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones axénicas y controladas. Actualmente existen una amplia gama de modelos y sistemas automatizados que se emplean en la micropropagación de plantas, dentro de los cuales destaca el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT[®]) (Escalona *et al.*, 1999), el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]) (Alvard *et al.*, 1993), el Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT[®]) (Robert *et al.*, 2006), el Plantima[®] (A-Tech Bioscientific, 2010) y, más recientemente, el SETIS[®] (SETIS, 2012). La tecnología de biorreactores y técnicas de micropropagación de alta frecuencia abren las puertas para lograr un mayor escalado en el proceso de micropropagación. El sistema de micropropagación que se propone en el



Figura 1. Huerta comercial de vainilla (*Vanilla planifolia*) originada asexualmente. Esqueje y yema.

presente trabajo permite la semiautomatización del proceso y evita el uso de agentes gelificantes que encarece el proceso convencional, reduce los costos ocasionados por la mano de obra y aumenta la eficiencia biológica del cultivo *in vitro* de *V. planifolia*. Con base en lo anterior, el objetivo del presente fue desarrollar un protocolo para la micropropagación eficiente del germoplasma de *V. planifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo Vegetal del Instituto de Biotecnología y Ecología aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana. Para su ejecución primeramente se diseñó e instaló el SIT a nivel de laboratorio y posteriormente se estableció el protocolo de micropropagación. Para la instalación del SIT se adecuó un espacio físico con control de las condiciones de temperatura y humedad adecuadas para el desarrollo e incubación de los cultivos *in vitro*. Se dispuso de un anaquel cuya parte superior se adaptó para ubicar un recipiente con los explantes y, en su parte inferior, otro conteniendo el medio de cultivo. Ambos frascos estuvieron comunicados a través de mangueras de silicona. Las condi-

ciones de esterilidad se lograron mediante el empleo de filtros hidrofóbicos de $0.2 \mu\text{m}$. Según el tiempo programado, la válvula y el aire proveniente del compresor se abren para impulsar el medio de cultivo hacia la parte superior conteniendo los explantes. Durante el período de inmersión se produce un flujo de aire que genera el burbujeo del medio que a su vez remueve los explantes. Pasado el tiempo de inmersión, el líquido regresa por gravedad al reservorio de medio de cultivo. La frecuencia y el tiempo de inmersión se regulan mediante el empleo de un temporizador o controlador lógico programable (PCL). De esta forma se logra la automatización del sistema de inmersión temporal (Figura 2).

Propagación *in vitro*

Se emplearon como explantes, yemas y ápices de plantas de vainilla (*V. planifolia*) recolectadas en Papantla, Veracruz México; se lavaron bajo un flujo de agua corriente por 45 minutos. Posteriormente se mantuvieron en agitación por 30 minutos en una solución de Benomilo 1 g L^{-1} (Promyl®). Una vez en la cámara de flujo laminar se procedió a desinfectar los explantes en soluciones de etanol al 70% v/v durante 30 s y cloro comercial al 10% v/v durante 20 minutos. Finalmente se aplicaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Después de este tratamiento los explantes se sumergieron nuevamente por 10 minutos en una solución al 3% de cloro comercial (hipoclorito de sodio) y se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril. Los explantes se cultivaron en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 g L^{-1} de benciladenina (BA) de acuerdo con la metodología propuesta por Lee-Espinoza *et al.* (2008). Para la etapa de enraizamiento se utilizó medio MS al 50% sin reguladores del crecimiento. Para el medio semisólido se usó Gelrite™ (SIGMA®) al 0.22% (w/v) como agente gelificante. El pH de los medios fue ajustado a 5.8. La esterilización se realizó en autoclave a 1.5 Kg cm^{-2} de presión y 121 °C durante 20 minutos. Los recipientes de cultivo, conteniendo tres explantes para el medio semisólido y cinco para el SIT, fueron incubados a $24 \pm 2 \text{ °C}$ y se mantuvieron bajo luz fluorescente ($40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad. Se utilizó un diseño

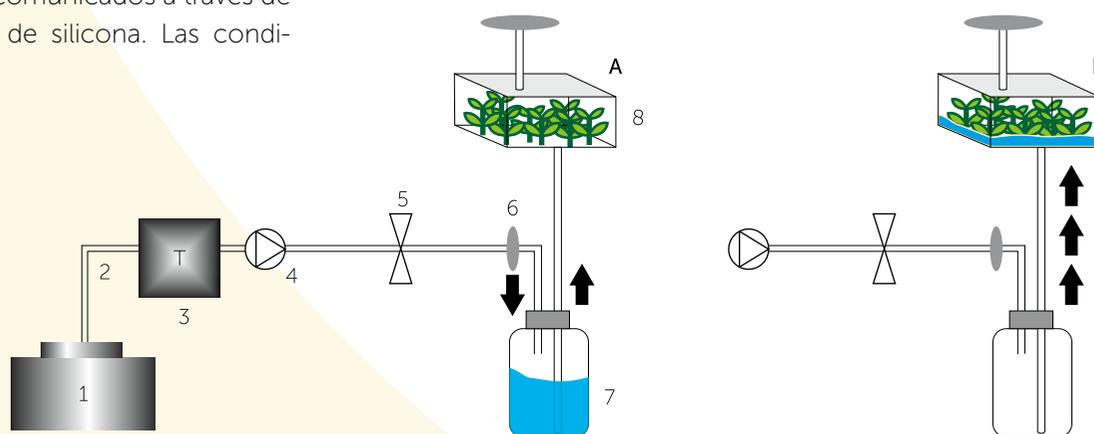


Figura 2. Diagrama del sistema de inmersión temporal (SIT). A: Sin inmersión. B: Con inmersión. 1: Compresor de aire, 2: Manguera de silicona, 3: Temporizador, 4: Bomba de solenoide, 5: Conexión a tubo de venteo, 6: Filtro venteo, 7-8: Recipiente con explantes.

experimental completamente al azar y se emplearon 30 explantes por tratamiento. Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS v. 11.5 para Windows y, para detectar diferencias entre los tratamientos, se realizó una prueba t-Student ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que fue posible lograr la inducción de brotes en los dos sistemas evaluados. Sin embargo, el cultivo en biorreactores resultó ser el más eficiente ya que permitió obtener 12 brotes por explante en promedio. El cultivo en medio semisólido solo permitió obtener una tasa de multiplicación de siete brotes por explante (Cuadro 1). El sistema de inmersión temporal en biorreactores aumentó en 42% la tasa de multiplicación, comparado con el sistema en medio sólido.

La longitud de los brotes fue mayor en medio sólido (1.8 cm), mientras que en inmersión temporal fueron de 1.4 cm en promedio. Esto se debió probablemente a que los formados en inmersión temporal tienen mayor superficie de contacto con el medio de cultivo líquido. Además, los formados en medio líquido fueron homogéneos. Una de las ventajas del sistema de inmersión temporal, comparado con otros realizados *in vitro*, es que permite combinar la aireación con la inmersión del explante, sometiéndolo al tiempo y periodo de inmersión requerido para que las plántulas tomen del medio de cultivo los nutrientes y reguladores del crecimiento para su desarrollo. Esta es una de las razones que lo hacen más eficiente. De acuerdo con Alvard *et al.* (1993), el tiempo de inmersión del explante es, probablemente, la característica que más atención requiere cuando se desea propagar una especie. Los SIT han sido empleados para la micropropagación de plantas de cítricos (*Citrus spp.*) (Cabasson *et al.*, 1997), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Lorenzo *et al.*, 1998),

caféto (*Coffea arabica*) (Etienne-Barry *et al.*, 1999), banano (*Musa paradisiaca*) (Colmenares y Giménez, 2003), manzano (*Malus domestica*) (Zhu *et al.*, 2005), eucalipto (*Eucalyptus spp.*) (McAlister *et al.*, 2005), chile habanero (*Capsicum chinense*) (Bello-Bello *et al.*, 2010), entre otros. En el caso particular de *V. planifolia*, los brotes obtenidos bajo el SIT mostraron ser más vigorosos en comparación con aquellos que fueron cultivados en medios semisólido (Figura 3).

Cuando los brotes alcanzaron entre 2-4 cm de longitud después de 30 días de cultivo *in vitro*, fueron trasladados a etapa de enraizamiento en biorreactores, donde 100% de los brotes produjeron raíces (Figura 4 A), con 95% de supervivencia durante la etapa de aclimatización, observándose plántulas vigorosas (Figura 4 B).

CONCLUSIONES

El sistema de micropropagación de vainilla empleando los biorreactores propuestos aumentan la tasa de multiplicación y permiten disminuir el costo de operación y el uso de agentes gelificantes, facilitando la

Cuadro 1. Número y longitud de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) desarrollados en diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

Sistema de cultivo	Número de brotes/ explante (media±ES)	Longitud (cm)
Medio sólido	7.11±0.31 b	1.88±0.09 a
Inmersión temporal	12.04±0.48 a	1.45±0.07 b

*Los valores representan la media±ES (error estándar). Medias con diferente letra entre columnas son significativamente diferentes (t-Student, $p \leq 0.05$).

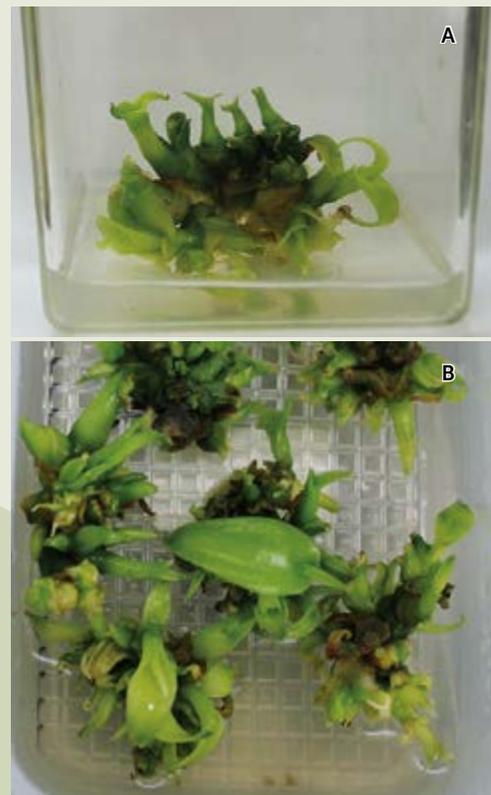


Figura 3. Desarrollo de brotes obtenidos en diferentes sistemas de micropropagación. A: Medio semisólido. B: Inmersión temporal.

regeneración de plantas a gran escala, lo que hace posible liberar accesiones conservadas *in vitro* y facilitar su reinserción a los ecosistemas alterados.

LITERATURA CITADA

Alvard D.C., Teisson C.D. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32: 55–60.

A-Tech Bioscientific (<http://www.atechbios.com.tw>)

Bello-Bello J., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Gómez-Uc E., Robert M., Iglesias-Andreu L., Santana-Buzzy N. 2010. Improvement of *In Vitro* proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. *HORTSCIENCE* 45(7): 1093–1098.

Bory S., Lubinsky P., Risterucci A.M., Noyer J.L., Grisoni M., Duval M.F., Besse P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am. J. Bot.* 95 (7): 805-815

Cabasson C., Alvard D., Dambier D., Ollitrault P., Teisson C. 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 33–37

Chin T.B., Foan C., Alderson P. 2011. Optimization of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 105: 457–463.

Colmenares M., Giménez C. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 20: 468-477.

Escalona M., Lorenzo J.C., González B., Daquinta M., Gonzalez J.L., Desjardins Y., Borroto C.G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.*18:743–748.

Geetha S., Sudheer A. 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Currentscience*. 79(69): 886-890.

Lee Espinoza H., Murguía J., García B., and Córdoba A. 2008. *In vitro* Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia*) Andrew. *HortScience*.

Lorenzo J.C., Gonzalez B.L., Escalona M., Teisson C., Espinosa P. and Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:197–200

MacAlister B., Finnie J., Watt M. M. P. and Blakeway F. 2005. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 347-358

Minno D and Nirmal K (2009). Micropropagation and *In vitro* Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: Mohan J and Praveen K (eds) *Protocols for in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. *Methods Mol Biol.* Vol. 547 (pp.129-138) Humana Press, New York.

Palama T., Menard P., Fock I., Choi Y., Bourdon E., Govinden-Soulange J., Payet M.B, Verpoorte R. and Kodja H. 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla*



Figura 4. Enraizamiento y aclimatización de vitroplántulas de vainilla. A: Enraizamiento. B: Aclimatización en condiciones de invernadero.

- planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. BMC Plant Biol. 10 (82): 1-18.
- Phillip V., Nainar S. 1986. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb) Ames using tissue culture. J Plant Physiol. 122: 211-215.
- Robert M.L., Herrera-Herrera J.L., Herrera-Herrera G., Herrera-Alamillo M.A., Fuentes-Carrillo P.A. 2006. New temporary immersion bioreactor system for micropropagation, p. 121-129. In: Loyola-Vargas, V.M. and F. Vazquez-Flota (eds.). Plant cell culture protocols. 2nd Ed Vol 11. Humana Press, Totowa, NJ.
- Sánchez-Morales S., Becerril-Román E., Tijerina-Chávez L., Santizo-Rincón J.L. 2001. Crecimiento y desarrollo de vainilla en tres sistemas de producción de Papantla, Veracruz. Rev Fitotec Mex. 24: 49-56.
- SETIS. (<http://www.setis-systems.be>)
- Soto-Arenas M.A. 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. CONABIO. Biodiversitas 66: 1-9.
- Tencio G. 1992. Respuesta de la vainilla (*Vanilla fragans*) *in vitro* al ácido acetil salicílico. Instituto tecnológico de Costa Rica. Depto. de Agronomía. Costa Rica.
- Zhu Li-Hua, Li Xue-Yuan, Welander M. 2005. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81:313-318.



RELATORÍA: EL QUEHACER DE LOS LABORATORIOS DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASICA)

THE WORK OF THE LABORATORIES OF THE NATIONAL HEALTH SERVICE, SAFETY AND QUALITY OF FOOD (SENASICA)

Zamora-Nava, M.C.¹; Arias-Ruiz, A.¹; Barrera-Andrade, M.G.¹; Acatzi-Silva, A.I.¹; García-López, L.C.¹; González-Ávila, D.

¹Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Av. Municipio Libre No. 377, Piso 7-B, Col Santa Cruz Atoyac, Del. Benito Juárez, México, D.F., C.P. 03370. Tel: +52 (55) 5905 1000, Ext. 51005.

Dirección de contacto: difusion@senasica.gob.mx

RESUMEN

Debido a grandes brotes de enfermedades en animales o plagas que han afectado a México, desde principios del siglo veinte surge la necesidad de crear sistemas de análisis sofisticados en los laboratorios con la finalidad de crear protocolos de diagnóstico, fichas técnicas, manuales y catálogos, así como detectar patógenos, plagas y malezas. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) dependiente de la SAGARPA, tiene la misión de regular, administrar y fomentar las actividades de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria, reduciendo los riesgos inherentes en materia agrícola, pecuaria, acuícola y pesquera en beneficio de los productores, consumidores e industria; cuenta con una red de laboratorios que atiende la detección de plagas y enfermedades que ponen en riesgo la viabilidad económica del sector agropecuario acuícola, pesquero y de salud pública.

Palabras clave: sanidad, inocuidad, agroalimentario.



Centro nacional de referencia en detección de organismos genéticamente modificados (CNRDOGM)

La biotecnología moderna, aplicada en especies vegetales, es una herramienta que desde mediados de los años noventa generó los primeros desarrollos de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs), también conocidos como transgénicos. Actualmente a nivel mundial se utilizan plantas genéticamente modificadas como soya, algodón, maíz, trigo, canola y arroz, entre otras, que les permiten resistir el ataque de plagas, enfermedades, condiciones climáticas extremas, como heladas o sequías; tolerar herbicidas, aumentar sus propiedades nutrimentales, o bien, combinar varias de estas características en una misma planta. El Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) es el laboratorio oficial de la SAGARPA para el análisis de OGMs desde diciembre de 2011. Cuenta con el reconocimiento por la confiabilidad de sus resultados a través de la acreditación SA-0338-005/11 otorgada por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). Este laboratorio lleva a cabo el análisis de diversos cultivos para detectar, identificar y cuantificar las modificaciones genéticas que pudieran estar presentes en la muestra. Actualmente se analizan principalmente muestras de maíz, algodón, soya, alfalfa y trigo. A continuación se describen los pasos más representativos para el análisis de los OGMs (Figura 1).

Recepción, registro y acondicionamiento de muestras

Durante su registro, a las muestras se les asigna un número único e irrepetible, lo que garantiza su identificación a lo largo del proceso de análisis hasta la emisión del informe



Figura 1. Tipo de muestras que son analizadas en el CNRDOGM.

INTRODUCCIÓN

El Servicio

Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) dependiente de la SAGARPA, tiene la misión de regular, administrar y fomentar las actividades de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria, reduciendo los riesgos inherentes en materia agrícola, pecuaria, acuícola y pesquera en beneficio de los productores, consumidores e industria; cuenta con una red de laboratorios que atiende la detección de plagas y enfermedades que ponen en riesgo la viabilidad económica del sector agropecuario acuícola, pesquero y de salud pública. La red nacional de 50 laboratorios de alta especialización respalda al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de México en beneficio del comercio nacional e internacional, así como al desarrollo y evolución sanitaria del inventario pecuario nacional y de salud pública. Los laboratorios cuentan con infraestructura para brindar servicios de diagnóstico y constatación oportunos, confiables y de calidad, ejecutados por personal especializado que emplea técnicas modernas y equipos de vanguardia para la atención de emergencias, lo cual permite tomar decisiones para controlar y erradicar plagas y enfermedades de alto riesgo para la agricultura, ganadería, acuicultura y pesca, al aplicar operativos y medidas sanitarias. El SENASICA lleva a cabo diferentes actividades de monitoreo, inspección y vigilancia de productos agrícolas, pecuarios, acuícolas y pesqueros a lo largo del territorio nacional, con el fin de regular y vigilar la inocuidad de estos alimentos. Para cumplir con esta tarea, se cuenta con el apoyo y la participación de laboratorios oficiales que fungen como Centros Nacionales de Referencia en el análisis de alimentos, identificando la presencia o ausencia de contaminantes químicos y microbiológicos o las modificaciones genéticas que puedan causar daño a la salud, o bien, que éstos se encuentren dentro de los límites permitidos por la regulaciones nacionales e internacionales, asegurando así la entrega de productos inocuos al consumidor.

de resultados. En esta etapa a las muestras de tejido vegetal (hojas o tallos) se le realizan varios cortes y son cristalizadas con nitrógeno líquido (N₂); posteriormente son trituradas. Cuando la muestra consiste en granos o semillas, se muelen hasta obtener harinas; tanto la trituración como la molienda se realizan mecánicamente. La muestra acondicionada es dividida en tres sub-muestras, de las cuales dos son enviadas al área de resguardo en donde permanecerán en congelación por un periodo mínimo de cinco años; con la otra sub-muestra se inicia el proceso de extracción de ADN (Figura 2, 3).

Extracción de ADN

Una vez reducido el tamaño de la muestra, el siguiente paso es hacerla interactuar con algunos componentes químicos (sales y detergentes) y biológicos (enzimas que degradan



Figura 2. Recepción y acondicionamiento de muestras.



Figura 3. Extracción y análisis de ADN de las muestras recepcionadas.

proteínas) que rompen la célula vegetal con el objetivo de liberar el ADN del interior de la misma.

Análisis de secuencias genéticamente modificadas

Este análisis se lleva a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés), la cual permite amplificar o "multiplicar" billones de veces los fragmentos de ADN característicos de la modificación genética en la muestra analizada. Esta es una técnica con una alta especificidad, de manera que aunque se tenga muy poca cantidad de ADN es posible detectar pequeñas concentraciones de OGMs. El análisis de secuencias de la muestra consta de los niveles de detección, identificación y cuantificación de dichas secuencias.

Detección, identificación y cuantificación de OGM

La detección permite determinar si existe la presencia o ausencia de material genéticamente modificado en una muestra, mientras que la identificación indica las características introducidas al cultivo (resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas, resistencia a sequía, etcétera), inclusive en eventos apilados o "stacks".

De esta forma se puede identificar variedades genéticas no permitidas para su liberación al ambiente. La cuantificación determina el porcentaje de material genéticamente modificado (GM) de una muestra y se pueden detectar niveles muy bajos de material GM en cualquier caso (herramienta para el etiquetado y monitoreo). Una variación de la técnica de PCR para la cuantificación de OGM es la PCR digital (dPCR), la cual cuenta con mayor exactitud y precisión. Esta técnica trabaja a base de diluciones seriales y es capaz de cuantificar las secuencias genéticamente modificadas en unidades de número de copias, que equivale al número de moléculas de ADN, y se caracteriza por una sensibilidad extraordinaria, pues mide desde 0.6 moléculas de ADN, siendo así la técnica de cuantificación de OGM con mayor jerarquía a nivel mundial (Figura 4).

Secuenciación

Las actividades en el área de secuenciación incluyen la caracterización de OGMs a partir de hojas de tejido vegetal, granos, semillas y plásmidos (moléculas circulares de ADN que se replican de manera independiente al cromosoma de la célula hospedera), con la finalidad

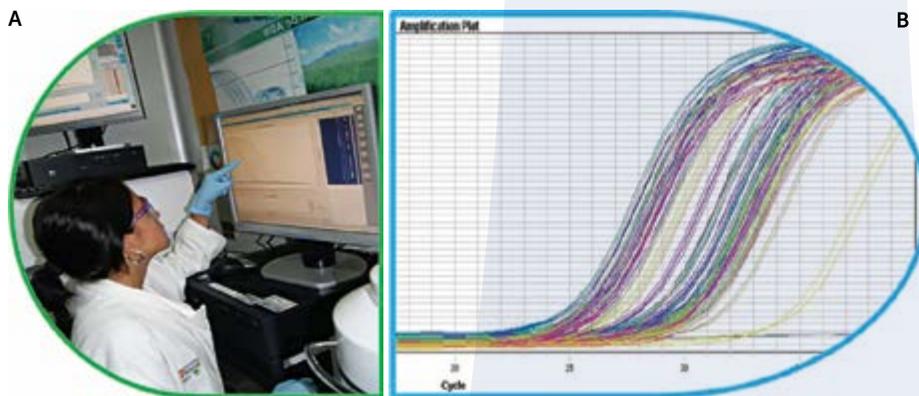


Figura 4. A: Curva de cuantificación de OGM. B: Curva de amplificación por RT-PCR.

de monitorear los eventos liberados al campo (Figura 5). A partir de 2013 se inició el proceso de secuenciación masiva para organismos patógenos, con el objetivo de crear una base de datos nacional de cepas patógenas que se encuentran en productos alimenticios de interés.

Las muestras vegetales pasan por un proceso de acondicionamiento y extracción de ADN, mientras que los organismos patógenos quedan exentos de esta etapa ya que se parte directamente del ADN. Ambas muestras pueden llevarse a cabo utilizando el principio de pirosecuenciación, o bien, por secuenciador *Ion Torrent*, a través de un chip semiconductor, como se muestra en la Imagen 2.

El proceso de pirosecuenciación comienza con la adaptación del ADN para obtener una librería de pequeños fragmentos de 600 a 700 pares de bases, lo cual se logra fragmentando el ADN a secuenciar mediante un proceso físico conocido como "nebulización", donde el ADN se rompe utilizando un gas inerte a una presión y tiempo constante. Posteriormente se trabaja con una mezcla de enzimas que cortan las dos hebras de ADN por el mismo lugar, generando dos extremos de doble cadena que permitirán la unión del adaptador (pequeñas secuencias A y B), el cual está diseñado para poder seleccionar, amplificar y secuenciar.

El siguiente paso consiste en cargar las esferas en una placa (Figura 6), la cual consta de más de un millón de pocillos de 44 micras de diámetro. Las esferas con ADN se introducen a otro tipo de esferas que contienen las enzimas necesarias para detectar la incorporación de nucleótidos (compuesto orgánico que está formado por una base nitrogenada, un azúcar y un ácido fosfórico) durante la síntesis de la cadena complementaria; y de esta forma se lleva a cabo una cascada enzimática liberando un pirofosfato y termina con la emisión de luz, como se muestra en la Figura 7.

El secuenciador recoge el patrón de destellos luminosos que se emiten en la placa y los resultados se analizan mediante programas bioinformáticos y se convierten en secuencias. La plataforma *Ion Torrent* con la que cuenta el CNRDOGM es similar a la pirosecuenciación; la diferencia es que la muestra pasa por una digestión enzimática y, mediante un factor de dilución, inicia el proceso de la muestra en la cual el ADN se liga a los adaptadores, generando la librería que posteriormente se amplifica y se secuencia. El principio de *Ion Torrent* se basa en la incorporación de pequeñas secuencias que adiciona el secuenciador a la muestra de interés y mediante el uso



Figura 5. Recolección de muestra en campo. Fuente: SAGARPA.

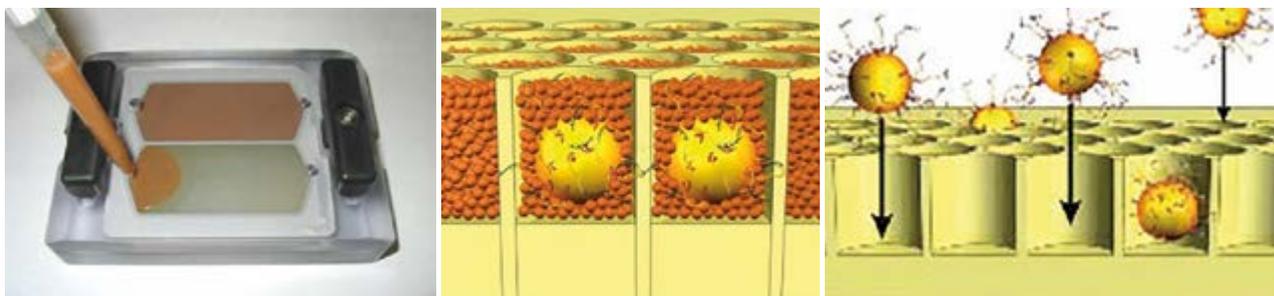


Figura 6. Montaje del llenado de la PPT para la plataforma 454 GS FLX. Fuente: www.roche-applied.science.com.

de un chip semiconductor (Figura 8) se detectan cambios en el pH de la muestra, generando las señales correspondientes que finalmente son captadas por el secuenciador y analizadas mediante una programa bio-informático.

Este tipo de secuenciación es considerada como de nueva generación, ya que proporciona la información necesaria para poder verificar cual-

quier tipo de evento o modificación genética que se presente en diferentes variedades de muestras, además de obtener información masiva para poder identificar la secuencia de interés. Además, el CNRDOGM cuenta con reconocimiento internacional, pues cada año participa en pruebas internacionales, conocidas como ensayos de aptitud, donde compara sus resultados de análisis con los de laboratorios homólogos de otros países coordinados por organismos de Francia y Estados Unidos, comprobando que el trabajo que se realiza en México en materia de análisis de OGM se encuentra al nivel de los mejores laboratorios del mundo. De esta manera, el SENASICA implementa y mejora las acciones regulatorias y operativas que contribuyan a lograr una protección adecuada de la sanidad animal, vegetal, acuícola y pesquera en beneficio de la sociedad, fortaleciendo el compromiso del Gobierno Federal de salvaguardar la bioseguridad en México.

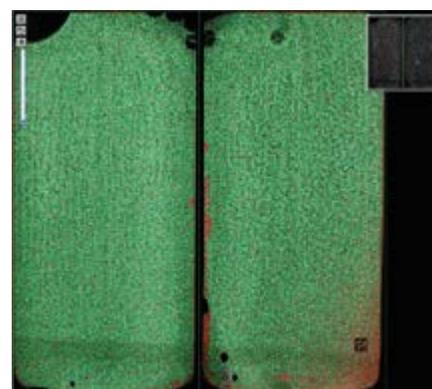


Figura 7. Resultados de la emisión de luz generada en el secuenciador, un color verde que indica incorporación de secuencia y los pocillos rojos, ausencia de ADN.

son las Buenas Prácticas de Producción (BPP) y las Buenas Prácticas de Manejo o Manufactura (BPM) durante la producción y el procesamiento primario de los alimentos agrícolas que permiten asegurar que cada eslabón de la cadena agroalimentaria establezca controles y actividades que eviten riesgos de contaminación y obtener

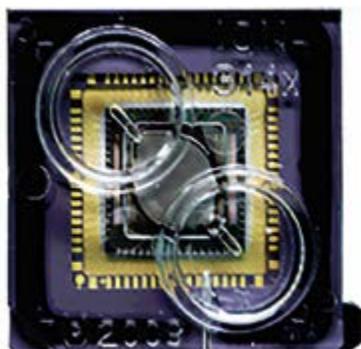


Figura 8. Equipo Ion Torrent que trabaja con un chip semiconductor que es utilizado para validar resultados del 454 GS FLX

Laboratorio de diagnóstico para la detección de organismos patógenos (LDDOP)

Uno de los objetivos del SENASICA es la vigilancia de la aplicación de los Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación, como



en consecuencia alimentos inocuos, definiéndose esto como **“la característica que tiene un alimento de no causar daño a la salud del consumidor por efectos de algún contaminante”**.

El SENASICA coordina y opera el Programa Nacional de Monitoreo de Contaminantes y Residuos Tóxicos, el cual contempla el monitoreo de alimentos agropecuarios no procesados, producidos en el país, y aquellos que se importan y pudieran presentar existencia de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos (Figura 9). Este programa se basa en el análisis de muestras obtenidas de las diferentes regiones agropecuarias del país que reciben los Laboratorios Oficiales de la institución. Estas muestras permiten determinar la condición sanitaria que guardan los alimentos y cumplir con los más elevados y estrictos estándares de sanidad e inocuidad exigidos en el mercado nacional e internacional.

Derivado de los programas, la colaboración entre Laboratorios de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en Inglés) y el SENASICA, se generó mayor comunicación y entendimiento técnico entre ambas agencias, logrando la alineación de técnicas y metodologías de análisis microbiológico con FDA, que benefician al sector agropecuario al realizar exportación de alimentos frescos con un respaldo de su condición sanitaria emitida por Laboratorios Oficia-



Figura 9. Productos hortofrutícolas

les encargados de Vigilar la Calidad e Inocuidad de los alimentos.

Como resultado de esta colaboración se conforma el Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP) y cuatro Laboratorios Móviles de Inocuidad, cuya finalidad es generar diagnósticos confiables y oportunos

de productos hortofrutícolas, así como fuentes de agua que permitan identificar puntos de contaminación durante todo proceso de producción y empaque, que sus resultados proporcionen información para determinar las acciones preventivas y/o correctivas a implementar para reducir los riesgos por contaminación en las unidades de producción primaria, con la finalidad de brindar productos de calidad e inocuos en los mercados nacional e internacional (Figura 10).

El Laboratorio para la Detección de Organismos Patógenos tiene como misión realizar la detección e identificación oportuna de contaminantes microbiológicos en productos agrícolas de producción primaria, así como contaminantes químicos en fluidos de ganado bovino



Figura 10. Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP).

para satisfacer las necesidades de nuestros clientes bajo el esquema de calidad de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006.

Los procedimientos operativos para la detección e identificación de los organismos patógenos en muestras de productos agrícolas, en agua y en superficies de contacto empleados por el LDDOP, se realizan a través de equipos y metodologías de PCR-RT, los cuales cuentan con un certificado de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC International) y la Association Française de Normalisation (AFNOR). Dichos organismos reconocen que los Métodos Oficiales de Análisis son aceptables, brindan credibilidad y confianza, y son válidos en todo el mundo (Figura 11).

En caso de obtener resultados positivos **“presuntivos”** se aplican métodos convencionales que, mediante pruebas bioquímicas y la utilización de los medios de cultivo apropiados, permiten la diferenciación, selección y aislamiento del patógeno blanco.

Determinación de clembuterol

Adicional al análisis para la identificación de organismos patógenos en productos vegetales se realiza la identificación y cuantificación de residuos de clembuterol en muestras de fluidos de bovinos. Las muestras a analizar son obtenidas por personal oficial y provienen de unidades de producción inscritas al Programa Proveedor Confiable; éste fue establecido por el SENA-

SICA para vigilar y evitar el uso de dicha sustancia. Las muestras son obtenidas en los operativos realizados en conjunto con la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la Procuraduría General de la República (PGR) y los Gobiernos Estatales (Figura 12).

El procedimiento operativo para la determinación de Clembuterol en muestras de fluidos de bovinos (sue-ro y orina) empleados por el LDDOP se realiza a través de la técnica de ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas), basada en la reacción antígeno-anticuerpo, con el Kit Ridascreen-Biopharm, metodología aceptada por la Secretaría de Salud y SAGARPA a través de sus órganos desconcentrados COFEPRIS y SENASICA. Consiste en general en la separación del suero sanguíneo de la muestra, centrifugación del suero u orina, sensibilización de la placa, colocación de los estándares, controles, blancos y muestras, aplicación del cromógeno y solución de paro y lectura de absorbancia a 450 nm. El Laboratorio para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP) cuenta con una infraestructura física y humana de primer nivel en materia de diagnóstico microbiológico. Está provisto con áreas diseñadas acorde al proceso analítico y con equipos de vanguardia que permiten brindar un servicio de calidad en el análisis microbiológico de las muestras. Las metodologías implementadas por el Laboratorio permiten obtener resultados presuntivos en 36 horas, una mediante la técnica de PCR-RT (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real) y otra ELFA (Ensayo de Fluorescencia Ligado a enzimas), ambas altamente sensibles y específicas (Figura 13).



Figura 11. Registro e identificación de la muestra, preparación y homogenización de la muestra, enriquecimiento de la muestra, extracción de Ácidos Nucleídos del patógeno blanco, ejecución de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o el Ensayo de Fluorescencia Ligado a Enzimas, interpretación de resultados y emisión de resultados presuntivos.



Figura 12. Toma de muestras de fluidos en animales y procesamiento en laboratorio.



Figura 13. Infraestructura y equipo de laboratorios del SENASICA.

base de datos de PulseNet del CDC (Control Disease Center) para determinar el origen y la distribución mundial del patógeno (Figura 14).

Centro nacional de referencia de plaguicidas y contaminantes (CNPYC)

Este centro realiza los servicios de análisis para identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas y contaminantes en alimentos de origen vegetal, con muestras de todos los estados de la República Mexicana con la intención de:

- Coadyuvar en las acciones de vigilancia de la aplicación de sistemas de reducción de riesgos, participando en el análisis de muestras de productos de origen vegetal provenientes de los programas nacionales de monitoreo.
- Satisfacer las necesidades de los usuarios, cumpliendo con las atribuciones y las disposiciones oficiales en la materia.
- Cumplir los requisitos de desempeño técnico en el análisis de residuos de plaguicidas en vegetales establecidos por las autoridades sanitarias de los gobiernos con los que se tienen acuerdos comerciales para la exportación de productos de origen vegetal.
- Coadyuvar a la atención de alertas sanitarias y otras notificaciones sobre embarques originarios de México.

Proceso analítico

Los análisis se llevan a cabo mediante la ejecución de métodos internos basados en el método publicado por la FDA de los Estados Unidos para análisis de plaguicidas PAM (Manual de Análisis de Plaguicidas por sus siglas en inglés)

Por otra parte, los métodos convencionales consisten en utilizar medios selectivos y diferenciales para el aislamiento de la bacteria de interés. Una vez aislada, se procede a la serotipificación mediante la aplicación de sueros somáticos, flagelares y capsulares la cual permite, por aglutinamiento, discriminar la pertenencia de un patógeno a un determinado grupo serológico. Finalmente, en el análisis microbiológico, la implementación de la Técnica de PFGE (Electroforesis de Cam-

pos Pulsados), técnica altamente discriminatoria, estable y reproducible, considerada como el método de elección para la epidemiología molecular de bacterias patógenas, determina la subtipificación molecular (huella genética del patógeno) a través del análisis completo del ácido nucleico de la bacteria con la utilización de enzimas de restricción que digieren el ADN en segmentos y tamaños específicos, generando un patrón único y exclusivo de la bacteria, el cual se compara con la



Figura 14. Métodos convencionales para la detección de patógenos microbiológicos.

que permiten procesar productos con alto contenido de humedad, productos secos y con alto contenido graso para realizar la detección, identificación, confirmación y cuantificación de residuos de plaguicidas de los grupos químicos de organofosforados, organoclorados, organonitrogenados, piretroides y carbamatos. El proceso que sigue de rutina el CNRPyC consta de las siguientes etapas:

Recepción y molienda: En esta etapa se revisan las condiciones de llegada de las muestras y se registra la información que la acompaña, para asegurar la trazabilidad de la misma. En caso de que la muestra no cumpla con las condiciones para el análisis se rechaza y se informa al cliente para considerar la reposición. Con la molienda se reduce el tamaño y se selecciona la porción a analizar. La molienda de la porción analítica nos sirve para homogeneizar la muestra y facilitar la extracción.

Extracción y partición: Se realiza una extracción sólido líquido en la que se va a recuperar la mayor parte posible de plaguicidas de la muestra por solubilidad de éstos en los disolventes orgánicos utilizados. Para este paso se ocupan 50 g de muestra homogénea y en condiciones de



análisis. Una vez realizado el extracto se aplican lavados para eliminar los componentes de la muestra que no son plaguicidas y se eliminan junto con la fase acuosa; esta actividad se realiza mediante agitación manual. En esta etapa se obtiene el extracto final, que debe concentrar-



se para reducir el volumen y maximizar la posibilidad de detección de los plaguicidas recuperados.

Purificación: En caso de observar interferencias en los extractos de las muestras se aplica un proceso de purificación con sales de florisil. Una vez que se tiene el extracto concentrado y, cuando es el caso, purificado, se analiza por métodos cromatográficos para detectar la presencia de algún plaguicida. El primer paso es la búsqueda exhaustiva, ya que el CNRPyC no tiene limitaciones en cuanto al número de plaguicidas que busca; es decir, que va a rastrear cualquier posible plaguicida que se encuentre en el extracto de la muestra hasta tener la certeza de que está o no presente. El CNRPyC puede utilizar el método Quechers para la extracción y detección de posibles plaguicidas, el cual se fundamenta en un principio similar al del PAM, de extracción sólido-líquido, pero con tan solo 15 g de muestra y 15 ml. de solventes. La separación de las fases sólida y líquida es por centrifugación y la inyección es directa en cromatógrafos con detectores de masas. Es importante señalar que no existen los métodos universales para extraer y detectar plaguicidas; en muchas ocasiones se requiere combinar los métodos para asegurar la mejor recuperación y detección posible. Cuando se detecta un candidato a plaguicida se debe confirmar por medio del uso de diferentes tipos de columnas cromatográficas en las que cambia la polaridad de las mismas, lo que modifica el tiempo que un compuesto tarda en pasar a través de ella; si el posible plaguicida se compara con un estándar puro y coincide en los tiempos de permanencia dentro de las diferentes columnas cromatográficas, entonces se confirma;

en caso de que no se pueda hacer por este medio, se utilizan espectrómetros de masas con los que la confirmación se da por pesos atómicos específicos para cada compuesto. La capacidad de detección y cuantificación de plaguicidas con los equipos que cuenta el CNRPyC es del orden de los nanogramos de plaguicida en un kilogramo de muestra, es decir, 0.000000001 gramo por kilogramo.

Confiabilidad de los resultados

La "Asociación de Normalización y Certificación (ANCE) otorgó el certificado en la norma NMX-CC-9001-IM-NC-2008 (ISO-9001 y su equivalente internacional) al Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes. De igual forma, la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) otorgó al Centro otra certificación en la norma NMX-17025. Con esta red de laboratorios SENASICA demuestra que los productos producidos en el país cumplen con todos los estándares de calidad, sanidad e inocuidad, coadyuvando a la seguridad alimentaria y manifestando su responsabilidad con los consumidores.

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

