



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Doctorado en Parasitología Agrícola				
Línea de investigación:	Micotoxinas				
Título del proyecto:	Determinación de hongos toxigénicos en ensilajes y su manejo				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$75,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	x
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	x	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	No	Fondos concurrentes:		
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Guanajuato, Tamaulipas, Jalisco y Aguascalientes	Municipio (s):	Aguascalientes (Aguascalientes, Tepezalá, Rincón de Romos, Jesús María); Jalisco (El Grullo, Lagos de Moreno, Villa Hidalgo, San Juan de los Lagos), Tamaulipas (Ciudad Mante) y Guanajuato (Silao, León, Romita, Irapuato).		
Localidades:	Saltillo, Coahuila				
A realizar durante el(los) año(s):	2017-2019				
Participantes			Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dra. Yisa María Ochoa Fuentes		UAAAN	3948	
Colaborador:	Dr. Ernesto Cerna Chávez		UAAAN	3563	
Colaborador:	Dr. Jerónimo Landeros Flores		UAAAN	1058	
Colaborador:	Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz		CULTA		
Colaborador:	Dr. Teódulo Quezada Tristán		UAA		
Colaborador:					
			Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	Jazmín Janet Velázquez Guerrero		Doctorado	71161432	
Programa Docente:	Doctorado en Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
	Vo. Bo.		Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Dr. Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Determinación de hongos toxigénicas en ensilajes y su manejo

\$100,000

2.- Introducción

En México la producción de cabezas de ganado es de 1 495 818 de los cuales 1 121 057 son rumiantes (SIAP, 2017) en su dieta base encontramos el ensilaje, éste constituye entre un 35 a 50% de la dieta de los rumiantes, el ensilaje es un método de preservación del forraje y su objetivo es la conservación del valor nutritivo del alimento durante el almacenamiento. Uno de los riesgos a lo largo del proceso de elaboración del ensilaje es la contaminación por hongos, los géneros reportados en el ensilaje de maíz son: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis* y *Mucor* (FAO 2003; Shanawany *et al* 2005; Garon *et al* 2006). algunos de estos hongos son precursores de metabolitos secundarios, estos metabolitos son los que enferman y causan la muerte a los animales de producción y se les conocen como micotoxinas (Piva *et al.*, 1995). Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas (Lillehoj, 1991), y su metabolismo es complejo en los rumiantes. la toxicidad se ve reflejada a través de problemas crónicos y pueden conducir a la muerte, lo que se ha reportado con mayor frecuencia es una disminución de la ingesta del alimento y un bajo rendimiento en su producción (Pearson y Dutson, 1994; Zinedine, 2007; Butkeraitis, 2008). Debido a esto, se han desarrollado diferentes estrategias de control para la inhibición de los hongos, entre las que se encuentran las físicas, microbiológicas, naturales y químicas (Huwig *et al.*, 2001), las estrategias de control más frecuentes son las de origen químico o comúnmente llamados secuestrantes, pero se consideran agresivas y peligrosas para los rumiantes (Marinho *et al.*, 2007). Por tal motivo es necesario utilizar nuevas alternativas naturales las cuales no perjudiquen la salud humana y animal (Bravo *et al.*, 2000). Dado a esta situación los compuestos naturales presentes en algunos aceites esenciales y extractos de plantas podrían mostrar acción antifúngica y/o antimicotoxigenica, lográndola utilizar como alternativa en la reducción de la contaminación de los alimentos y piensos.

Objetivos

General:

Determinar la presencia de hongos toxicogénicos en ensilajes y su manejo.

Específicos:

1. Identificar los hongos que se encuentran presentes en los diferentes ensilajes.
2. Determinar la presencia de genes precursores de las micotoxinas en los diferentes aislados.
3. Evaluar extractos vegetales de canela y cítricos, para el control de los hongos.
4. Determinar el efecto de extractos vegetales sobre los genes precursores en la producción de micotoxinas mediante métodos moleculares.

Hipótesis

- Se identificará por lo menos uno de los siguientes hongos: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, en los diferentes tipos de ensilajes.
- Se encontrarán por lo menos una cepa productora de las siguientes micotoxinas: Aflatoxina, Fumonisina, Deoxinivalenol (DON), Zearalenona, Fusarinas, Ácidos fusáricos y Ocratoxina, en los diferentes ensilajes.
- Alguno de los extractos presentará control sobre la inhibición en el crecimiento micelial y esporulación de hongos.
- Por lo menos un extracto vegetal inactivará alguno de los genes aflR, aflD, aflM precursores en la síntesis de las aflatoxinas.

3.-Revisión de Literatura

El ganado de bovino, requiere de raciones con alta densidad de nutrientes para ayudarlo a desarrollar su máximo potencial genético, en forma rápida y eficiente, todo esto depende de la dieta ya que debe de ser balanceadas con granos, minerales, aditivos y forrajes donde uno de los más importantes es el ensilaje de maíz debido a que es un alimento excelente para los rumiantes debido al elevado contenido de energía que aporta el grano, a través del almidón pero al igual tiene una deficiencia de proteína pero puede ser corregido a través de sub-productos. (Oudeelferink y Driehuis, 2001). El ensilaje destinado a la alimentación de los rumiantes son una de las principales fuentes de contaminación con micotoxinas en la cadena alimentaria pero teniendo una buena conservación del ensilaje con un pH que oscile entre 3.7 - 4.2, temperatura 30°C, una humedad fluctuando entre 54.6 - 68.34% y con buenas condiciones de anaerobiosis para inhibir el desarrollo de los principales microorganismos causantes del deterioro de los alimentos se puede tener un excelente forraje (Oudeelferink y Driehuis, 2001; Reyes *et al.*, 2008). La contaminación del alimento se produce durante todo el proceso previo, durante o posterior a la cosecha, ya que los forrajes están en contacto directo con esporas de los hongos (Carrillo, 2003). El crecimiento de hongos está influenciado por varios parámetros físico-químicos como la actividad de agua (aw), la temperatura, la presencia de oxígeno, la naturaleza del sustrato y el pH (Oudeelferink y Driehuis, 2001). Otros factores como roedores, pájaros e insectos participan en el proceso de contaminación al causar lesiones físicas en el tejido vegetal promoviendo la penetración de las esporas (Scudamore y Livesey, 1998). El grano de maíz puede contener altas concentraciones de hongos que tienen un efecto negativo para el ganado dependiendo de las condiciones climáticas durante la estación de crecimiento y cosecha (Santin, 2005). La mayoría de los hongos contaminantes de alimentos crecen en los cereales, produciendo sus toxinas cuando las condiciones de humedad y nutrientes son favorables por esta razón se estima que entre el 25 y 40% de los cereales pueden estar contaminados con alguna o varias micotoxinas (Pittet, 1998). Las micotoxinas son productos altamente tóxicos generados del metabolismo secundario de algunos hongos, principalmente pertenecientes a *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp., sin embargo, cada género presenta condiciones particulares diferentes (Baath *et al.*, 1990; Samson *et al.*, 1995; USDA, 1999; FAO, 2003); el *Fusarium acuminatum* produce las micotoxinas T-2, HT-2, moniliformina (MON) (Soriano, 2007), zearalenona (ZEA), clamidosporol (HM-8) Neosolaniol (NEO) (Bottalico y Perrone, 2002). La ingesta de las toxinas T-2 y HT-2 producen lesiones orales y lenguas negras en aves por la necrosis de tejidos, hemorragias internas, disminución de peso y efectos neurotóxicos, en otros animales de experimentación se ha demostrado un efecto inmunosupresor grave (Soriano, 2007); La aflatoxina B1 (AFB1) es una de las micotoxinas más importantes. De hecho, se ha demostrado que una exposición a largo plazo a esta toxina provoca cáncer de hígado y depresión del sistema inmunitario (Warburton y Williams 2014) que conduce a la clasificación de AFB1 en el grupo 1 "carcinógenos" por el Organismo Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Marin *et al.*, 2013). Esta micotoxina es producida por varias especies del género *Aspergillus* de la sección *Flavus*. Su producción se produce en un grupo de genes de 70 kB con al menos 21 pasos enzimáticos para su formación a partir de moléculas de acetato (D Bhatnagar, Ehrlich y Cleveland 2003).

Ubicación del experimento.

La recolección del ensilaje se realizará en cuatro estados de la república mexicana que son: Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Tamaulipas.

Muestras

Se muestrearán cuatro lugares de cada estado donde se tenga ensilaje de maíz, sorgo, cebada y avena, se utilizará la técnica "W" donde en cada uno de los puntos se tomará un kilogramo de peso, haciendo un homogenizado y extrayendo un kilogramo en cada uno de los ensilajes.

Aislamiento del hongo

El ensilaje se cortará en trozos y se desinfectará en una solución de hipoclorito sodio al 1% durante 3 minutos, enjuagándolos con agua destilada estéril, dejándola secar, después se sembrará en cajas petri con medio PDA, adicionado con estreptomina (100ppm).

Identificación de género.

Se realizarán las preparaciones tomando porciones de micelio con esporas; las cuales se observarán al microscopio y serán identificados en base a las claves de Barnett y Hunter (1998) para género. A partir del crecimiento fúngico se hará Identificación molecular.

Identificación molecular.

Se raspará el micelio de *Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, de una caja de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar. La extracción de ADN se realizará por el método Doyle y Doyle modificado por Vázquez (1990). Posteriormente se amplificará mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S- 5.8S y 5.8S-28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1/ITS4. Las condiciones de la reacción de PCR serán las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57°C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72°C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. La amplificación se visualizará en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificará con el kit de purificación de bandas de In vitro gen (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), los pares de base obtenidos se compararán con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov), a partir de esta técnica se obtendrán las relaciones filogenéticas entre especies.

Para identificación de genes precursores de micotoxinas

Se raspará el micelio de *Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, de una caja de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar. La extracción de ADN se realizará por el método Doyle y Doyle modificado por Vázquez (1990). Posteriormente se amplificará mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas FUB1, PKS 4, FUM1, TRI5 / TRI8, OTA, **afIR**, Nor (*afID*), Ver (*afIM*), FUSA. utilizando el par de iniciadores de secuencia P6F / P6LFI, P6RFI / P6RF, F1 / R1, FUM1F / FUM1R, Fum1F1/ Fum1R2, TOX5-1 / TOX5-2, TRI8F / TRI8R, AoOta-L / AoOta-R, AoLC35-12L/ AoLC35-12R, **afIR1-F** / **afIR1-R**, nor1 / nor2, ver1/ ver2, 878 / 879. Las condiciones de la reacción de PCR serán las

siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57°C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72°C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. La amplificación se visualizará en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificará con el kit de purificación de bandas de *In vitro* gen (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), los pares de base obtenidos se compararán con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov), a partir de esta técnica se obtendrán las relaciones filogenéticas entre especies.

Producción de micotoxinas *in vitro*. Para evaluar la producción de micotoxinas *in vitro* de los diferentes aislados. Los cultivos serán desarrollados en tres repeticiones y serán inoculados 100 g de granos de maíz estériles en matraces Erlenmeyer de 50 ml de capacidad ajustando la humedad al 45 %. Serán inoculados con 2 ml de una suspensión de esporas a una concentración de 10⁷ esporas/ml. Posteriormente a 4 semanas de incubación a 25 °C en obscuridad, los cultivos serán cosechados y secados a 60 °C por 48 h, consecutivamente serán molidos y almacenados a 4 °C hasta su análisis. Se empleará un control el cual no será inoculado.

Medio de cultivo envenenado

Se evaluarán dos extractos vegetales uno de canela y otro de cítricos, sobre los hongos que se encuentren en los diferentes cultivos. Utilizando la metodología de medio de cultivo envenenado, usando las siguientes dosis: canela: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm; cítricos 1,600, 2,000, 2,400, 2,800, 3,200ppm, para la obtención de las dosis se tomaron como referencia un estudio de Ochoa *et al.* 2010. Cuando se obtengan los medios de cultivo a las diferentes concentraciones se colocarán explantes de 0,5 cm de diámetro de los fitopatógenos evaluados, la toma de datos se realizara cada 24 h donde se registrara el crecimiento de cada colonia (diámetro), se incubarán a 25 °C ± 2 en la oscuridad hasta que el crecimiento del micelio de la caja testigo (PDA sin extracto) alcance el tamaño de la placa. El diámetro del crecimiento del micelio se medirá diariamente con un vernier. El porcentaje de inhibición de crecimiento se determinará de la siguiente manera: % inhibición = crecimiento micelial del testigo - crecimiento micelial del tratamiento / crecimiento micelial del testigo x 100. Pasando los 9 días después de la inoculación, se contabilizará el número de esporas en los diferentes tratamientos evaluados utilizando una cámara de Neubauer y los que obtengan mayor porcentaje de inhibición se aplicara a ensilajes en campo utilizando la técnica de Galina et al, 2008.

Y se revisara en laboratorio los efectos de los extractos en la expresión génica donde se evaluara por medios de kits de extracción de ARN y se amplificara en RT-PCR SuperScript® One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de la marca Axigen y se corroborara en gel de agarosa.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Revisión de Literatura	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Presentación de Avances del Proyecto						X						
Recolecta de muestras	x	X										
Análisis de muestras	x	x	X									
Análisis de resultados	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Identificación Molecular			x	x	x	x	x	x	x	X	x	x
Identificación de genes precursores de micotoxinas						x	x	x	x	x	x	x
1er Artículo enviado					x							

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Reactivos para laboratorio			x		x	x			x	x		
Secuenciación											x	x
muestreo	x	x	X						x	x	x	
Viáticos	x	x	x						x	x	X	
Gasolina	x	x	x						x	x	x	

Duración total del proyecto

Año de Inicio	Enero 2017	Año estimado de conclusión	Diciembre 2019
---------------	------------	----------------------------	----------------

5.-Productos Esperados

2 artículos científicos.

Participación de 2 congresos nacionales e internacionales.

Tesis y obtención de grado en Doctor en ciencias en parasitología agrícola.

6.-Literatura Citada

Baath, H., P.O. Knabe, P. Lepom.. Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in corn silage. 5- *Fusarium* infestation in corn silage. Arch Tierernahr. 40(4) 397-405. 1990.

Bhatnagar, D, K C Ehrlich, and T E Cleveland. 2003. "Molecular Genetic Analysis and Regulation of Aflatoxin Biosynthesis." Applied Microbiology and Biotechnology 61 (2): 83-93.

Carrillo, L., 2003 Mohos y Micotoxinas. J. Agric Food Chem 1-24.

FAO. 2003. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003.

Galina, M. A. Ortiz-Rubio, M. A. Guerrero, M. Mondragón, D. F. Franco, N. J. y Elías, A. Efecto de un ensilado de maíz solo o inoculado con un probiótico láctico y adicionado con un suplemento nitrogenado de lento consumo en ovinos, avances de proyecto 2008.

Marin, S., A.J. Ramos, G. Cano-Sancho, and V. Sanchis. 2013. "Mycotoxins: Occurrence, Toxicology, and Exposure Assessment." Food and Chemical Toxicology 60. Elsevier Ltd: 218-37. doi:10.1016/j.fct.2013.07.047.

Oudeelferink, Driehuis, 2001. Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Electronic conference on Tropical silage.

Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. Rev Med Vet (149): 479-492.

Reyes, W.P., P. C. Jiménez., F. Rojo., C. Juárez Woo., (2006) Evaluación de la calidad nutricional y contaminación por Hongos y micotoxinas en el ensilado destinado al consumo animal. 2006 XVII

Samson, R.A., E.S Hoekstra, C.. Frisvad, Introduction to Food Borne Fungi. Fourth edition, Central bureau Voor Schimmelculture Baarn, The Netherlands. Printed by Ponsen & Looyen, Wageningen, Netherland. 1995

Santin, E. 2005. Mould growth and mycotoxin production. The Mycotoxin Blue Book. Nottingham University Press. Duarte Díaz Eds. pp. 225-34.

Scudamore, K.A., C.T., Livesey, 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J Sci Food Agr* (77) 1-17

Soriano del Castillo José Miguel "MICOTOXINAS EN ALIMENTOS" Ediciones Días de Santos 2007

USDA 1999 (United States Department of agriculture). Grain fungal diseases and mycotoxins reference. GIPSA, Technical Services Division 10383 N. Executive Hills Blvd. Kansas City Mo64153.

Warburton, Marilyn L, and W Paul Williams. 2014.
"Aflatoxin Resistance in Maize: What Have We Learned Lately?" *Advances in Botany*, 1-10.