

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**EFFECTO DE LOS REGULADORES DEL
CRECIMIENTO Y OTROS COMPUESTOS DEL
MAIZ SOBRE EL CRECIMIENTO, LA
DIFERENCIACION Y LA SINTESIS DE
MICOTOXINAS EN *Aspergillus***

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A :

CARLOS MANUEL BUCIO VILLALOBOS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DE 2002

TD
SB608
.M2
B8
2002
c.1



1080124461

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**EFEECTO DE LOS REGULADORES DEL
CRECIMIENTO Y OTROS COMPUESTOS DEL
MAIZ SOBRE EL CRECIMIENTO, LA
DIFERENCIACION Y LA SINTESIS DE
MICOTOXINAS EN *Aspergillus***

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A :

CARLOS MANUEL BUCIO VILLALOBOS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

DICIEMBRE DE 2002

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. DICIEMBRE DE 2002

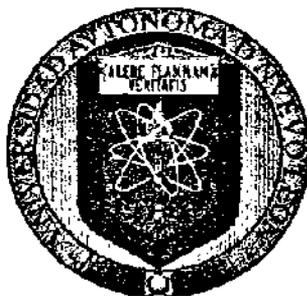


TD
SB608
-M2
B8
2002



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO
Y OTROS COMPUESTOS DEL MAIZ SOBRE EL
CRECIMIENTO, LA DIFERENCIACIÓN Y LA SINTESIS
DE MICOTOXINAS EN *Aspergillus***

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

CARLOS MANUEL BUCIO VILLALOBOS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

DICIEMBRE DE 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología



Efecto de los reguladores del crecimiento y otros compuestos del maíz sobre el crecimiento, la diferenciación y la síntesis de micotoxinas en *Aspergillus*

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Presenta

Carlos Manuel Bucio Villalobos

Comisión de tesis

Presidente: Dr. Hugo A. Luna Olvera
(asesor interno)

Secretario: Dra. Katiushka Arévalo Niño

Primer Vocal: Dr. Luis J. Galán Wong

Segundo Vocal: Dra. Lilia H. Morales Ramos

Tercer Vocal: Dr. Carlos E. Hernández Luna

Asesor externo: Dra. Doralinda Guzmán de Peña

Asesor externo: Dr. Juan José Peña Cabriales

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. HUGO A. LUNA OLVERA Y LA DRA. DORALINDA GUZMÁN
DE PEÑA.**

**LA PARTE EXPERIMENTAL SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS
DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y DEL SUELO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UANL Y DE MICOTOXINAS DEL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA
UNIDAD IRAPUATO DEL CINVESTAV.**

CONTENIDO

Dedicatoria	i
Agradecimientos	iii
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vi
Lista de abreviaturas	x
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
II.1. Hipótesis	4
II.2. <i>Objetivos</i>	4
II.2.1. Objetivo general	4
II.2.2. Objetivos específicos	4
III. ANTECEDENTES	5
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
IV.1. Experimentos con medios sintéticos	13
IV.1.1. Cepas utilizadas	13
IV.1.2. Medios de cultivo	14
IV.1.3. Obtención de inóculo	16
IV.1.4. Condiciones de incubación	17
IV.1.5. Reguladores de crecimiento	17
IV.1.6. Extractos y tejidos vegetales	18
IV.1.7. Parámetros evaluados	20

IV.2. Experimento <i>in vitro</i> utilizando granos de maíz	21
IV.3. Diseño experimental y análisis estadístico	22
BIOLOGÍA MOLECULAR	22
IV.4. Expresión del gen <i>fbA</i>	22
IV.4.1. extracción de RNA	23
IV.4.2. Northern blot	23
IV.4.3. Obtención del fragmento <i>fbA</i>	24
IV.4.4. Marcaje radioactivo del fragmento <i>fbA</i>	25
IV.4.5. Hibridación	25
TÉCNICA DE RT-PCR	26
IV.4.6. Obtención del cDNA	26
V. RESULTADOS	27
V.1. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> y <i>A. parasiticus</i> en medios sintéticos	27
V.1.1. Experimentos con <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC-26	27
V.1.2. Experimentos con <i>Aspergillus parasiticus</i>	40
V.1.2.1. Experimentos con <i>Aspergillus parasiticus</i> Ap ³⁻⁵	40
V.1.2.2. Experimentos con <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992	43
V.2. Efecto <i>in vitro</i> del Ácido Naftalenacético en granos de maíz inoculados con <i>Aspergillus parasiticus</i>	50
V.3. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre la expresión del gen <i>fbA</i> de <i>Aspergillus parasiticus</i>	52
V.4. Efecto de los extractos y tejidos de maíz sobre <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> y <i>A. parasiticus</i> en medios sintéticos	53

V.4.1. Experimentos con <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC-26	53
V.4.2. Experimentos con <i>Aspergillus parasiticus</i> Ap ³⁻⁵	61
V.4.3. Experimentos con <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992	64
VI. DISCUSIÓN	68
VI.1. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>A. parasiticus</i> en medios sintéticos	68
VI.2. Efecto <i>in vitro</i> de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético en granos de maíz inoculados con <i>Aspergillus parasiticus</i>	74
VI.3. Efecto de los tejidos y extractos de maíz sobre <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>A. parasiticus</i> en medios sintéticos	74
VI.4. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético en la expresión del gen <i>flbA</i> de <i>Aspergillus parasiticus</i>	76
VII. CONCLUSIONES	78
VIII. LITERATURA REVISADA	80
APÉNDICE A	90

A LA MEMORIA DE “MI TÍO EL PADRE”, JOSE BUENAVENTURA BUCIO RÁBAGO, QUIEN CON SU CONSTANTE ESPÍRITU DE AYUDA AL PRÓJIMO, REALIZÓ ACCIONES DE BIEN PARA CON SU FAMILIA; GRACIAS A ELLO YO ESTOY AQUÍ.

DEDICATORIA:

A ANDREA, POR HABER LLEGADO AL MUNDO EN LOS MOMENTOS DE MÁS INTENSO TRABAJO Y CEDER, INCONCIENEMENTE, SU TIEMPO PARA QUE YO LO DEDICARA A MI TESIS. IGUAL RECONOCIMIENTO A CARLOS EDUARDO, ANA LAURA Y MARIA ELENA.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

Un especial agradecimiento a la Dra. Doralinda Guzmán de Peña, por haberme sugerido y asesorado en todo momento en la parte experimental de esta tesis. Agradezco su tiempo y consejos para los diferentes documentos que de aquí se derivaron, así como el haberme permitido usar incondicionalmente su laboratorio.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera, por haber aceptado ser mi asesor interno y apoyarme desinteresadamente en todos los aspectos de mi doctorado. Su ayuda fue de gran valía para mí. Muchas gracias.

Al Dr. Juan José Peña Cabriales, a quién le reitero mi más profundo agradecimiento por haberme abierto las puertas para trabajar en CINVESTAV en 1996. Gracias a ello ahora estoy culminando estudios de doctorado.

A mis compañeros del Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Tomas, Juan, Josefina. Gracias por su amistad.

Igualmente agradezco las atenciones de mis compañeros del Laboratorio de Micotoxinas del CINVESTAV-Irapuato, Maricela, Laura, Gloria Laura, Gloria Godoy, Rosa, Pavel.

Al Dr. Luis Galan Wong, la Dra. Katiushka Arévalo Niño, la Dra. Lilia Morales Ramos y el Dr. Carlos Hernández Luna, por sus sugerencias en la revisión del presente trabajo, así como por haber aceptado ser parte de los integrantes de la Comisión de Tesis.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:

A la Universidad de Guanajuato, por haberme otorgado el permiso y apoyo económico para realizar mis estudios doctorales.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haber sido la Institución que directamente me formó hasta la obtención del grado de Doctor.

Al CONACYT y al PROMEP, por la beca que me fue otorgada, gracias a la cual logré sostener mis estudios.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión del gen *fbA* de *Aspergillus parasiticus* cultivado en presencia y ausencia del Ácido Naftalenacético (ANA) 50 mM, utilizando la técnica de RT-PCR.

54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reguladores de crecimiento vegetal utilizados.	18
Tabla 2. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	28
Tabla 3. Efecto de dos concentraciones de Ácido Giberélico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	29
Tabla 4. Efecto de dos concentraciones de Ácido Giberélico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	29
Tabla 5. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Giberélico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	30
Tabla 6. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Giberélico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	30
Tabla 7. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	31
Tabla 8. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	32
Tabla 9. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido Indolacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	32
Tabla 10. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolbutírico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	33
Tabla 11. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolbutírico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	34
Tabla 12. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Indolbutírico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	34
Tabla 13. Efecto del Ácido Jasmónico sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	35
Tabla 14. Efecto de dos concentraciones de Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	37

Tabla 15. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	37
Tabla 16. Efecto de dos concentraciones de Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	38
Tabla 17. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	38
Tabla 18. Efecto de la forma pura y como sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	39
Tabla 19. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	39
Tabla 20. Efecto de dos concentraciones de Ácido Giberélico sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (Ap ³⁻⁵) en medio sintético.	40
Tabla 21. Efecto de dos concentraciones de Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (Ap ³⁻⁵) en medio sintético.	42
Tabla 22. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (Ap ³⁻⁵) en medio sintético.	42
Tabla 23. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (Ap ³⁻⁵) en medio sintético.	43
Tabla 24. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	44
Tabla 25. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	44
Tabla 26. Efecto de dos concentraciones del Ácido Giberélico sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	45
Tabla 27. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Indolbutírico sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	46

Tabla 28. Efecto de dos concentraciones del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético (6 días de incubación).	47
Tabla 29. Efecto de dos concentraciones del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético (5 días de incubación).	48
Tabla 30. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	48
Tabla 31. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	49
Tabla 32. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	49
Tabla 33. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	50
Tabla 34. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético (ANA) sobre la esporulación y síntesis de aflatoxinas de la cepa <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992 inoculada en granos de maíz.	51
Tabla 35. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético (ANA) sobre la esporulación y síntesis de aflatoxinas de la cepa <i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 16992 inoculada en granos de maíz.	52
Tabla 36. Efecto de diferentes tejidos de maíz sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	55
Tabla 37. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	56
Tabla 38. Efecto del extracto etanólico de elote de maíz sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	57
Tabla 39. Efecto del extracto etanólico de brácteas de maíz sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	57
Tabla 40. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido en agua sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	59

Tabla 41. Efecto de los extractos etanólicos de estigmas y elote de maíz, evaporados y resuspendidos en agua sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	59
Tabla 42. Efecto de los extractos etanólicos de elote y brácteas de maíz, evaporados y resuspendidos en agua sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	60
Tabla 43. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en etanol sobre <i>Aspergillus nidulans</i> (FGSC 26) en medio sintético.	61
Tabla 44. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> Ap ³⁻⁵ en medio sintético.	62
Tabla 45. Efecto de los extractos etanólicos de elote y brácteas de maíz, evaporados y resuspendidos en agua sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> Ap ³⁻⁵ en medio sintético.	63
Tabla 46. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido en agua sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	65
Tabla 47. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido en agua sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	65
Tabla 48. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en etanol sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	67
Tabla 49. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en etanol sobre <i>Aspergillus parasiticus</i> (ATCC 16992) en medio sintético.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
µg	Microgramos
µl	Microlitros
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
³² P	Fósforo 32
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
AG ₃	Ácido Giberélico
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenacético
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CINVESTAV	Centro de Investigación y Estudios Avanzados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>et al</i>	Y otros
flbA	Gen regulatorio involucrado en el balance entre crecimiento, esporulación y síntesis de micotoxinas
fmol/planta	Ficomoles por planta
g	Gramos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
K	Potasio
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
log	Logaritmo base 10
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Militros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
N	Normal
Na	Sodio
ng	Nanogramos
°C	Grados Celsius
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
RNA, ARN	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Transcriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de estudiar si en la relación *Aspergillus*-maíz-aflatoxina existen compuestos presentes en la planta que pudieran actuar como señales para activar los genes involucrados en la cascada de síntesis de aflatoxina. Diez reguladores de crecimiento vegetal y extractos y tejidos de estigmas, elote y brácteas florales del híbrido de maíz A-791 fueron adicionados a medios de cultivo sintéticos y se evaluó su efecto sobre el crecimiento, la esporulación y la síntesis de micotoxinas en *Aspergillus parasiticus* (cepas Ap³⁻⁵ y ATCC 16992) y *A. nidulans* (cepa FGSC-26) como modelo fúngico. El Ácido Naftalenacético (ANA) fue el regulador de crecimiento que se destacó por su efecto inhibitorio sobre los tres parámetros evaluados, a partir de la concentración de 0.5 mM; a concentraciones altas (50 mM) la esporulación de *A. parasiticus* ATCC 16992 se vio estimulada. El efecto de ANA también se evaluó en granos de maíz, donde la cantidad de esporas y la producción de aflatoxinas fueron altas en el control, pero cuando se adicionó ANA 50 mM ambos procesos se redujeron considerablemente. Los Tejidos de estigmas, elote y brácteas florales de maíz resultaron estimulatorios en el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina de *A. nidulans*. Los extractos acuosos de estigmas de maíz también estimularon dichos procesos fisiológicos en ambas especies de *Aspergillus*. En contraste, los extractos etanólicos al 4 % inhibieron el crecimiento y desarrollo de *A. nidulans* pero este resultado podría explicarse por el efecto del etanol en que dichos extractos fueron disueltos. También se evaluó el efecto del ANA en la expresión del gen *flbA* involucrado en la síntesis de aflatoxina de *A. parasiticus*, encontrando que la concentración de 50 mM inhibió dicho gen después de 48 horas de incubación.

I. INTRODUCCION

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* son hongos que se desarrollan sobre una gran variedad de sustratos donde pueden producir aflatoxinas. Estos compuestos son extremadamente tóxicos además de poder reaccionar con DNA humano y animal y formar aductos que posteriormente originan cáncer en ciertas especies animales (Wang y Groopman, 1999). La carcinogénesis producida por las aflatoxinas en humanos es menos clara, pero se ha correlacionado positivamente con el consumo de alimentos contaminados en algunas partes del mundo (Kraybill and Shapiro, 1969; Krogh, 1977).

La contaminación de granos con aflatoxinas fue considerada un problema de almacén durante los primeros años después de su descubrimiento al inicio de los 70's, y fue posteriormente que se descubrió que dicha contaminación podía darse desde que las plantas se encontraban en el campo (Windstrom, 1992). Este hecho determinó que se iniciaran una serie de investigaciones acerca de la relación hongo-planta que dieran información de cómo *Aspergillus* podía modificar su capacidad de síntesis de aflatoxinas en función de su interacción con su hospedante.

La interacción entre organismos implica mecanismos de reconocimiento entre ellos. En las interacciones entre microorganismos y sus plantas hospederas, uno de los mecanismos de reconocimiento que puede existir es el intercambio de señales moleculares. Como consecuencia de estas señales moleculares ocurre la expresión de los genes necesarios para producir una respuesta bioquímica, morfológica o fisiológica a favor o en contra de la interacción (Halverson y Stacey, 1986).

En el caso de la relación *Aspergillus flavus*-maíz-síntesis de aflatoxinas, no se ha demostrado que exista algún tipo de señal entre los organismos involucrados a pesar de que se ha demostrado que la penetración de *A. flavus* en las mazorcas del maíz en el

campo ocurre exclusivamente cuando los estigmas están en un estado fisiológico posterior a la polinización (Marsh y Payne, 1984a; Marsh y Payne, 1984b), de tal manera que existe la posibilidad de que las condiciones hormonales o de otros compuestos del maíz en ese momento sean muy exclusivas y determinantes para que la cascada de señales entre hongo y planta ocurran dando como consecuencia la colonización del hongo y la síntesis de aflatoxinas.

Para tratar de entender el sistema *Aspergillus*-maíz-aflatoxina se realizaron estudios *in vitro* con *A. parasiticus* y *A. nidulans* como modelo fúngico, en los cuales se utilizaron diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal y extractos de tejidos de maíz adicionados a medios de cultivo sintéticos, y se evaluó el efecto fisiológico sobre dichos hongos, así como la expresión del gen regulatorio *flbA* de la síntesis de aflatoxina.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. Hipótesis.

Los genes involucrados en crecimiento, diferenciación y síntesis de micotoxinas en *Aspergilli* podrían activarse o silenciarse por la acción de los reguladores de crecimiento u otros compuestos presentes en el maíz.

II.2. Objetivos.

II.2.1. Objetivo general.

Determinar si algún regulador de crecimiento vegetal del maíz afecta crecimiento, diferenciación o síntesis de micotoxinas en *Aspergillus parasiticus* y *A. nidulans*.

II.2.2. Objetivos específicos.

A) Evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre el crecimiento, la esporulación y la síntesis de micotoxinas en *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus*.

B) Evaluar el efecto de tejidos y extractos de estigmas, elote y brácteas florales del maíz sobre el crecimiento, la esporulación y la síntesis de micotoxinas en *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus*.

C) Evaluar la expresión del gen regulador *flbA* de *A. parasiticus* cuando el hongo es cultivado en ausencia o presencia de un regulador de crecimiento vegetal.

III. ANTECEDENTES

Uno de los mecanismos de reconocimiento que puede existir en la interacción entre hongos y sus plantas hospederas, es el intercambio de señales, lo cual implica la producción de una señal molecular (que puede ser ADN, ARN, proteínas, lípidos o polisacáridos) por parte de un organismo emisor, y el reconocimiento de la misma por parte de un organismo receptor. Como consecuencia de estas señales moleculares ocurre la expresión de los genes necesarios para producir una respuesta bioquímica, morfológica o fisiológica a favor o en contra de la interacción (Halverson y Stacey, 1986).

Existen ejemplos documentados acerca de la producción de señales moleculares en la interacción de microorganismos patógenos y sus plantas hospederas, en donde el reconocimiento inicial de dichas señales es considerada clave esencial para la inducción de defensa de las plantas en respuesta al ataque de patógenos (Toshikazu, 2001). Tales son los casos de las Endopoligalacturonasas producidas por *Rhizopus stolonifer*, las cuales actúan como señales moleculares para activar mecanismos bioquímicos de defensa en plántulas de frijol (Walker-Simmons et al, 1984), o la producción de fitoalexinas en plantas de soya como respuesta al ataque del hongo *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* y en donde la señal molecular fue identificada como Hepta- β -Glucósido Alditol (Sharp et al, 1984).

También se ha reportado una respuesta defensiva contra el ataque de *Phytophthora infestans* en plantas de papa y tomate cuando éstas fueron asperjadas con el Ácido Jasmónico o su ester metilado, sustancias que actuaron como señales en dichas plantas en respuesta a la infección del hongo. Seis días después de haber asperjado plantas de tomate con estos jasmonatos, se encontraron cuatro nuevas proteínas de naturaleza no descrita, dos por debajo de 14 kDa (probablemente inhibidoras de proteínasa), una de

aproximadamente 24 kDa y otra de 29-30 kDa (Cohen *et al*, 1993). El Ácido Jasmónico y su ester metilado también actúan como señal química en los hongos durante la germinación de los esporangios de *Phytophthora infestans* tanto *in vitro* como sobre las plantas de papa (Cohen *et al*, 1993).

Otro caso es el de las plantas de tomate en las cuales, en heridas causadas por insectos o por daño mecánico, se libera la Sistemina (polipéptido de 18 aminoácidos) la cual regula la activación de cerca de 20 genes defensivos cuyos productos inhiben las proteasas de los insectos. La Sistemina se forma a partir de un precursor proteico llamado Prosistemina que se encuentra en niveles bajos en hojas de plantas no dañadas, los cuales aumentan varias veces en respuesta a dichas heridas. Se ha demostrado que la Sistemina es un compuesto químico presente en las heridas que juega un papel central en la regulación de la expresión de los genes de defensa y que actúa a niveles extraordinariamente bajos (i.e. fmol/planta). La interacción de la sistemina con su receptor regula una compleja cascada de eventos intracelulares los cuales tienen como consecuencia la conversión de las Oxipilinas y el Ácido Jasmónico, sustancias que activan la transcripción de los genes relacionados con la defensa (Ryan, 2000).

Otro ejemplo de señalamiento en plantas lo constituyen las hormonas vegetales, las cuales actúan como señales químicas para la expresión de diversos genes en los tejidos de la planta donde se encuentran (Davies, 1995; Guilfoyle *et al*, 1998). Las Auxinas actúan a niveles celulares regulando o modulando la expresión de genes responsables de la extensión y división celular, los tropismos, la diferenciación vascular, la dominancia apical y la formación de raíces (Guilfoyle *et al*, 1998; Hagen, 1995); algunos de estos procesos fisiológicos se han visto modificados como consecuencia de incrementos transcripcionales de los genes respectivos, después de la aplicación de auxinas a concentraciones tan bajas como 10^{-8} M y en tiempos hasta de 5 minutos (Hagen y Guilfoyle, 1985). Las tasas de

transcripción de genes también se han visto incrementadas con otros tipos de hormonas, como es el caso de las Giberelinas las cuales inducen incrementos considerables en la transcripción de genes de α -amilasa (Libbenga y Mennes, 1995).

Las hormonas en las plantas son compuestos orgánicos distribuidos en todas sus partes y que influyen sobre los procesos fisiológicos a bajas concentraciones (Davies, 1995). Al igual que en otros vegetales, existen diversas auxinas en plantas de maíz, tales como los Ácidos Indolacético, 2, 4-Diclorofenoxiacético, Indolbutírico, Naftalenacético y 2, 4, 5-Triclorofenoxiacético (Felle *et al*, 1991; Wright *et al*, 1991). De éstas, la principal es el Ácido Indolacético (Bandurski *et al*, 1995), el cual se ha encontrado presente en diversas partes de la planta entre las que se mencionan los granos (Haagen-Smit *et al*, 1942). La Zeatina es también una Citocinina aislada de granos de maíz (Letham, 1963; Letham y Miller, 1965). Otras hormonas reportadas en semillas de maíz en desarrollo, en reposo o en germinación han sido el Ácido Abscísico, las Giberelinas y las Citocininas (Davies, 1995; Fong *et al*, 1983; Wright *et al*, 1991).

Se ha demostrado que en la interacción *Aspergillus flavus*-maíz la penetración del hongo en las mazorcas del maíz ocurre exclusivamente cuando los estigmas han sido polinizados y se encuentran en vías de senescencia, tomándose de un color café-amarilloso (Marsh y Payne, 1984a; Marsh y Payne, 1984b). La germinación de los conidios de *A. flavus* ocurre frecuentemente cerca de los granos de polen depositados sobre los estigmas, donde incluso llegan a producir numerosos conidióforos, y posteriormente las hifas crecen rápidamente a través de los estigmas de donde pasan a los granos (Marsh y Payne, 1984a). De tal manera que existe la posibilidad de que las condiciones hormonales del maíz en ese momento sean muy exclusivas y determinantes para que ocurra la señalización entre ambos organismos.

Una vez en el grano *A. flavus* también presenta predilección para colonizar preferentemente ciertas partes de éste. Fennell *et al* (1973) encontraron que *A. flavus* esporuló con mayor frecuencia en el embrión de las semillas de maíz (68 %) que en el endospermo (12 %).

Los tejidos del maíz que preferentemente son colonizados por *A. flavus*, contienen sustancias que son utilizadas por el hongo para sus diferentes procesos fisiológicos. Algunas de estas sustancias le pueden servir al hongo como nutrientes, pero otras podrían actuar como señales químicas para la activación de diversos genes de *Aspergillus*. El polen contiene sustancias ricas en carbohidratos, aminoácidos y minerales (Linskens y Pfahler, 1973; Pfahler y Linskens, 1971; Pfahler y Linskens, 1974) las cuales actúan como excelentes substratos para *A. flavus*, incluyendo una abundante y rápida esporulación (Marsh y Payne, 1984a).

Contrariamente, otros compuestos presentes en el polen pueden actuar como inhibidores de procesos metabólicos de los hongos. Los flavonoides son compuestos específicos de las plantas requeridos para la germinación y crecimiento del tubo germinativo de los granos de polen del maíz y otras plantas (Deboo *et al*, 1995; Guyon *et al*, 2000), algunos de los cuales han sido reportados como inhibidores de la síntesis de aflatoxina en *A. flavus* (Mallozzi *et al*, 1996; Norton, 1999). Estos compuestos también están presentes en granos maduros y plántulas de maíz (Norton, 1999; Taylor y Briggs, 1990), y se ha reportado que funcionan además como señales en algunas interacciones planta-microorganismos, incluyendo la defensa de las plantas contra los fitopatógenos (Koes *et al*, 1984).

El uso de compuestos presentes en maíz y otras muchas plantas ha sido uno de los métodos propuestos para el control de especies toxigénicas de *Aspergillus*, buscando en ellos algún efecto inhibitorio de su crecimiento, esporulación o síntesis de aflatoxinas.

Desde los años siguientes al descubrimiento de las aflatoxinas, diversos investigadores realizaron búsquedas de compuestos que inhibieran dichos procesos en los hongos productores (Sinha, 1985; Zaika y Buchanan, 1987). Se han realizado trabajos buscando proteínas u otros compuestos de maíz que inhiban el crecimiento o síntesis de aflatoxinas de *A. flavus* (Neucere y Zeringue, 1987; Khai-Huynh *et al*, 1992).

Otro tipo de proteínas (llamadas RIPs) que pueden tener funciones de defensa en las plantas, son aquellas que actúan modificando el rRNA lo que provoca que éste no pueda ser reconocido por los ribosomas; consecuencia de esto, se bloquea irreversiblemente la síntesis de proteínas por parte de dichos organelos (Hartley *et al*, 1996; Stripe *et al*, 1992). Las proteínas RIPs están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y son activas contra los ribosomas de diferentes especies. Se han encontrado proteínas RIPs en semillas de maíz con una alta actividad contra ribosomas no provenientes de plantas (Soave *et al*, 1981), lo que sugiere que su función es proteger el maíz contra el ataque de hongos u otros organismos (Dowd *et al*, 1998). Nielsen *et al* (2001) demostraron que proteínas RIPs provenientes de maíz alteraron el crecimiento y la morfología de *A. flavus* y *A. nidulans*, lo que las coloca como potenciales agentes antifúngicos.

En otros cultivos productores de aceites existe la enzima lipoxigenasa, la cual en condiciones de estrés de la planta es capaz de oxidar los ácidos linoléico y linolénico (Gardner, 1995). Varios estudios han sugerido que los metabolitos generados de dicha oxidación pueden alterar la producción de micotoxinas en *Aspergillus*. Burow *et al* (1997) encontraron que el Ácido 13S-Hidroperoxilinoléico disminuyó la producción de aflatoxina cuando se agregó al medio de cultivo a intervalos de 24 horas; en cambio, el Ácido 9S-Hidroperoxilinoléico no inhibió dicho proceso, pero alargó el tiempo en que la aflatoxina fue detectada. Estos resultados dan evidencias de que la actividad de la lipoxigenasa en

semillas que la contienen, podría proveer a éstas de una resistencia contra las especies toxigénicas de *Aspergillus*. El crecimiento de *A. flavus* también ha sido reportado como inhibido en semillas con altos contenidos de aceite. Tal es el caso del cacahuete, donde cuatro sustancias extraídas de semillas recién cosechadas, inhibieron el crecimiento de dicho hongo (Lindsey y Turner, 1975).

Diversos compuestos naturales han sido probados por sus efectos inhibitorios sobre *A. flavus* y/o *A. parasiticus*, tales como: cafeína (Buchanan y Fletcher, 1978), aceites de diversos cultivos como clavo, canela, cítricos, zanahoria, chile (Bullerman *et al*, 1977; Karapinar, 1985; Batt *et al*, 1983; Madhyastha y Bhat, 1984), extractos de cebolla, zanahoria, plantas medicinales, plantas con efectos narcóticos, plantas de uso condimental (Batt *et al*, 1980; Bahk y Marth, 1983, Hitokoto *et al*, 1980; Bilgrami *et al*, 1980). Compuestos purificados también han sido evaluados, tales como: Ácido Benzoico, Ácido aminobenzoico, Ácido butírico, Ácido propiónico, Fitoalexinas, Vainillina, entre otros muchos (Uraih y Chipley, 1976; Davies y Diener, 1967; Ghosh y Haggblom, 1985; Wotton y Stange, 1985; Bilgrami *et al*, 1982). De todos los compuestos mencionados algunos son reportados con efectos inhibitorios sobre *A. flavus* y/o *A. parasiticus*. En ninguno de los casos se han evaluado a hormonas vegetales del grupo de las Auxinas como compuestos que pudieran regular la síntesis de aflatoxinas o el desarrollo de *A. flavus* y/o *A. parasiticus*.

El Ácido Jasmónico/Metil Jasmonato es un compuesto presente en diferentes especies plantas (Meyer *et al*, 1984) y también en algunos hongos (Aldridge *et al*, 1971) y se ha demostrado que inhibe o promueve múltiples procesos en las plantas (Sembdner y Parthier, 1993), entre los que se incluyen aquellos involucrados en mecanismos de defensa de las plantas contra hongos patógenos cuando éstos interactúan con la planta hospedera. Su influencia en la regulación génica se presenta a diferentes niveles tales

como inducción de expresión génica, transcripción, procesamiento de RNA a nivel post-transcripcional, estabilidad del mensajero, traducción y niveles post-traduccionales como modificaciones de proteínas y degradación (Reinbothe *et al*, 1994). También se ha reportado que concentraciones tan bajas como 10^{-5} mM inhiben *in vitro* la síntesis de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* hasta en un 96 %; dicho compuesto también disminuyó la germinación de esporas y la producción de pigmentos miceliales del mismo hongo. Los niveles submicromolares requeridos para causar dicho efecto indica que es improbable un efecto por actividad enzimática y se sugiere la inhibición de algún o algunos de los genes de la ruta biosintética de las aflatoxinas (Goodrich-Tanrikulu *et al*, 1995).

La ruta biosintética de las aflatoxinas está compuesta de 15 genes, los cuales están reunidos en una agrupación génica llamada "cluster" (Keller y Hohn, 1997) Se reporta que en la síntesis del compuesto intermediario de la esterigmatocistina producida por *A. nidulans* están involucrados al menos 15 actividades enzimáticas, teniendo las especies *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* una etapa adicional para convertir la esterigmatocistina en aflatoxina (Brown *et al*, 1996). Muy interesante ha resultado el hecho de que un porcentaje muy alto de cepas de *A. flavus* contienen el cluster de genes de síntesis de aflatoxinas aunque estas cepas produzcan o no dichas toxinas. Estos genes están regulados por el gen *aflR* el cual es requerido para la transcripción de todos los demás genes del camino metabólico (Biing-Hui y Fun-Sun, 1998; Meyer *et al*, 1998). Con el uso de genes reporteros unidos a β -glucuronidasa y otras técnicas de biología molecular se han estudiado las condiciones ambientales que regulan a *aflR* y por consecuencia la síntesis de micotoxinas (Du *et al*, 1999). Condiciones ambientales y nutricionales tales como temperatura, aireación y fuente de carbono están influenciando la regulación de *aflR*.

Otros genes de la ruta metabólica de la biosíntesis de micotoxinas han sido caracterizados y su función establecida. Se ha encontrado que los genes *flbA* y *fluG* juegan un papel determinante en el balance entre crecimiento, esporulación y síntesis de esterigmatocistina de *A. nidulans*. La expresión de *fluG* trae por consecuencia la activación del gen *flbA*, el que a su vez inactiva al gen *fadA*. Cuando *fadA* está activo, ocurre un estímulo del crecimiento a la vez que una represión de la esporulación y de la síntesis de esterigmatocistina, por lo que al ser reprimido por *flbA*, el crecimiento del hongo se verá detenido dando lugar a la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina (Yu *et al*, 1999).

Por otro lado existen evidencias de que la esporulación y la síntesis de micotoxinas están correlacionados y que tienen un punto común de regulación (Guzmán-de-Peña y Ruiz-Herrera, 1997). La disminución en el proceso de la esporulación asexual al mismo tiempo que se reduce la producción de esterigmatocistina es un fenómeno ya demostrado en *A. nidulans* por Hicks *et al* (1997) y en *A. parasiticus* por Guzmán-de-Peña y Ruiz-Herrera (1997) quienes ilustraron claramente que en condiciones de cultivo donde el hongo no esporuló no produjo micotoxina, o con una mutante de esa misma especie con sectores incapaces de esporular y que lo fueron también para producir aflatoxina, en contraposición con sectores que presentaron esporulación normal y que produjeron más toxina que la cepa silvestre.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Experimentos con medios sintéticos.

IV.1.1. Cepas utilizadas.

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo se realizaron varios experimentos en donde fueron utilizadas las siguientes cepas fúngicas:

a) *Aspergillus nidulans* FGSC-26. Cepa donada por el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. *A. nidulans* es un modelo fúngico y cuenta con la ventaja de tener la misma ruta de síntesis que tienen *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* para producir aflatoxinas, con excepción de un último paso por lo que en *A. nidulans* el producto final en dicha ruta es la toxina esterigmatocistina; esto determina que al analizar el comportamiento de *A. nidulans* se tengan más herramientas de estudio para analizar lo que ocurre con otros hongos como *A. flavus* y/o *A. parasiticus*.

b) *Aspergillus parasiticus* Ap³⁻⁵. Cepa de la tercera generación de aislamientos monospóricos provenientes de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 adquirida en el Northern Regional Research Laboratory de Peoria Illinois, USA. La especie *A. parasiticus* fue preferida sobre *A. flavus* debido a su estabilidad en la producción de aflatoxinas y específicamente se escogió la cepa Ap³⁻⁵ por haberse homogenizado su población mediante avances generacionales de cultivos monospóricos hechos previamente en el Laboratorio de Micotoxinas de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

c) *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992. Cepa adquirida en la American Type Culture Collection en Manassas, VA, USA. Esta cepa produce las cuatro aflatoxinas, B₁, B₂, G₁ y G₂ y presenta mayor estabilidad de producción.

IV.1.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en las diferentes fases de los experimentos desarrollados durante el presente trabajo fueron los siguientes:

a) Papa Dextrosa Agar. Se utilizó este medio en su forma deshidratada adquirido de la compañía Difco. Este medio fue empleado para incrementar el inóculo utilizado para iniciar los diferentes experimentos tanto de *A. nidulans* como de *A. parasiticus*.

b) Medio sintético para *A. nidulans*. Fue utilizado como base el medio propuesto por Käfer (1977). Su composición fue la siguiente:

Solución de sales 20x	50 ml
Elementos traza 1000x	1,000 µl
Sacarosa (2%)	20 g
Biotina (Sol. concentrada al 0.05%)	500 µl
PABA (Sol. concentrada al 0.17 %)	500 µl
Metionina	200 mg
Agua destilada (a aforar)	1,000 ml

La sacarosa es la mejor fuente de carbono para la síntesis de esterigmatocistina por *A. nidulans* (Guzmán-de-Peña, 1996). El pH fue ajustado a 6.5 con Hidróxido de Sodio 2 N.

Los elementos traza 1000x y la solución de sales 20x fueron preparados de la siguiente manera:

Elementos traza 1000xSolución de sales 20x

ZnSO ₄ 7H ₂ O	2.2 g	NaNO ₃	120 g
H ₃ BO ₃	1.1 g	KCl	10.4 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.5 g	MgSO ₄ 7 H ₂ O	10.4 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g	KH ₂ PO ₄	30.4 g
CoCl ₂ 5H ₂ O 0	0.16 g	H ₂ O destilada (a aforar)	1,000 ml
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.16 g		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	5.0 g		
H ₂ O destilada (a aforar)	1,000 ml		

c) Medio sintético para *A. parasiticus*. Fue utilizado como base el medio propuesto por Hsieh y Mateles (1971), el cual es reportado como no inductor de aflatoxinas y utiliza peptona como fuente de carbono. En este estudio se utilizó glucosa como fuente de carbono tomándolo en un medio sintético inductor. Su composición fue la siguiente:

(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	10 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2 g
Mezcla de metales	1,000 µl
Glucosa (5 %)	50 g
H ₂ O destilada (a aforar)	1,000 ml

La glucosa fue escogida por haber resultado ser una buena fuente de carbono para *A. parasiticus* en experimentos previos (Guzmán-de-Peña, 1996). El pH fue ajustado a 6.5 con Hidróxido de Sodio 2 N, para posteriormente ser esterilizado en autoclave por 15 minutos a 15 PSI de presión. Para evitar que la glucosa se caramelizara con el calor y al estar mezclada con el resto de las sustancias, éste compuesto fue esterilizado por separado en las mismas condiciones de autoclaveado, y agregado posteriormente al medio.

La mezcla de metales fue preparada de la siguiente manera:

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	700 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	680 mg
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	300 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.76 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	110 g
H_2O destilada (a aforar)	1,000 ml

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave por 15 minutos a 15 PSI de presión.

IV.1.3. Obtención de inóculo.

Las cajas conteniendo cultivos de los hongos fueron incubados durante cinco días, en forma constante durante todos los experimentos. Al término de la incubación se añadió a cada caja 3 ml de agua Tritón X-100 estéril al 0.01 % y se obtuvo el inóculo en condiciones estériles. La cuenta de esporas se realizó utilizando la cámara de Neubauer.

Se utilizó 1 ml de una suspensión de esporas al 1×10^7 esporas/ml para cada matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio de cultivo.

IV.1.4. Condiciones de incubación.

Se utilizaron dos temperaturas de incubación: 28° y 37° C. La primera se utilizó para incubar las cepas *A. parasiticus* ATCC 16992 y *A. parasiticus* Ap³⁻⁵. La segunda fue utilizada para la cepa *A. nidulans* FGSC 28. Algunos experimentos con la cepa *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ fueron también desarrollados a 37° C.

Los matraces con el medio de cultivo líquido fueron incubados en condiciones estacionarias durante 3 y 6 días. El mayor tiempo se utilizó en la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 por ser de crecimiento más lento que las otras cepas utilizadas.

IV.1.5. Reguladores de crecimiento.

Se utilizaron diez diferentes reguladores de crecimiento en sus formas de compuestos puros o como sal de sodio o sal de potasio y en diferentes concentraciones como se ilustra en la tabla 1. Todos los compuestos se obtuvieron en la Compañía Sigma Chemical Co.

El primer criterio para establecer las concentraciones a utilizar de los reguladores de crecimiento se basó sobre los diferentes datos de concentraciones usadas en cultivo de tejidos vegetales y las bajas concentraciones en que éstos se encuentran en las plantas (Davis, 1995) Posteriormente se incrementaron las dosis hasta encontrar la concentración mínima para causar un efecto.

Previo a su uso, las soluciones de los compuestos fueron preparadas con agua destilada. En el caso de las presentaciones en forma de sal de Potasio o Sodio, la soluciones se prepararon directamente en el agua, mientras que para los compuestos

Tabla 1. Reguladores de crecimiento vegetal utilizados.

Regulador de crecimiento	Concentraciones evaluadas (mM)
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (sal de Na)	0.00004; 0.0206; 0.2058, 5 y 50
Ácido Giberélico	0.00003; 0.0144, 0.1443 y 0.7217
Ácido Giberélico (sal de K)	0.00003; 0.0130; 0.1300 y 0.6502
Ácido Indolacético	0.00006; 0.0171 y 0.1712
Ácido Indolacético (sal de Na)	0.0152 y 0.1521
Ácido Indolbutírico	0.0005; 0.0492 y 0.4921
Ácido Indolbutírico (sal de K)	0.0414; 0.4144; 5 y 50
Ácido Jasmónico	1
Ácido Naftalenacético	0.00005; 0.0537; 0.5370
Ácido Naftalenacético (sal de K)	0.00004; 0.0446; 0.4458; 0.5; 5 y 50

puros se pre-disolvieron con unas gotas de NaOH 1N o Alcohol Etilico al 50 %, según la recomendación del fabricante.

Para evitar su degradación con el calor, todos los reguladores de crecimiento fueron esterilizados por filtración a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore 0.45 μ m, 25 mm, HAWP), previo a ser agregados al medio de cultivo.

IV.1.6. Extractos y tejidos vegetales.

Para obtener los extractos de tejidos de maiz fueron utilizadas mazorcas del híbrido A-791 cosechadas entre los 15 y 20 días después de la emergencia de los estigmas, durante los ciclos de primavera-verano del 2000 y 2001.

Dos mazorcas fueron procesadas en el ciclo primavera-verano del 2000, las cuales, inmediatamente después de ser cosechadas, fueron divididas en tres partes: estigmas, elote y brácteas florales. Cada parte por separado fue cortada en pequeños trozos, colocándose posteriormente en 250 ml de etanol y calentados en baño maría por 15 minutos a 80° C.

Después de enfriarse, los tejidos de maíz fueron colados con el uso de una gaza y dejados reposar hasta la total evaporación del etanol para posteriormente ser molidos en licuadora con 200 ml de agua destilada. Cinco gramos de esta molienda fueron agregados a cada matraz con 50 ml de medio de cultivo de Káfer y esterilizados por 15 minutos a 15 PSI de presión. Los matraces fueron inoculados e incubados a 37° C durante tres días. Los tejidos de maíz sólo fueron evaluados con *A. nidulans*.

El etanol conteniendo los extractos de maíz fue evaporado en un rotoevaporador hasta reducir su volumen a 50 ml. De este concentrado, 20 ml fueron guardados a -12° C hasta su uso, llamándoles a éstos "extractos etanólicos". Los 30 ml de extracto etanólico restantes fueron evaporados a sequedad en baño maría a 80° C y resuspendidos en 30 ml de agua destilada; la suspensión fue filtrada en papel Whatman No. 1 para eliminar todos los sólidos y el filtrado se guardó a -12° C hasta su uso, llamándole a éstos "extractos etanólicos evaporados y resuspendidos en agua".

Como al momento de resuspender los extractos en agua destilada parte de ellos no fueron solubles en la misma (quedaron adheridos a las paredes del vaso de precipitados), una vez eliminada el agua se resuspendieron en 30 ml del mismo etanol; la suspensión fue filtrada en papel Whatman No. 1 y guardada a -12° C hasta su uso, llamándole a éstos "extractos etanólicos evaporados y resuspendidos en el mismo etanol".

El segundo año (ciclo primavera-verano del 2001) el interés se centró sólo en los extractos de estigmas de maíz, por lo que sólo se procesaron éstos siguiendo una metodología similar al del año anterior. Las variantes fueron:

- a) Se procesaron 150 gramos de peso fresco de estigmas (obtenidos de 25 mazorcas) en 600 ml de etanol, los cuales, después del calentamiento a baño maría, se dejaron reposar toda una noche.
- b) No se realizaron experimentos con tejidos de estigmas, por lo que éstos fueron eliminados.
- c) No se dejó "extracto etanólico" por lo que todo éste fue evaporado hasta sequedad, haciéndose la posterior resuspensión con 900 ml de agua destilada. Los residuos no solubles en agua fueron resuspendidos en 100 ml de etanol y posteriormente evaporados hasta reducir su volumen a 50 ml.

Para evitar la posible degradación con el calor, todos los extractos de maíz fueron esterilizados por filtración a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore 0.45 μm , 25 mm, HAWP y HVHP, para extractos acuosos y etanólicos, respectivamente), previo a ser agregados al medio de cultivo.

IV.1.7. Parámetros evaluados.

Se evaluaron tres parámetros: (A) el crecimiento micelial, (B) la esporulación y (C) la síntesis de micotoxinas.

A) Crecimiento micelial. El micelio fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 1 a peso constante. El papel con el micelio se colocó a 60° C por 24 horas para su total secado. El crecimiento se determinó por diferencia de peso.

B) Esporulación. Al término de la incubación, el micelio fue transferido a un tubo de ensayo al que se le agregaron 10 ml de agua Tritón al 0.01 %. Las esporas fueron

separadas del micelio por agitación con una espátula, tomándose posteriormente una alícuota para la cuantificación de esporas en la cámara de Neubauer. El micelio y las esporas fueron regresados al matraz con el medio de cultivo para realizar la extracción de micotoxinas.

c) Síntesis de micotoxinas. Extracción y cuantificación. Tanto la esterigmatocistina en *A. nidulans* como las aflatoxinas en *A. parasiticus* fueron extraídas de acuerdo a Keller *et al* (1994). A cada matraz conteniendo todo el medio de cultivo con el micelio y las esporas correspondientes, le fueron agregados 30 ml de acetona y dejado reposar por 30 minutos; posteriormente se agregaron 30 ml de cloroformo dejándose igualmente reposar por el mismo tiempo. La fase clorofórmica fue filtrada a través de Sulfato de Sodio anhidro y luego evaporada a sequedad. Las micotoxinas fueron resuspendidas con 5 ml de cloroformo para pasarlas a tubo de ensayo, evaporadas a sequedad de nueva cuenta y resuspendidas con 1 ml de metanol grado HPLC. La muestra así obtenida se filtró con columnas extract-clean C-18 (marca Alltech). Las micotoxinas se cuantificaron por cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna C18 en fase reversa (Beckman, 4.6 mm x 15 cm). El sistema de solventes para la fase móvil en el caso de las aflatoxinas fue una mezcla de agua:Metanol:Acetonitrilo (45:40:15), mientras que para esterigmatocistina fue solamente Metanol.

IV.2. Experimento *in vitro* utilizando granos de maíz.

Para evaluar el efecto del Ácido Naftalenacético sobre la esporulación y síntesis de aflatoxinas de *A. Parasiticus*, muestras de 50 gramos de maíz del híbrido Asgrow-791 fueron colocados en un matraz erlenmeyer y esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 15 PSI de presión. Los matraces fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de esporas 1×10^7 de la cepa *A. parasiticus* (ATCC 16992). Se tuvieron tres tratamientos.

(a) Control positivo con granos de maíz inoculados con *A. parasiticus* y sin Ácido Naftalenacético, (b) Control negativo con granos sin inóculo y sin el regulador de crecimiento y (c) Granos de maíz inoculados con *A. parasiticus* y adicionando una solución 50 mM de Ácido Naftalenacético filtrada en una membrana de nitrocelulosa Millipore. A todos los matraces se les añadieron 10 ml de agua estéril para favorecer las condiciones de humedad y se incubaron a 28° C por 7 días. Al término de la incubación, a cada matraz se le adicionaron 10 ml de agua Tritón al 0.01 % y por agitación con una espátula, las esporas fueron separadas de los granos; se tomó 1 ml de esta suspensión para su cuantificación en la cámara de Neubauer. Las aflatoxinas fueron extraídas del maíz utilizando el método 1 AOAC modificado por Guzmán-de-Peña *et al* (1992) y cuantificadas por cromatografía líquida de alta presión.

IV.3. Diseño experimental y análisis estadístico.

Se montaron experimentos individuales con tres tratamientos cada uno. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones. La unidad experimental consistió de un matraz erlenmeyer con 50 ml de medio de cultivo o con 50 gramos de maíz. Los datos se transformaron a $\log(x+1)$ y se sometieron a un análisis de varianza y la prueba de separación de medias de Tukey, usándose en todos los casos un nivel de significancia de 0.05. Para todos los análisis, se usó la versión 6.12 del SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Aunque para los análisis estadísticos se usaron los datos transformados, en las tablas mencionadas en el capítulo de resultados todos los datos corresponden a los valores originales.

BIOLOGÍA MOLECULAR.

IV.4. Expresión del gen flbA.

Para evaluar la expresión del gen *fibA* fue necesario obtener RNA del hongo en cuestión. Para ello se sembró *A. parasiticus* ATCC 16992 en el medio de cultivo de Hsieh-Mateles, en presencia y en ausencia de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético. El compuesto fue adicionado al inicio de la incubación y se cultivó durante 48 horas a 28° C. Se utilizó una solución 50 mM de dicho regulador para cada tratamiento.

IV.4.1. Extracción de RNA.

El micelio del hongo fue filtrado y congelado en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento. La obtención del RNA se realizó utilizando el reactivo TRIzol (Gibco BRL) que se basó en agregar este reactivo al micelio del hongo finamente molido en frío en un mortero, y después de los pasos que se siguieron de acuerdo al protocolo de Chomczynski (1993), se recuperó un sobrenadante con el RNA. La concentración del RNA obtenido fue calculada en un espectrofotómetro de acuerdo a Maniatis *et al* (1982) utilizando la relación A_{260}/A_{280} y su integridad fue evaluada por observación en un gel de agarosa. El RNA fue guardado hasta su uso a -75° C.

IV.4.2. Northern blot.

El gel desnaturizante se preparó mezclando 1.2 gramos de Agarosa, 10 ml de MOPS 10x y 73 ml de agua desionizada tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC). Se disolvió en microondas y cuando se enfrió hasta 60° C se le añadieron 17 ml de Formaldehído al 35 %, vaciándose de inmediato a la cámara de electroforesis. Por otro lado, 15 µg de RNA obtenido como se detalló en el apartado anterior, fueron mezclados en una solución conteniendo 5 µl de Formamida, 1 µl de MOPS 10x y 2 µl de Formaldehído al 35 % e incubados 5 minutos a 65° C. Después de enfriar en hielo y adicionados 5 µl de

buffer de carga y 0.5 µl de Bromuro de Etidio, se cargaron en el gel desnaturalizante. La electroforesis se corrió a 50 volts por 3 horas utilizando MOPS 1x como buffer de corrida.

Para la transferencia del RNA se construyó un puente con papel Whatman 3 MM en una solución de SSC 10x, y sobre del cual se colocó el gel desnaturalizante. Arriba del gel se colocó una membrana de Nylon Hybond™-N+ (Amersham Pharmacia Biotech), después otro papel Whatman y sobre éste suficiente papel absorbente. Se dejó transferir durante 18 horas a temperatura ambiente. Finalmente el RNA fue fijado a la membrana homeándola 2 horas a 80° C. La membrana conteniendo el RNA se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

IV.4.3. Obtención del fragmento flbA.

Utilizando la secuencia obtenida en el Gen Bank, se diseñaron oligonucleótidos homólogos al gen flbA, utilizando el programa "Primer Select". Dichos oligonucleótidos fueron sintetizados en el Laboratorio de Secuenciación del CINVESTAV, Unidad Irapuato, y correspondieron a la región conservada "SLKFSQSNR" entre los aminoácidos 270 y 280 del gen flbA de *A. nidulans*, y sus secuencias directa y reversa fueron las siguientes:

5' TCCCTCAAATTCTCTCAATCGAACCGG 3'

5' GTAGAATGACAGGTTTTCTTCGCAGA 3'

Estos oligos fueron utilizados como primers en las reacciones de amplificación por PCR, utilizando un termociclador Perkin Elmer modelo 2400. Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa y se clonaron dentro del vector Topocloning 2.1.

Después de reproducir suficientemente el vector, el DNA plasmídico fue aislado del mismo mediante el "kit" Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen Bioscience Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Del DNA plasmídico se obtuvo un fragmento de

810 pb al digerirlo con la enzima Eco R1 (Gibco BRL). El fragmento fue recuperado después de correrlo en un gel preparativo de agarosa y posteriormente se purificó utilizando el "kit" Concert Gel Extraction Systems (Gibco BRL), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El fragmento de flbA obtenido se mandó secuenciar para corroborar por homología si correspondía al gen respectivo reportado en el Gen Bank.

IV.4.4. Marcaje radioactivo del fragmento flbA.

Una vez purificado el fragmento de flbA, se llevó a 47.5 μ l con TE y se desnaturalizó a 95° C por 5 minutos y se pasó posteriormente a hielo. Se agregó a un tubo de reacción (Rediprime) al que a su vez se le adicionaron 2.5 μ l de [α ³²P] dCTP como marca radioactiva. El tubo de reacción fue incubado a 37° C por una hora y la reacción fue detenida agregando 3 μ l de EDTA 0.5 M.

La reacción de marcaje radioactivo se llevó a 200 μ l con TE y se procedió a su limpieza. Para esto, primeramente se preparó una columna con perlas bolotini, fibra de vidrio y biogel y se centrifugó por 5 minutos a 2,500 rpm; posteriormente se agregaron 200 μ l de TE y se volvió a centrifugar de la misma manera. Los 200 μ l de reacción de marcaje fueron adicionados a la columna así preparada y se centrifugó por 5 minutos a 5,000 rpm y 6° C, obteniéndose de esta manera la sonda radioactiva para ser utilizada en la hibridación.

IV.4.5. Hibridación.

El fragmento ya marcado se desnaturalizó a 95° C por 5 minutos, y se agregó como sonda radioactiva a la solución de prehibridación conteniendo la membrana de nylon con el RNA de los tratamientos. Se dejó hibridando durante toda la noche a 55° C y en agitación continua para posteriormente lavar las membranas con SSC. Éstas se colocaron

dentro de un cassette de exposición juntamente a una película de rayos X y se dejaron exponiendo a -70° C.

TÉCNICA DE RT-PCR.

IV.4.6. Obtención del cDNA.

Para evaluar el efecto de la expresión del gen *fibA* de *A. parasiticus* ATCC 16992 en presencia y ausencia de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético 50 mM, se utilizó la técnica de RT-PCR.

Para ello se realizó primeramente la síntesis de una cadena complementaria de DNA usando como template el RNA extraído como se indicó en el apartado IV.4.1. y utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados para el gen *fibA* como se indicó también en el apartado IV.4.3.

Los productos de la reacción se analizaron en un gel de agarosa.

V. RESULTADOS

V.1. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus* en medios sintéticos.

Como se indicó en el capítulo de Metodología, se utilizaron diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento. Las adiciones fueron en mg/Lt y después se calculó la molaridad, de tal manera que las primeras molaridades usadas fueron extraordinariamente bajas. En algunos casos el 2,4-Diclorofenoxiacético, el Ácido Giberélico, el Ácido Indoacético y el Ácido Naftalenacético fueron adicionados a molaridades de 3 a 6×10^{-5} mM.

La adición de estos compuestos a molaridades tan bajas no causaron ningún cambio en ninguno de los tres parámetros evaluados, crecimiento expresado como peso seco, número de esporas totales del cultivo y producción de esterigmatocistina o aflatoxina por mg de micelio.

V.1.1. Experimentos con *Aspergillus nidulans* FGSC-26.

Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

Los resultados obtenidos al usar la sal de Na del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético como se observa en la tabla 2 indican que no hay diferencias significativas en los parámetros evaluados y por lo tanto ningún efecto de este compuesto sobre *A. nidulans*. En un primer experimento (datos no mostrados), la concentración 2.06×10^{-2} mM inhibió la esporulación en un 42.9 %, pero este resultado no se repitió. Durante la repetición del experimento no se analizó si concentraciones más altas de este compuesto afectaban a *A. nidulans*.

Tabla 2. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido 2,4-D (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	309.4 a	3.7 a	672.6 a
0.0206	320.8 a	3.7 a	691.2 a
0.2058	297.6 a	3.5 a	745.9 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Ácido Giberélico.

Al utilizar la forma pura del Ácido Giberélico a una concentración de 3×10^{-5} mM no se observó ningún efecto sobre los parámetros evaluados (tabla 3). Sin embargo cuando se aumentó la concentración a 1.44×10^{-2} mM se observó un efecto estimulador solamente en la síntesis de esterigmatocistina con respecto a la producción en el control (tabla 4). Si la concentración se incrementaba a 1.44×10^{-1} mM ni el crecimiento ni la esporulación se estimulaba pero la esterigmatocistina aumentaba en cantidad producida por mg de micelio. Cabe mencionar que la repetibilidad del efecto de la concentración 1.44×10^{-2} mM entre experimentos es muy variable.

El efecto de la sal de Potasio a bajas concentraciones (3×10^{-5} mM) parece no tener ningún efecto (tabla 5), sin embargo conforme se aumenta la concentración se afecta el crecimiento y la síntesis de esterigmatocistina (tabla 6). Como se puede observar en la tabla 5, la esporulación obtenida en este experimento es mucho menor que la obtenida para el control del experimento cuyos datos se muestran en la tabla 6.

Tabla 3. Efecto de dos concentraciones de Ácido Giberélico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Giberélico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	204.7 a	16.5 a	69.6 a
0.00003	196.3 a	12.6 a	50.9 a
0.0144	211.1 a	13.6 a	56.3 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 4. Efecto de dos concentraciones de Ácido Giberélico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Giberélico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	263.0 a	2.8 a	247.2 b
0.0144	301.5 a	3.6 a	483.1 a
0.1443	261.8 a	2.9 a	606.0 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 5. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Giberélico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Giberélico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	290.0 a	37.9 a	130.8 a
0.00003	264.5 a	48.1 a	118.6 a
0.0130	284.6 a	43.2 a	97.3 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 6. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Giberélico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Giberélico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	311.5 a	106.4 a	143.1 a
0.0130	251.8 b	85.1 a	84.8 ab
0.1300	227.2 b	71.7 a	67.7 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Ácido Indolacético.

Solo la concentración más baja de la forma pura del Ácido Indolacético (6×10^{-5} mM) mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento y la esporulación de *A. nidulans* (tabla 7), pero este efecto no fue consistente cuando se utilizaron concentraciones mas altas del mismo regulador (tabla 8). En ningún caso se encontró un efecto sobre la síntesis de esterigmatocistina.

Ninguna de las concentraciones utilizadas de la sal de Sodio afectaron a los parámetros evaluados en *A. nidulans* (tabla 9).

Tabla 7. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Indolacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	225.1 a	32.6 a	108.1 a
0.00006	178.9 b	18.9 b	112.0 a
0.0171	227.2 a	24.3 ab	114.9 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 8. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Indolacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	318.1 a	75.7 a	62.5 a
0.0171	296.8 a	86.8 a	63.8 a
0.1712	275.5 a	52.3 a	74.1 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 9. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido Indolacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Indolacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	278.5 a	5.1 a	224.3 a
0.0152	279.0 a	4.1 a	376.3 a
0.1521	273.0 a	5.3 a	343.7 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Ácido Indolbutírico.

Solo se encontró un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial y a las concentraciones mas bajas evaluadas (5×10^{-4} y 4.92×10^{-2} mM) en la forma pura del Ácido Indolbutirico (tabla 10). Ni concentraciones mayores de la forma pura ni de la forma de sal de Potasio de este regulador inhibieron a ninguna de las tres variables evaluadas (tablas 11 y 12).

Tabla 10. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolbutirico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Indolbutírico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	295.7 a	10.1 a	222.3 a
0.0005	231.3 b	10.3 a	121.7 a
0.0492	234.5 b	8.8 a	146.0 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 11. Efecto de dos concentraciones de Ácido Indolbutírico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Indolbutírico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas [*] ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	258.0 a	111.8 a	52.8 a
0.0492	217.7 a	79.7 a	50.2 a
0.4921	215.5 a	79.7 a	60.9 a

^{*} Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 12. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Indolbutírico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Indolbutírico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas [*] ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	239.8 a	74.2 a	27.4 a
0.0414	198.5 a	56.2 a	31.4 a
0.4144	221.2 a	67.9 a	32.6 a

^{*} Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Ácido Jasmónico.

En el caso del Ácido Jasmónico sólo se evaluó la concentración de 1 mM reportada por Goodrich-Tanrikulu *et al* (1995) como inhibitoria de la síntesis de aflatoxina. El Ácido Jasmónico se disolvió en acetona por lo que se incluyó un tratamiento con éste compuesto como control agregado en una cantidad igual a la que se utilizó para disolver el Ácido Jasmónico. El Ácido Jasmónico inhibió significativamente la esporulación al reducirla en un 70.2 % con respecto al control. El crecimiento micelial y la síntesis de esterigmatocistina no fueron afectadas a la concentración evaluada. Este regulador de crecimiento no fue evaluado a otras concentraciones porque se encontraron reportes de trabajos realizados por otros investigadores (Goodrich-Tanrikulu *et al*, 1995).

Tabla 13. Efecto del Ácido Jasmónico sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Jasmónico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	240.9 a	60.0 a	45.0 a
Acetona	245.0 a	38.7 a	77.9 a
1	226.6 a	17.9 b	81.0 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Ácido Naftalenacético.

El Ácido Naftalenacético fue el regulador de crecimiento más estudiado por haberse encontrado efectos consistentemente inhibitorios sobre *A. nidulans*.

Primeramente se utilizaron concentraciones bajas (entre 4×10^{-5} y 5.37×10^{-2} mM), tanto de la forma pura como la de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético, no encontrándose para ningún caso efectos significativos sobre *A. nidulans* en ninguna de las tres variables utilizadas (tablas 14 y 15).

Para la forma pura del Ácido Naftalenacético se encontró una inhibición significativa para el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina cuando la concentración se elevó a 5.37×10^{-1} mM (tabla 16), mientras que en su forma de sal de Potasio la inhibición se dio sólo en el crecimiento y en la esporulación al incrementarla a 4.458×10^{-1} mM (tabla 17). En un segundo experimento para evaluar conjuntamente las mismas concentraciones del Ácido Naftalenacético (5.37×10^{-1} y 4.458×10^{-1} mM, para la forma pura y la de la sal de Potasio, respectivamente), la única inhibición significativa se encontró en el número de esporas para la forma de sal de Potasio del Ácido Naftalenacético; el crecimiento y la síntesis de esterigmatocistina se vieron reducidas pero la prueba estadística no las alcanzó a detectar como diferentes (tabla 18).

Para constatar el efecto encontrado con el Ácido Naftalenacético, se decidió utilizar concentraciones más altas, empleando solamente la forma de sal de Potasio. Estas concentraciones fueron de 5 y 50 mM, encontrándose en ambas una inhibición significativa sobre el crecimiento y la esporulación; además, la concentración mas alta inhibió también la síntesis de esterigmatocistina (tabla 19). A 50 mM la inhibición fue categórica para los tres parámetros evaluados (88.8, 100 y 82.9 % para crecimiento, esporulación y síntesis de esterigmatocistina, respectivamente), siendo de resaltar la inhibición total de la esporulación.

Los resultados ilustran que el Ácido Naftalenacético es un compuesto prometedor para inhibir los parámetros evaluados en *A. nidulans*.

Tabla 14. Efecto de dos concentraciones de Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	293.9 a	27.4 a	423.6 a
0.00005	269.1 a	23.9 a	345.8 a
0.0537	287.2 a	28.3 a	204.9 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 15. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	144.5 a	30.7 a	64.2 a
0.00004	146.7 a	31.4 a	65.0 a
0.0446	184.4 a	39.3 a	75.9 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 16. Efecto de dos concentraciones de Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	288.1 a	12.9 a	935.0 a
0.0537	283.5 a	11.0 a	627.4 ab
0.5370	245.7 b	2.9 b	553.1 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 17. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	313.4 a	3.7 a	555.7 a
0.0446	293.2 ab	2.8 ab	806.7 a
0.4458	278.4 b	2.1 b	827.1 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 18. Efecto de la forma pura y como sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	273.3 a	96.9 a	75.2 a
Forma pura (0.5370 mM)	255.2 a	80.4 ab	47.5 a
Sal de K (0.4458 mM)	240.9 a	50.9 b	52.7 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 19. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
0	219.7 a	13.9 a	3,724.4 a
5	178.4 b	8.4 b	3,134.2 a
50	24.7 c	0 c	638.4 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

V.1.2. Experimentos con *Aspergillus parasiticus*.

V.1.2.1. Experimentos con *Aspergillus parasiticus* Ap³⁻⁵.

La cepa Ap³⁻⁵ de *A. parasiticus* fue escogida por su homogeneidad genética según se indicó en el capítulo de Metodología, sin embargo la capacidad de producción de aflatoxinas se vio afectada totalmente a pesar de su crecimiento en el medio de cultivo favorable para síntesis de aflatoxina.

Ácido Giberélico.

Ninguna de las concentraciones utilizadas de la forma pura del Ácido Giberélico presentó un efecto significativo sobre el crecimiento y la esporulación de *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ (tabla 20). Por no haberse producido aflatoxina, ésta variable no pudo ser evaluada.

Tabla 20. Efecto de dos concentraciones de Ácido Giberélico sobre *Aspergillus parasiticus* (Ap³⁻⁵) en medio sintético.

Ácido Giberélico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	262.4 ab	22.1 a	0
0.0144	286.6 a	21.6 a	0
0.1443	240.2 b	21.9 a	0

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Ácido Naftalenacético.

Para este regulador de crecimiento se utilizaron las concentraciones medias, tanto de la forma pura como la de la sal de Potasio.

Tanto la forma pura como la de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético a las concentraciones de 5.370×10^{-1} y 4.458×10^{-1} mM, respectivamente, tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento y la esporulación de *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ (tablas 21 y 22) alcanzando niveles de inhibición en la forma de sal de Potasio de hasta 42.5 y 69.1 % para el crecimiento y la esporulación, respectivamente (tabla 23). Por otro lado se encontró que las concentraciones bajas de 5.37×10^{-2} (forma pura) y 4.46×10^{-2} mM (sal de Potasio) del Ácido Naftalenacético, en ningún caso tuvo efectos significativos sobre la misma cepa, ni para el crecimiento ni para la esporulación (tablas 21 y 22).

La cepa perdió su capacidad de producción de aflatoxina, imposibilitando la evaluación de este parámetro. Por esta razón la evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento se realizó en la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992. Por esta razón la evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento se realizó en la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992.

Tabla 21. Efecto de dos concentraciones de Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (Ap³⁻⁵) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	225.4 a	5.1 a	0
0.0537	206.2 a	5.2 a	0
0.5370	140.9 b	2.2 b	0

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 22. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (Ap³⁻⁵) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	258.4 a	6.3 ab	0
0.0446	258.9 a	7.2 a	0
0.4458	189.5 b	4.3 b	0

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 23. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (Ap³⁻⁵) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas ^{**} (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	228.5 a	13.9 a	0
0.0446	202.7 a	11.2 a	0
0.4458	131.3 b	4.3 b	0

* Los datos presentados en esta tabla son los resultados de un experimento repetido en idénticas condiciones al experimento cuyos resultados se muestran en la tabla 24.

** Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

V.1.2.2. Experimentos con *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992.

La cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 produce cantidades elevadas de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, en el medio de cultivo de Hsieh y Mateles descrito en el capítulo de Metodología.

Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

La sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético fue evaluada en primer término utilizando concentraciones bajas. La concentración de 2.058×10^{-1} mM produjo una estimulación en la síntesis de aflatoxinas (tabla 24). Como este efecto no fue similar al encontrado con la cepa *A. nidulans* FGSC-26, se decidió incrementar las concentraciones de este regulador de crecimiento. En la tabla 25 se ilustra como los tres parámetros evaluados se vieron inhibidos cuando las concentraciones de la sal de Sodio del Ácido

2,4-Diclorofenoxiacético se elevaron a 5 y 50 mM; el crecimiento, la esporulación y la síntesis de aflatoxinas se redujeron hasta en un 34.5, 67.2 y 86.8 %, respectivamente.

Tabla 24. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido 2,4-D (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	559.4 ab	12.9 a	1,468.9 b
0.0206	575.0 a	17.7 a	2,700.3 ab
0.2058	492.5 b	25.1 a	4,516.2 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 25. Efecto de dos concentraciones de la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido 2,4-D (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	334.4 a	19.2 a	2,244.9 a
5	225.6 b	6.3 b	808.9 b
50	218.9 b	13.4 a	295.1 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Ácido Giberélico.

La forma pura del Ácido Giberélico evaluada a concentraciones bajas (1.443×10^{-1} mM) mostró un efecto estimulador en la síntesis de aflatoxinas, al incrementar su producción en un 85.4 %; el crecimiento y la esporulación no se vieron significativamente modificadas con respecto al control. Ninguno de los tres parámetros se vieron afectados a la concentración de 1.44×10^{-2} (tabla 26).

Tabla 26. Efecto de dos concentraciones del Ácido Giberélico sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido Giberélico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	567.7 a	11.9 a	791.3 b
0.0144	492.5 a	9.9 a	1,026.7 ab
0.1443	505.9 a	17.8 a	1,467.4 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Ácido Indolbutírico.

La sal de Potasio del Ácido Indolbutírico se evaluó a dosis altas de 5 y 50 mM, encontrándose un efecto altamente inhibitorio en el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas; ambos procesos se vieron reducidos en un 78.6 y 92.3 %, respectivamente. Es interesante notar que el efecto sobre la esporulación fue estimulador; la concentración de 50 mM aumentó el número de esporas hasta un 264.6 % (tabla 27).

Tabla 27. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Indolbutírico sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido Indolbutírico (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	447.1 a	7.9 b	556.1 a
5	391.6 a	22.2 ab	417.2 a
50	95.8 b	28.8 a	42.7 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Ácido Naftalenacético.

La forma pura del Ácido Naftalenacético fue evaluada a las concentraciones de 5.37×10^{-2} y 5.37×10^{-1} mM. Dos experimentos idénticos fueron conducidos, con la diferencia de que uno se dejó incubar cinco días mientras que el otro se dejó seis. El crecimiento se vio inhibido en un 31.2 % y la esporulación incrementada en un 204 %, cuando la concentración fue de 5.37×10^{-1} mM y el hongo se dejó incubando por seis días. (tabla 28). A la concentración menor (5.37×10^{-2} mM), o cuando el hongo se incubó por cinco días, ambos parámetros no se vieron modificados respecto al control (tabla 29). La síntesis de aflatoxinas se vio estimulada a la concentración de 5.37×10^{-2} mM cuando el hongo se incubó cinco días, pero este efecto no se repitió ni a la dosis mayores ni cuando se incubó por seis días.

La sal de Potasio del Ácido Naftalenacético fue evaluada a concentraciones bajas, medias y altas. A partir de la concentración de 4.458×10^{-1} mM se encontró un efecto

consistentemente inhibitorio en el crecimiento micelial (tabla 30). En cambio se requirió de una concentración mayor para lograr un efecto en la esporulación, y fue hasta 50 mM en que se observó una estimulación al incrementarse de manera consistente el número de esporas (tablas 32 y 33); el incremento de la esporulación llegó a ser de hasta 196.8 % con respecto al control. Para la síntesis de aflatoxinas, un efecto inhibitorio se comenzó a notar desde la concentración de 5 mM (tabla 32) pero dicho efecto sólo fue consistente a la concentración 50 mM.

Tabla 28. Efecto de dos concentraciones del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético (6 días de incubación).

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	614.5 a	12.6 b	728.3 a
0.0537	610.2 a	15.1 b	1,063.2 a
0.5370	423.0 b	38.3 a	926.0 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 29. Efecto de dos concentraciones del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético (5 días de incubación).

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	266.7 ab	8.1 a	1,743.2 b
0.0537	180.6 b	12.1 a	3,495.4 a
0.5370	323.2 a	8.6 a	1,192.6 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 30. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	567.8 a	22.9 a	1,515.3 a
0.0446	552.7 a	30.5 a	1,502.1 a
0.4458	465.4 b	33.5 a	1,245.6 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 31. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	432.9 a	14.4 a	1,198.6 a
0.5	356.2 b	13.7 a	1,100.4 a
5	263.2 c	13.4 a	791.9 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 32. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	548.5 a	13.0 b	1,657.3 a
5	271.1 b	19.8 ab	641.1 b
50	141.4 c	34.9 a	947.6 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 33. Efecto de dos concentraciones de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Ácido Naftalenacético (mM)	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas ^{**} ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
0	512.2 a	12.6 b	1,487.1 a
5	231.3 b	10.4 b	1,013.8 a
50	145.1 c	37.4 a	171.6 b

* Los datos presentados en esta tabla son los resultados de un experimento repetido en idénticas condiciones al experimento cuyos resultados se muestran en la tabla 35.

** Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

V.2. Efecto *in vitro* del Ácido Naftalenacético en granos de maíz inoculados con *Aspergillus parasiticus*.

El efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético encontrado sobre *A. parasiticus* en medios sintéticos, se evaluó utilizando granos de maíz. De esta manera, granos esterilizados del híbrido de maíz A-791 fueron inoculados con la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 tratados previamente con una solución 50 mM de dicho regulador de crecimiento. Dos experimentos repetidos en idénticas condiciones fueron desarrollados y sus resultados son mostrados en las tablas 34 y 35. En ambos casos se inhibió significativamente la esporulación y la síntesis de aflatoxinas cuando estuvo presente el regulador de crecimiento, alcanzando niveles máximos de inhibición de 75.9 y 79.6 %, respectivamente. En el control positivo (granos de maíz inoculados con *A. parasiticus* y sin

el regulador de crecimiento), puede notarse la alta capacidad de producción de aflatoxinas de la cepa utilizada, la cual produjo niveles de contaminación del grano de hasta 49,225 µg/Kg de maíz en las condiciones dadas de incubación y con el nivel de inóculo utilizado (tabla 35).

En ambas tablas se puede observar que en el maíz sin inóculo de *A. parasiticus* no se encontraron esporas, lo que corrobora la ausencia de crecimiento de dicho hongo en estos matraces; se encontraron niveles basales de aflatoxina los cuales probablemente venían en el maíz original y no fueron destruidas al someterlos a esterilización en la autoclave. De cualquier manera, estos niveles distan con mucho a los encontrados en los tratamientos que sí recibieron el inóculo de *A. parasiticus*.

Tabla 34. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético (ANA) sobre la esporulación y síntesis de aflatoxinas de la cepa *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 inoculada en granos de maíz.

Tratamiento		Número de esporas/50 g de maíz ($\times 10^7$)	Producción de aflatoxinas	
ANA (mM)	<i>A. parasiticus</i> (esporas $\times 10^7$)		µg/50 g de maíz	µg/Kg de maíz
50	1	11.2 a	870 a	17,400 a
0	1	46.5 b	1,930 b	38,600 b
0	0	0 c	1.47 c	29 c

Granos de maíz originalmente esterilizados.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 35. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético (ANA) sobre la esporulación y síntesis de aflatoxinas de la cepa *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 inoculada en granos de maíz .

Tratamiento		Número de esporas/50 g de maíz ($\times 10^7$)	Producción de aflatoxinas	
ANA (mM)	<i>A. parasiticus</i> (esporas $\times 10^7$)		$\mu\text{g}/50\text{ g}$ de maíz	$\mu\text{g}/\text{Kg}$ de maíz
50	1	2.2 a	502 a	10,050 a
0	1	6.8 b	2,461 b	49,225 b
0	0	0 c	3.03 c	61 c

* Los datos presentados en esta tabla son los resultados de un experimento repetido en idénticas condiciones al experimento cuyos resultados se muestran en la tabla 34. Granos de maíz originalmente esterilizados. Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

V.3. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético sobre la expresión del gen *flbA* de *Aspergillus parasiticus*.

Para determinar si la expresión del gen *flbA* se veía modificada en presencia del Ácido Naftalenacético, se utilizó la técnica de RT-PCR donde se compararon los niveles de los transcritos de dicho gen en la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992, desarrollada en un medio de cultivo sintético con presencia y ausencia de dicho regulador de crecimiento.

Para poder realizar el estudio de la expresión del gen *flbA*, primeramente se construyó un fragmento del mismo de 810 pb por medio de amplificación por PCR; cuando se secuenció dicho fragmento se encontró una alta homología con la secuencia

correspondiente del gen. De esta forma se procedió al estudio. En la figura 1 se puede observar que el nivel de transcritos del gen *fbA* después de 48 horas de incubación se vio reducido cuando el hongo se cultivó en presencia de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético 50 mM, indicando un efecto inhibitorio de este regulador de crecimiento sobre los niveles de transcripción de dicho gen.

V.4. Efecto de los extractos y tejidos de maíz sobre *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus* en medios sintéticos.

V.4.1. Experimentos con *Aspergillus nidulans* FGSC-26.

Sobre esta cepa fueron evaluados los efectos tanto de tejidos como de extractos de estigmas, elote y brácteas florales del maíz.

Tejidos de maíz.

Los resultados del experimento conducido utilizando diferentes tejidos de maíz se muestran en la tabla 36. Con todos los tejidos utilizados se encontró un incremento significativo en el peso seco de micelio del orden de 132.3, 142.5 y 202.6 % para los tejidos de estigmas, brácteas florales y elote, respectivamente. Los procesos de esporulación y de Δ ignific de esterigmatocistina se vieron estimulados Δ ignificativamente solo con el tejido de estigmas, lográndose incrementos de un 221.7 y 267.8 %, respectivamente.

Figura 1. Expresión del gen flbA de *Aspergillus parasiticus* cultivado en presencia y ausencia del Ácido Naftalenacético (ANA) 50 mM, utilizando la técnica de RT-PCR.

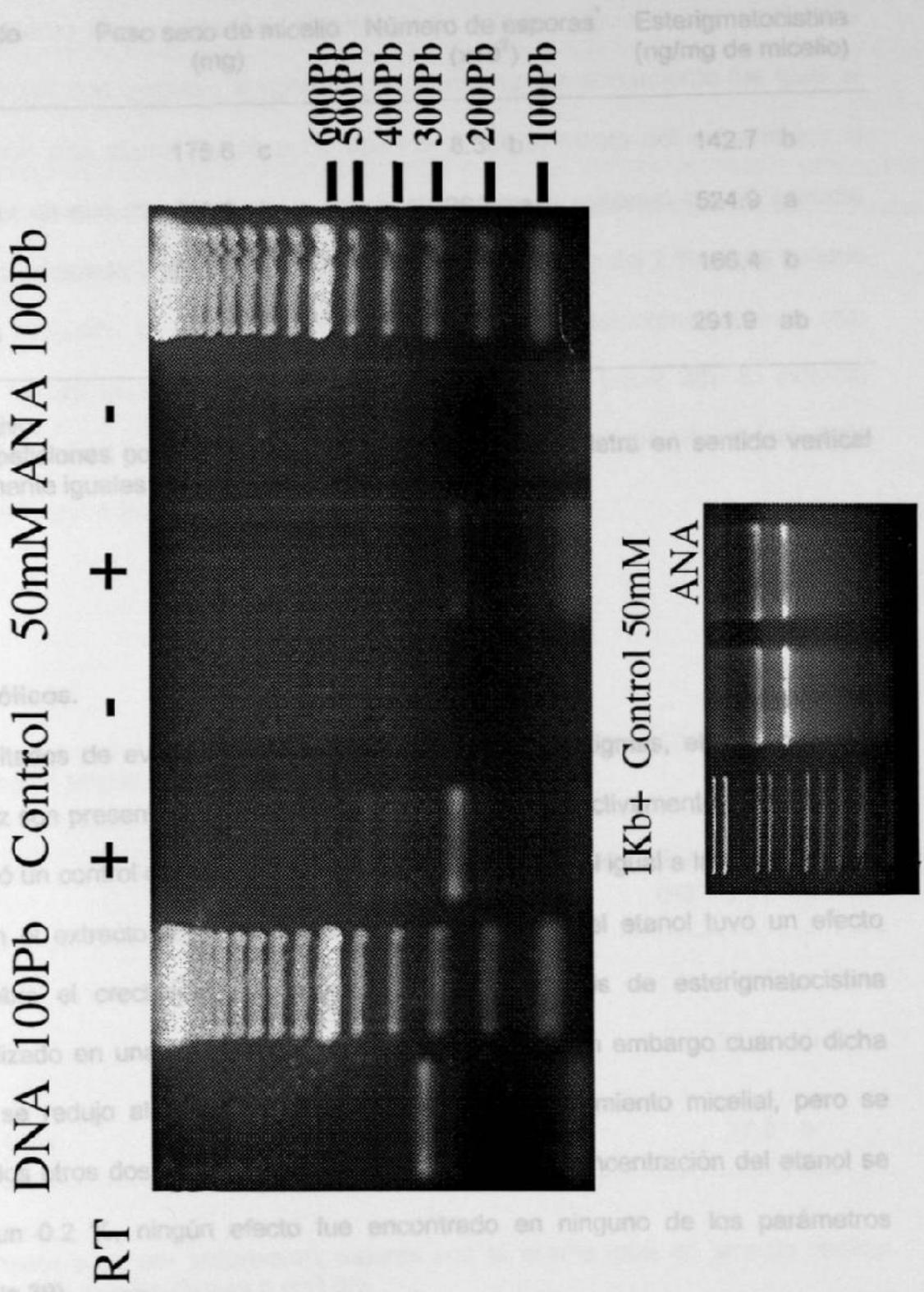


Tabla 36. Efecto de diferentes tejidos de maíz sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tipo de tejido de maíz	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas [*] ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	175.6 c	8.3 b	142.7 b
Estigmas	408.0 b	26.7 a	524.9 a
Elote	531.3 a	8.1 b	166.4 b
Brácteas	425.9 b	16.4 ab	291.9 ab

^{*} Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Extractos etanólicos.

Los resultados de evaluar los extractos etanólicos de estigmas, elote y brácteas florales del maíz son presentados en las tablas 37, 38 y 39, respectivamente. En todos los casos se incluyó un control donde se utilizó una cantidad de etanol igual a la utilizada en el tratamiento con el extracto. En este sentido, se observó que el etanol tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina cuando fue utilizado en una concentración al 4 % (tabla 37), sin embargo cuando dicha concentración se redujo al 2 % el efecto fue nulo en el crecimiento micelial, pero se mantuvo para los otros dos parámetros (tabla 38). Cuando la concentración del etanol se redujo hasta un 0.2 %, ningún efecto fue encontrado en ninguno de los parámetros evaluados (tabla 39).

Respecto al efecto de los extractos etanólicos, en la tabla 37 se puede observar el caso del extracto etanólico de estigmas agregado al medio de cultivo a una concentración del 4 %. El crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina mostraron una diferencia significativa con respecto al control, pero como su comportamiento fue igual al del tratamiento solo con etanol, no se pudo dilucidar entre el efecto del extracto por sí mismo y el etanol en que iba disuelto. Un resultado similar se encontró con el extracto etanólico de elote agregado al medio de cultivo a una concentración del 2 %; pues aunque se observó una inhibición en la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina, este comportamiento resultó igual al del tratamiento solo con etanol (tabla 38). El extracto etanólico de brácteas florales del maíz fue evaluado a una concentración demasiado baja y su efecto no fue registrado (tabla 39).

Tabla 37. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	297.9 a	12.83 a	134.6 a
Etanol (4 %)	115.9 b	0.26 b	20.2 ab
Extracto de estigmas (4 %)	106.6 b	0.11 b	17.2 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 38. Efecto del extracto etanólico de elote de maíz sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	313.0 a	111.3 a	57.2 a
Etanol (2 %)	295.1 a	2.0 b	2.6 b
Extracto de elote (2 %)	228.3 a	1.9 b	6.3 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 39. Efecto del extracto etanólico de brácteas de maíz sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	282.4 a	65.8 a	164.2 a
Etanol (0.2 %)	292.7 a	32.5 a	205.9 a
Extracto de brácteas (0.2 %)	304.9 a	50.6 a	231.7 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Extractos etanólicos evaporados y resuspendidos en agua.

Para eliminar el efecto del etanol, este compuesto fue evaporado en su totalidad y los residuos conteniendo los extractos de estigmas, elote o brácteas florales del maíz fueron resuspendidos en agua. En todos los casos se usó una concentración al 4 %.

En un primer experimento el extracto de estigmas incrementó significativamente la síntesis de esterigmatocistina en un 401.3 %, pero no tuvo efectos sobre el crecimiento y la esporulación (tabla 40). Al evaluarse este mismo extracto en un segundo experimento, de nueva cuenta la síntesis de esterigmatocistina se vio incrementada en un 454.8 %, pero además también el crecimiento se estimuló en un 30.0 %; la esporulación tuvo un incremento pero no fue muy significativo (tabla 41).

El extracto de elote también fue evaluado dos veces, resultando con un incremento en el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina (tablas 41 y 42). Los incrementos máximos logrados fueron del orden de 58.9, 65.9 y 190.1 %, respectivamente.

El extracto de brácteas florales solo fue evaluado una vez encontrándose un efecto estimulador en los tres parámetros evaluados. El crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina se vieron incrementados en un 112.1, 194.6 y 89.7 %, respectivamente (tabla 42).

Tabla 40. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido en agua sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	307.6 a	147.18 a	70.6 b
Etanol (4 %)	82.8 b	0.08 b	50.5 b
Extracto de estigmas (4 %)	311.7 a	77.26 a	353.9 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 41. Efecto de los extractos etanólicos de estigmas y elote de maíz, evaporados y resuspendidos en agua sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	275.8 b	39.1 b	136.8 c
Extracto de estigmas (4 %)	333.6 a	45.3 ab	759.0 a
Extracto de elote (4 %)	357.4 a	64.5 a	396.8 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 42. Efecto de los extractos etanólicos de elote y brácteas de maíz, evaporados y resuspendidos en agua sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* ($\times 10^7$)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	173.1 c	27.9 b	174.9 b
Extracto de elote (4 %)	275.1 b	46.3 ab	302.5 a
Extracto de brácteas (4 %)	367.2 a	82.2 a	331.8 a

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Extractos etanólicos evaporados y resuspendidos nuevamente en etanol.

Al momento de preparar los extractos de maíz como se detalló en el capítulo de Metodología, un residuo de éstos no fue soluble en agua, por lo que se resuspendió en el mismo etanol para evaluar si contenía compuestos del maíz que pudieran tener algún efecto sobre *Aspergillus*. En este caso también fue dejado un tratamiento con etanol, observándose nuevamente un efecto inhibitorio de este compuesto sobre el crecimiento y la esporulación de *A. nidulans*; la síntesis de esterigmatocistina también se vio reducida aunque la prueba estadística no la detectó como diferente (tabla 43).

Respecto al efecto del extracto resuspendido en etanol, solo se trabajó el de estigmas y sus resultados se observan en la misma tabla. Un efecto inhibitorio de los tres parámetros fue observado cuando dicho extracto se agregó al medio de cultivo a una

concentración de 4 %; La inhibición fue de 72.9, 99.7 y 100 % para el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina, respectivamente. Aunque es de resaltar la casi inhibición total en la esporulación y total en la síntesis de esterigmatocistina, debe considerarse que este resultado es la suma de los efectos del extracto de estigmas y el etanol en que iba disuelto.

Tabla 43. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en etanol sobre *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Esterigmatocistina (ng/mg de micelio)
Control	225.9 a	63.95 a	32.5 a
Etanol (4 %)	81.8 b	0.12 b	15.2 a
Extracto de estigmas (4 %)	61.2 c	0.18 b	0 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

V.4.2. Experimentos con *Aspergillus parasiticus* Ap³⁻⁵.

Los efectos de los extractos de maíz encontrados en *A. nidulans*, quisieron también evaluarse con una especie productora de aflatoxina. La cepa *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ fue

escogida en un principio pero por la inhibición que presentó al cultivarse en el medio de cultivo elegido, solo se alcanzaron a realizar dos experimentos.

Extractos etanólicos.

En un primer experimento se evaluó el efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz utilizando una concentración del 2 % (tabla 44); se puede observar que en el crecimiento micelial no hubo un efecto significativo al utilizarse dicho extracto, pero si en la variable número de esporas, donde ocurrió una inhibición del 69.9 % con respecto al control. Al igual que en los experimentos realizados con *A. nidulans*, el etanol tuvo efectos inhibitorios sobre la cepa *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ con la concentración del 2 %, incluso en el crecimiento en donde a esta concentración no se había tenido efecto en *A. nidulans*.

Tabla 44. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz sobre *Aspergillus parasiticus* Ap³⁻⁵ en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
Control	200.3 a	10.95 a	0
Etanol (2 %)	111.8 b	0.31 c	0
Extracto de estigmas (2 %)	176.6 a	3.30 b	0

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Extractos etanólicos evaporados y resuspendidos en agua.

Los extractos etanólicos de elote y brácteas florales del maíz evaporados y resuspendidos en agua fueron evaluados sobre *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ y sus resultados son mostrados en la tabla 45. En este caso solo se encontró un efecto estimulador con el extracto de elote sobre la variable de crecimiento micelial, lográndose un aumento con respecto al control de 14.4 %. El extracto de brácteas florales no manifestó ningún efecto en el crecimiento de hongo, al igual que la producción de esporas en ninguno de los casos. Es de hacer notar que el bajo estímulo logrado en el crecimiento micelial con el extracto de elote y el no haber obtenido respuesta en los demás parámetros evaluados, se debió a que este experimento se incubó a 28° C, cuando la temperatura ideal para el crecimiento y desarrollo de la cepa *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ es de 38° C. Por esta razón la esporulación fue casi nula, aun en el control.

Tabla 45. Efecto de los extractos etanólicos de elote y brácteas de maíz, evaporados y resuspendidos en agua sobre *Aspergillus parasiticus* Ap³⁻⁵ en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
Control	295.1 b	0.63 a	0
Extracto de elote (4 %)	337.6 a	0.75 a	0
Extracto de brácteas (4 %)	280.5 b	0.83 a	0

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

V.4.3. Experimentos con *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992.

Los experimentos utilizando la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 fueron realizados solo con el extracto de estigmas de maíz. No se evaluó en este caso el extracto etanólico, sino solo los que resultaron de evaporar a éste y resuspenderlo en agua o en el mismo etanol.

Extractos etanólicos evaporados y resuspendidos en agua.

En el caso del extracto etanólico de estigmas evaporado y resuspendido en agua, se evaluaron concentraciones de 4, 8 y 16 %. Un efecto estimulador sobre el crecimiento micelial fue encontrado a partir de la concentración de 8 % (tabla 46), conservándose dicho efecto cuando la concentración del extracto se elevó hasta 16 %, siendo en esta última concentración donde se obtuvo el máximo efecto al incrementarse el crecimiento micelial del hongo en un 40.1 % con respecto al control (tabla 47). La esporulación también se vio estimulada cuando se utilizaron las concentraciones del extracto de 8 y 16 % (tabla 47); la cantidad de esporas se incrementó en un 574.7 % cuando se utilizó la máxima concentración del extracto acuoso de estigmas.

Contrario al efecto estimulador encontrado en la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans* al utilizar este mismo extracto, en *A. parasiticus* ATCC 16992 el efecto fue de una marcada inhibición de la síntesis de aflatoxinas al utilizar cualquiera de las concentraciones evaluadas de este extracto (tablas 46 y 47). El rango de inhibición de este proceso metabólico estuvo entre 82.9 y 87.3 % en las diferentes concentraciones del extracto utilizadas.

Tabla 46. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido en agua sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
Control	579.4 b	13.1 a	1,329.9 a
Extracto de estigmas (4 %)	644.7 ab	15.0 a	174.3 b
Extracto de estigmas (8 %)	690.2 a	16.7 a	168.3 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Tabla 47. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido en agua sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas* (x10 ⁷)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
Control	460.6 b	9.9 b	1,205.9 a
Extracto de estigmas (8 %)	621.5 a	41.5 a	167.3 b
Extracto de estigmas (16 %)	645.4 a	66.8 a	206.2 b

* Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a p=0.05).

Extractos etanólicos evaporados y resuspendidos nuevamente en etanol.

Al igual que con las cepas anteriores, el etanol tuvo un efecto significativamente inhibitorio sobre el crecimiento y la esporulación de *A. parasiticus* ATCC 16992. En cambio, la síntesis de aflatoxinas no se vio notablemente modificada con respecto al control (tabla 48).

El efecto del etanol sobre el hongo no permitió separar adecuadamente el del extracto etanólico de estigmas evaporado y resuspendido nuevamente en ese mismo compuesto, resultando este tratamiento similar al que incluyó solamente el etanol (tabla 48).

Finalmente se utilizó el extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en el mismo etanol, pero en este caso, en uno de los tratamientos se aplicó directamente dicho extracto a una dosis de 2 ml por matraz conteniendo 50 ml de medio de cultivo (de igual forma como se hizo en el experimento cuyos resultados se muestran en la tabla 48), mientras que en el otro tratamiento se volvió a evaporar la mitad del etanol, de manera de obtener la misma cantidad de extracto pero disuelto en solo 1 ml de etanol, y agregándolo a cada matraz conteniendo 50 ml de medio de cultivo. De esta forma se quiso dilucidar el efecto combinado del extracto y el etanol. Los resultados son mostrados en la tabla 49 donde se puede observar que solo donde se utilizaron los 2 ml de etanol se obtuvo una reducción en el crecimiento del hongo. Este resultado indica que el efecto en la reducción del crecimiento se debió al etanol y no al extracto, ya que cuando se uso solo 1 ml de etanol (pero la misma cantidad de extracto) no hubo diferencia en comparación al control. La esporulación se vio reducida, siendo mayor el efecto cuanto mayor fue la cantidad de etanol utilizada. Nuevamente la síntesis de aflatoxinas no se vio significativamente modificada.

Tabla 48. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en etanol sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas [*] ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
Control	590.1 a	9.62 a	911.3 a
Etanol (4 %)	240.7 b	0.01 b	707.4 a
Extracto de estigmas (4 %)	284.0 b	0.02 b	939.5 a

^{*} Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

Tabla 49. Efecto del extracto etanólico de estigmas de maíz, evaporado y resuspendido nuevamente en etanol sobre *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) en medio sintético.

Tratamiento	Peso seco de micelio (mg)	Número de esporas ^{***} ($\times 10^7$)	Aflatoxina (ng/mg de micelio)
Control	564.1 a	9.7 a	861.0 a
Extracto de estigmas (4 %) [*]	259.1 b	0 c	608.0 a
Extracto de estigmas (4 %) ^{**}	558.8 a	2.1 b	928.2 a

Suspendido en ^{*} y en 1 ml^{**} de etanol/50 ml de medio de cultivo.

^{***} Totales del cultivo.

Medias de 5 repeticiones por tratamiento; valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey a $p=0.05$).

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Efecto de los reguladores del crecimiento sobre *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus* en medios sintéticos.

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos distribuidos en todas las partes de la planta; en semillas de maíz en desarrollo, en reposo o en germinación se ha reportado la presencia de Ácido Indolacético, Ácido Abscísico, Giberelinas y Citocininas (Davies, 1995; Fong *et al*, 1983; Wright *et al*, 1991). Con el propósito de elucidar si los reguladores de crecimiento de las plantas tenían algún efecto sobre algunos hongos que interactúan con ellas, en este estudio se analizaron diez reguladores de crecimiento y se evaluó su efecto sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de micotoxinas de *A. nidulans* y *A. parasiticus*. Un efecto consistente del Ácido Naftalenacético se encontró a partir de las concentraciones de 5.37×10^{-1} y 4.458×10^{-1} mM, para la forma pura y la de sal de Potasio, respectivamente. Este efecto se observó en ambas cepas de los hongos utilizados, de tal manera que este regulador de crecimiento se identificó como el compuesto más prometedor de entre los que fueron evaluados. Mas adelante en esta misma sección se detallan los resultados con dicho regulador.

Un efecto interesante de ser considerado en posteriores estudios se observó cuando se utilizaron concentraciones altas de la sal de Potasio del Ácido Indolbutírico y la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético en *A. parasiticus*. En contraste, la sal de Sodio del Ácido Indolacético y la de Potasio del Ácido Indolbutírico en *A. nidulans* no afectaron ninguno de los parámetros evaluados, debido posiblemente a las concentraciones tan bajas utilizadas (10^{-4} mM). El resto de compuestos y concentraciones evaluadas tuvieron efectos parciales y ambiguos ya que inhibían o estimulaban sólo a algunos de los parámetros evaluados.

Cabe hacer notar que cuando se observó efecto, este en general fue de inhibición hacia los tras procesos metabólicos evaluados. Sin embargo la forma pura del Ácido Giberélico estimuló la síntesis de micotoxinas tanto en *A. nidulans* como en *A. parasiticus*, a concentraciones bajas.

Otro efecto estimulador fue el observado en *A. parasiticus* ATCC 16992 sobre esporulación cuando se utilizaron concentraciones altas (50 mM) con ambas formas del Ácido Naftalenacético.

La molaridad mínima del Ácido Naftalenacético que produjo un efecto inhibitorio significativo sobre ambas especies de *Aspergillus*, fue de 5.37×10^{-1} para la forma pura y 4.458×10^{-1} mM para la de la sal de Potasio.

En *A. nidulans* las molaridades antes mencionadas inhibieron el crecimiento y la esporulación al utilizar ambas formas del Ácido Naftalenacético. La síntesis de esterigmatocistina solo disminuyó su producción con la forma pura del compuesto. Al utilizar la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético a concentraciones más altas (5 y 50 mM) se encontró que la dosis más alta causó una inhibición considerable sobre los tres parámetros evaluados. La disminución encontrada en el proceso de la esporulación asexual así como la reducción en la producción de esterigmatocistina es un fenómeno ya demostrado en *A. nidulans* por Hicks *et al* (1997) quienes encontraron que ambos procesos requirieron la inactivación del gen *fadA*. Guzmán-de-Peña y Ruiz-Herrera (1997), también describieron una correlación estrecha entre la esporulación y la síntesis de aflatoxina en *A. parasiticus*. Estos autores observaron que en condiciones de cultivo donde el hongo no esporuló no produjo micotoxina, de igual manera una mutante de esa misma especie, con sectores no esporulados eran incapaces de producir aflatoxina, en contraposición los sectores que presentaron esporulación normal produjeron más aflatoxina que la cepa silvestre.

Este mismo efecto se observó cuando Cohen *et al* (1993) utilizaron al Ácido Jasmónico y su ester metilado el cual actúa como señal química durante la germinación en la esporulación asexual de *Phytophthora infestans*. En el único experimento realizado en este estudio con Ácido Jasmónico 1 mM, los resultados concuerdan con lo observado con Goodrich-Tanrikulu *et al* (1995).

Un comportamiento semejante al de *A. nidulans*, tanto en crecimiento como en esporulación presentó *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ cuando ambos procesos fueron inhibidos por la forma pura y la de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético a partir de las concentraciones de 5.37×10^{-1} y 4.458×10^{-1} mM, respectivamente. Esta cepa no se evaluó en su síntesis de aflatoxinas debido a que dejó de producirlas en el medio de cultivo utilizado. El no haber encontrado aflatoxinas se atribuye al pH utilizado en el medio de cultivo donde se incubó este hongo. En experimentos realizados en el Laboratorio de Micotoxinas del CINVESTAV, Unidad Irapuato (datos no presentados) se encontró que al utilizar un pH de 6.5 en la cepa *A. parasiticus* Ap³⁻⁵, la esporulación y síntesis de aflatoxina se redujeron considerablemente en comparación de cuando se utilizó un pH de 4.5. Otros autores han encontrado que la producción de aflatoxinas se reduce drásticamente cuando el pH es de 6.0 o mayor (Keller *et al*, 1997). Por esta razón ya no se evaluaron concentraciones mayores de éste u otros reguladores de crecimiento con esta cepa y se decidió cambiarla por otra altamente productora de aflatoxinas.

Al igual como sucedió con *A. nidulans* FGSC 26 y *A. parasiticus* Ap³⁻⁵, el crecimiento de la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 también se vio inhibido por la forma pura y la de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético a partir de las concentraciones de 5.37×10^{-1} y 4.458×10^{-1} mM, respectivamente. Para concentraciones mayores solo se utilizó la sal de Potasio, encontrándose que dicha inhibición se acentuó cada vez más conforme la concentración del regulador de crecimiento se fue incrementando. El peso

seco de micelio se redujo hasta casi cuatro veces cuando se usó la concentración 50 mM, en comparación con el tratamiento control. Sorprendentemente, en esta misma cepa tanto en concentraciones medias como en concentraciones altas, la esporulación se vio incrementada, siendo un fenómeno contrario a lo encontrado con *A. nidulans*. El incremento en la esporulación en presencia del Ácido Naftalenacético no puede ser generalizado a todas las cepas de *A. parasiticus*, ya que en experimentos similares realizados con la cepa *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ se encontró una disminución y no un incremento de la esporulación. El incremento en la esporulación en *A. parasiticus* ATCC 16992 se observó a partir de la concentración de 5.37×10^{-1} mM y se mantuvo en las de 5 y 50 mM; aunque el área de crecimiento micelial se redujo por la inhibición producida por el Ácido Naftalenacético, la esporulación en ella se hizo más gruesa (en capas). En este estudio no pudimos demostrar porqué el Ácido Naftalenacético incrementó la esporulación en *A. parasiticus* y la disminuyó en *A. nidulans*. El efecto de disminución en el crecimiento y un consecuente incremento en la esporulación, ya fue demostrado en *A. nidulans* por Skromne *et al* (1995), quienes demostraron que el someter al hongo a una condición de estrés, trajo por consecuencia una reducción en el crecimiento micelial, situación que obligó al gen *brlA* a expresarse y dar origen a una abundante esporulación.

Por lo que respecta a la síntesis de aflatoxinas en la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992, no se encontraron diferencias cuando se utilizaron concentraciones bajas y no mayores de 5mM del Ácido Naftalenacético. Sin embargo este resultado es atribuido a la variación intrínseca del hongo debida a la inestabilidad que presenta en la producción de aflatoxinas, fenómeno que fue demostrado en *A. parasiticus* por Mayne *et al* (1971) y Guzmán-de-Peña *et al* (en prensa). Sin embargo, cuando la concentración del Ácido Naftalenacético se aumentó a 50 mM, se observó una clara inhibición en la producción de aflatoxinas, situación similar a la presentada con la producción de esterigmatocistina en *A.*

nidulans. Aunque otros procesos metabólicos pueden ser afectados a concentraciones menores, la concentración de Ácido Naftalenacético 50 mM es requerida para inhibir consistentemente la producción de aflatoxinas de la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992.

La inhibición de aflatoxinas también ha sido reportada con el Metil Jasmonato, otro regulador del crecimiento vegetal, en donde se encontró que con concentraciones de 10^{-5} mM se inhibió la síntesis de aflatoxinas hasta en un 96 %; los niveles submicromolares requeridos para causar dicho efecto indica que es improbable un efecto por actividad enzimática y se sugiere una inhibición de algún o algunos de los genes de la ruta biosintética de las aflatoxinas (Goodrich-Tanrikulu *et al*, 1995).

Este efecto podría también deberse a otro efecto reportado de las auxinas que en las plantas pueden causar cambios en el pH del citoplasma, siendo posible que las bajas concentraciones de las mismas lo acidifiquen y las altas lo alcalinicen (Hobbie *et al*, 1994). Esto podría tener una relación con la inhibición encontrada en la síntesis de micotoxinas de *Aspergillus* cuando se utilizaron altas concentraciones de Ácido Naftalenacético, ya que en estudios hechos en nuestro laboratorio y en otros lugares (Keller *et al*, 1997), la producción de aflatoxinas se redujo drásticamente cuando el pH fue de 6.0 o mayor.

Aunque cientos de compuestos han sido evaluados por su efecto sobre el crecimiento, esporulación y/o producción de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus* (ver revisión de Zaika y Buchanan, 1987), los reguladores de crecimiento vegetal del tipo de las auxinas no han sido incluidas. El ácido Abscísico es un regulador de crecimiento vegetal evaluado por Norton en 1997, encontrando que con 760 µg/ml se logró un 50 % de inhibición de aflatoxina en *A. flavus*. Otros compuestos no hormonales presentes en las plantas de maíz han sido reportados como inhibidores de procesos metabólicos en *Aspergillus flavus*, tal es el caso de los flavonoides los cuales fueron capaces de reducir la producción de aflatoxinas en dicho hongo (Mallozzi *et al*, 1996; Norton, 1999).

Se puede resumir que tanto para *A. nidulans* como para *A. parasiticus* las primeras concentraciones utilizadas del Ácido Naftalenacético resultaron demasiado bajas para producir algún efecto en el crecimiento, la esporulación o la síntesis de micotoxinas. Al usar concentraciones medias, los resultados fueron de inhibición, pero al no ser consistentes en todos los casos se decidió utilizar concentraciones mas altas, encontrando que 50 mM si fue consistente y afectó significativamente los tres parámetros mencionados. Cabe hacer mención que esta última concentración estuvo varios órdenes de magnitud por encima de las concentraciones de efecto hormonal.

También se encontraron cambios en la pigmentación de las esporas, tanto de *A. nidulans* como de *A. parasiticus*. En todos los tratamientos donde hubo efecto con el Ácido Naftalenacético, el color de las colonias se modificó con respecto al control. Este cambio en la pigmentación de las esporas podría indicar que dicho regulador de crecimiento afecta algunos pasos de la síntesis de pigmentos de esporas. Se ha sugerido una relación entre la formación de pigmentos de esporas y la producción de micotoxinas de *A. nidulans* y *A. parasiticus* (Guzmán-de-Peña, 1996). Ambos metabolitos son derivados de la ruta de los policétidos (Brown *et al*, 1993; Brown y Salvo, 1994), sin embargo sería necesario realizar estudios que permitan elucidar en que punto de la ruta metabólica de ambos procesos ocurre esta relación. La misma relación ocurre con el Metil Jasmonato donde la síntesis de aflatoxinas y la producción de pigmentos se vieron inhibidos cuando *A. flavus* se cultivó en presencia de dicho compuesto (Goodrich-Tanrikulu *et al*, 1995).

Finalmente se encontró un cambio en un hábito de crecimiento en la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 cuando se utilizaron concentraciones altas del Ácido Naftalenacético. Las puntas de las hifas tendieron a crecer verticalmente hacia arriba, formando abundante micelio aéreo. Un fenómeno similar fue encontrado por Yu *et al*

(1999) quienes mencionan que la inactivación del gen *flbA* causó un crecimiento descontrolado y la proliferación de hifas aéreas ("fluffy").

VI.2. Efecto *in vitro* de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético en granos de maíz inoculados con *Aspergillus parasiticus*.

El efecto inhibitorio consistente encontrado sobre la síntesis de aflatoxinas con 50 mM de Ácido Naftalenacético en medio sintético nos motivó a evaluar el efecto utilizando granos de maíz (substrato natural) esterilizados inoculados con la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992. La cantidad de esporas de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas fueron altas en el maíz inoculado, y cuando se adicionó el Ácido Naftalenacético (50 mM) ambos productos se redujeron significativamente. En esta condición la esporulación del hongo se vio inhibida, situación contraria a la obtenida cuando se utilizó medio sintético. Los resultados demuestran que la inhibición que el Ácido Naftalenacético produjo sobre *A. nidulans* y *A. parasiticus* encontrada en medio sintético también ocurre cuando dicha sustancia es aplicada en granos de maíz. Por tal motivo existe la posibilidad de que el Ácido Naftalenacético pudiera utilizarse como un control químico sobre los *Aspergilli* toxigénicos.

VI.3. Efecto de los tejidos y extractos de maíz sobre *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus* en medios sintéticos.

El tejido de estigmas de maíz destacó por haber incrementado el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*, lo cual indica ser un excelente substrato para el crecimiento y desarrollo de dicho hongo. Marsh y Payne (1984a y 1984b) demostraron que los estigmas son el tejido que coloniza *A. flavus* para introducirse a través de él en las mazorcas del maíz. Los resultados aquí obtenidos

sugieren que dichos tejidos contienen sustancias que son utilizadas favorablemente por el hongo para sus diferentes procesos fisiológicos y su establecimiento en el maíz en el campo.

Los extractos etanólicos presentaron efectos difíciles de comprender ya que los efectos encontrados podrían deberse sólo al etanol o a la suma de efectos del extracto de maíz+etanol. Con los resultados obtenidos utilizando solo etanol al 4 %, fue claro que este compuesto afectó considerablemente el crecimiento, la esporulación y la síntesis de micotoxinas. A concentraciones menores el efecto sobre el crecimiento fue mínimo o nulo aunque permaneció el efecto inhibitorio sobre los otros dos parámetros. Este resultado coincide con Bennett et al (1978) quienes encontraron una alta inhibición en la síntesis de aflatoxina cuando se uso una concentración 1 M de etanol, pero contrasta con el reportado por Goldblatt (1968) donde al usar concentraciones del 1 al 4 % de etanol se estimuló la síntesis de aflatoxinas. Este efecto se atribuye a que el hongo utilizó al etanol como fuente de carbono. Concentraciones menores de etanol (0.1 y 0.01 M) son reportadas como estimuladoras para la síntesis de aflatoxina por el mismo Bennett y colaboradores (1978) en *A. parasiticus*.

En un experimento realizado con extracto etanólico de estigmas de maíz en donde se uso una misma cantidad de extracto (4 %) pero disuelta en dos cantidades diferentes de etanol (1 y 2 ml), se demostró que la inhibición encontrada en el crecimiento de la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 se debió exclusivamente al etanol y no al extracto.

Los extractos acuosos de estigmas, ekote y brácteas florales del maíz siempre tuvieron un efecto estimulador sobre el crecimiento micelial de *A. nidulans* y *A. parasiticus*. Este efecto fue mas claro a las 48 horas de incubación, sin embargo se dejó incubar a los hongos hasta los seis días para permitir el proceso de esporulación. Sin

embargo el efecto estimulador del crecimiento micelial se mantuvo hasta el final de dicho período aunque con menos diferencias que a las 48 horas.

Los procesos de esporulación y síntesis de esterigmatocistina fueron también estimulados por la acción de todos los extractos acuosos en *A. nidulans*. El extracto acuoso de estigmas también estimuló la esporulación de *A. parasiticus*, sin embargo en la síntesis de aflatoxina ocurrió un efecto contrario y la producción de aflatoxina se vio inhibida. El efecto contrario en la síntesis de micotoxinas entre *A. nidulans* y *A. parasiticus* ya fue observado en este mismo estudio cuando se hicieron crecer a estos hongos en presencia del Ácido Naftalenacético, y donde en *A. nidulans* se inhibió el proceso de esporulación, mientras que en *A. parasiticus* resultó estimulado. Este tipo de resultados ilustran la importancia de tener cuidado cuando se infieren comportamientos encontrados en *A. nidulans* (usado como modelo fúngico) en otras especies *Aspergilli*. Estimulos en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus* utilizando extractos acuosos de plantas fueron reportados por Sinha en 1985. Este investigador evaluó 86 extractos acuosos de plantas medicinales y silvestres, de los cuales 22 inhibieron y cuatro estimularon dicho proceso. También son reportados tanto efectos de inhibición como de estimulación del crecimiento en dichos hongos.

VI.4. Efecto de la sal de Potasio del Ácido Naftalenacético en la expresión del gen *flbA* de *Aspergillus parasiticus*.

Se ha sugerido que el regulador de crecimiento Ácido Jasmónico podría actuar como señal química en el hongo *Phytophthora infestans*, cuando éste interactúa con plantas de papa (Cohen et al, 1993). En plantas se ha demostrado que el Ácido Naftalenacético y otras auxinas inducen respuestas transcripcionales de genes morfológicos y de diferenciación desde dosis de 10^{-8} M y en tiempos hasta de 5 minutos

(Hagen y Guilfoyle, 1985). El resultado obtenido en este estudio sobre la transcripción del gen *flbA* el cual está involucrado en una regulación negativa sobre los genes de síntesis de micotoxinas, demostraron que se inhibió cuando *A. parasiticus* se cultivó en presencia del Ácido Naftalenacético.

La solución de Ácido Naftalenacético 50 mM inhibió la transcripción del gen *flbA* de *A. parasiticus* a las 48 horas de incubación. Esto podría explicar la inhibición encontrada en la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina de *A. nidulans* cuando se incubó en presencia de dicho regulador. Se considera que mientras el gen *flbA* permanece inhibido, por la acción del Ácido Naftalenacético, el gen *fadA* se mantendrá activo, manteniendo la represión de la esporulación y de la síntesis de aflatoxina, tal como lo describe Yu *et al* (1999).

VII. CONCLUSIONES

1. Se encontraron tanto efectos inhibitorios como estimulatorios sobre *Aspergillus nidulans* y *A. parasiticus*, entre los reguladores de crecimiento evaluados, y a las concentraciones utilizadas. De entre ellos, el Ácido Naftalenacético destacó por su efecto inhibitorio a partir de la concentración de 0.5 mM, siendo consistente dicho efecto al utilizar la concentración de 50 mM; solo en *A. parasiticus* ATCC 16992 el efecto sobre la esporulación al utilizar concentraciones altas fue estimulatorio.

2. La sal de Potasio del Ácido Indolbutírico y la sal de Sodio del Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético también resultaron tener efectos importantes en *A. parasiticus* al utilizar concentraciones altas. Se sugiere seguir investigando a estos compuestos. En aquellos reguladores de crecimiento en los que solo se evaluaron concentraciones bajas, se sugiere también realizar mayores estudios para evaluar el efecto de concentraciones mayores.

3. El crecimiento micelial, la esporulación y la síntesis de micotoxinas de *A. nidulans* y *A. parasiticus* fueron los procesos metabólicos que se vieron afectados con el uso de los reguladores de crecimiento evaluados, siendo en su mayoría de tipo inhibitorio. Se encontraron además cambios en la pigmentación de las esporas y una modificación del hábito de crecimiento de las hifas al formar un micelio aéreo.

4. El efecto inhibitorio del Ácido Naftalenacético sobre *A. parasiticus* en medio sintético, también ocurrió al adicionar dicho regulador en granos de maíz inoculados con ese hongo.

5. La solución de Ácido Naftalenacético 50 mM inhibió la transcripción del gen *flbA* en *A. parasiticus* a las 48 horas de incubación.

6. Los tejidos de maíz, especialmente el de estigmas, resultaron significativamente estimuladores en el crecimiento, la esporulación y la síntesis de esterigmatocistina de *A. nidulans*. De igual forma se encontró un efecto estimulador tanto en *A. nidulans* como en *A. parasiticus*, cuando se utilizó el extracto acuoso de estigmas de maíz.

7. Se encontró una diferencia en el comportamiento de *A. nidulans* con respecto a su respuesta frente al Ácido Naftalenacético, en comparación con el comportamiento de *A. parasiticus*. Considerando que *A. nidulans* es usado como un modelo fúngico en muchos estudios, con estos resultados se ilustra el cuidado que se debe tener al inferir su comportamiento a otras especies de hongos. La misma diferencia se ha reportado para la respuesta a la 2,4-Diaminobutanona (Guzmán de Peña *et al*, 1998).

8. Los controles de los diferentes experimentos realizados mostraron una alta variación en los procesos de esporulación y síntesis de micotoxinas. El crecimiento fue una variable más constante. Se considera que parte de dicha variación es debida a condiciones intrínsecas de los hongos, por lo que se sugiere utilizar no menos de cinco repeticiones por tratamiento. Las metodologías de extracción de micotoxinas y cosecha de esporas también deben estar perfectamente estandarizadas.

VIII. LIERATURA REVISADA

- Aldridge, D.C., Galt, S., Giles, D., and Turner, W.B. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. pp 1623-1627.
- Bahk, J. and Marth, E.H. 1983. Aflatoxin production is inhibited by selected herbal drugs. Mycopathologia 83:129-134.
- Bandurski, R.S., Cohen, J.D., Slovin, J.P., and Reinecke, D.M. 1995. Hormone biosynthesis and metabolism. In: Davies, P.J. (ed). Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. pp 39-65.
- Batt, C., Solberg, M., and Ceponis, M. 1980. Inhibition of aflatoxin production by carrot root extract. J. Food Sci. 45:1210-1213.
- Batt, C., Solberg, M., and Ceponis, M. 1983. Effect of volatile components of carrot seed oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J. Food Sci. 48:762-768.
- Bennett, J.W., Lee, L.S., and Gaar, G.G. 1978. Effect of acetone on production of aflatoxins and versicolorin pigments by resting cell cultures of *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia 58:9-12.
- Biing-Hui, L. and Fun-Sun, C. 1998. Regulation of aflR and its products, aflR, associated with aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 64:3718-3723.
- Bilgrami, K.S., Misra, R.S., Sinha, K.K., and Singh, P. 1980. Effect of some wild and medicinal plant extracts on aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* in liquid culture. J. Indian Bot. Soc. 59:123-126.
- Bilgrami, K.S., Misra, R.S., Sinha, K.K., and Singh, P. 1982. Prevention of aflatoxin production on some cereals and oil seeds by o-vainillin. Current Sci. 51:138.

- Brown, D.W., Hauser F.M., Tommasi R., Corlett S, and Salvo J.J. 1993. Structural elucidation of a putative conidial pigment intermediate in *Aspergillus parasiticus* spores. *Tetrahedron Lett.* 34:419-422.
- Brown, D.W., and Salvo J.J. 1994. Isolation and characterization of sexual spore pigments from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:979-983.
- Brown, D.W., Yu, J-H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H., and Leonard, T.J. 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocistin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1418-1422.
- Buchanan, R.L. and Fletcher, A.M. 1978. Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. *J. Food Sci.* 43:654-655.
- Bulleman, L.B., Lieu, F.Y., and Seiler, S.A. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 42: 1107-1116.
- Burow, G.B., Nesbitt, T.C., Dunlap, J., and Keller, N.P. 1997. Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:380-387.
- Cohen, Y., Gisi, U., and Niderman, T. 1993. Local and Systemic Protection Against *Phytophthora infestans* Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl Ester. *Phytopathology* 83:1054-1062.
- Chomczynski, P. 1993. A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *BioTechniques* 15: 532-536.
- Davies, N.D. and Diener, U.L. 1967. Inhibition of aflatoxin synthesis by p-aminobenzoic acid, potassium sulfate, and potassium fluoride. *App. Microbiol.* 15:1517-1518.

- Davies, P.J. (ed). 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. 833 pp.
- Deboo, G.B., Albertsen, M.C., and Taylor, L.P. 1995. Flavone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinate in maize anthers. *Plant Journal* 7:703-713.
- Dowd, P.F., Mehta, A.D., and Boston, R.S. 1998. Relative toxicity of the maize endosperm ribosome-inactivating protein to insects. *J. Agric. Food Chem.* 46:3775-3779.
- Du, W., Huang, Z., Flaherty, J., Wells, K., and Payne, G.A. 1999. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:834-836.
- Felle H., Peters, W., and Palme, K. 1991. The electrical response of maize to auxins. *Biochim. Biophys. Acta* 1064:199-204.
- Fennell, D.I., Bothast, R.J., Lillehoj, E.B., and Peterson, R.E. 1973. Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin. *Cereal Chem.* 50:404-414.
- Fong, F., Smith, J.D., and Koehler, D.E. 1983. Early events in maize seed development. *Plant Physiol.* 73:899-901.
- Gardner, H.W. 1995. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. *HortScience* 30:197-205.
- Ghosh, J. and Haggblom, P. 1985. Effect of sublethal concentrations of propionic or butyric acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2:323-330.
- Goldblatt, L.A. (ed). 1968. *Aflatoxins: Scientific Background, Control and Applications*. Academic Press. New York.

- Goodrich-Tanrikulu, M., Mahoney, N.E., and Rodriguez, S.B. 1995. The Plant Growth Regulator Methyl Jasmonate Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 141:2831-2837.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., and Murfett, J. 1998. How Does Auxin Turn On Genes?. *Plant Physiol.* 118:341-347.
- Guyon, V.N., Astwood, J.D., Garner, E.C., Dunker, A. K., and Taylor, L.P. 2000. Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia. *Plant Physiol.* 123:699-710.
- Guzmán-de-Peña D. 1996. Regulación de la síntesis de micotoxinas durante el desarrollo de *Aspergilli*. Tesis doctoral. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Departamento de Genética y Biología Molecular. 164p.
- Guzmán-de-Peña, D., Anguiano, G.L., and Medina, J.J. 1992. Modification of the meted 1 AOAC (CB-Method) for the detection of aflatoxins. *Bull. Environ. Conyam. Toxicol.* 49:485-489.
- Guzmán-de-Peña, D., Aguirre, J., and Ruiz-Herrera, J. 1998. Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:199-205.
- Guzmán-de-Peña, D. and Ruiz-Herrera, J. 1997. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Gen. Biol.* 21:198-205.
- Haagen-Smit, A.J., Dandliker, W.B., Wittwer, S.H., Mumeek A.E. 1942. Isolation of 3-indole acetic acid from immature corn kernels. *Am J. Bot* 29:500-506.
- Hagen, G. 1995. The Control of Gene Expression by Auxin. In: Davies, P.J. (ed). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. pp 228-245.

- Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. 1985. Rapid Induction of Selective Transcription by Auxins. *Mol. Cel. Biol.* 5:1197-1203.
- Halverson, L.J. and Stacey, G. 1986. Signal Exchange in Plant-Microbe Interactions. *Microbiol Reviews* 50: 193-225.
- Hartley, M.R, Chaddock, J.A., and Bonness, M.S. 1996. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends Plant Sci.* 1:254-260.
- Hicks, J.K., Yu, J-H, Keller N.P., and Adams T.H. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of FadA Gα protein-dependent signaling pathway. *EMBO Journal* 16:4916-4923.
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S., and Kurata, H. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:818-822.
- Hobbie, L., Timpfe, C., and Estelle, M. 1994. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol. Biol.* 26:1499-1519.
- Hsieh, D.P.H. and Mateles R.I. 1971. *Appl. Microbiol.* 22:79-83.
- Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19:33-131.
- Karapinar, M. 1985. The effect of citrus oils and some spices on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Int. J. Food Microbiol.* 2:239-245.
- Keller, N.P. and Hohn, T.M. 1997. Metabolic Pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Gen. Biol.* 21:17-29.
- Keller, N.P., Kantz, N.J., and Adams, T.H. 1994. *Aspergillus nidulans* var A is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1444-1450.

- Keller N.P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D., and Burow, G.B. 1997. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87:643-648.
- Khai-Huynh, Q., Borgmeyer, J.R., and Zobel, J.F. 1992. Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 182:1-5.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., and Mol, J.N.M. 1984. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16:123-132.
- Kraybill, H.F. and Shapiro, R.E. 1969. Implications of Fungal Toxicity to Human Health. In: Goldblatt, L.A. (ed). *Aflatoxin: Scientific Background, Control and Implications.* Academic Press USA. pp 401-441.
- Krogh, P. 1977. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. *Pure and Appl. Chem.* 49:1719-1721.
- Letham, D.S. 1963. Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sci.* 2:569-573.
- Letham, D.S. and Miller, C.O. 1965. Identity of kinetin-like factors from *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.* 6:355-359.
- Libbenga, K.R. and Mennes, A.M. 1995. Hormone Binding and Signal Transduction. In: Davies, P.J. (ed). *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Kluwer Academic Publishers. U.S.A. pp 272-297.
- Lindsey, D.L. and Turner, R.B. 1975. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and *Trichoderma viride* by peanut embryos. *Mycopathologia* 55:149-152.
- Linskens, H.F. and Pfahler, P.L. 1973. Biochemical composition of maize (*Zea mays* L.) pollen. III. Effects of allele X storage interactions at the waxy (wx), sugary (su) and shrunken (sh) loci on the amino acid content. *Theor. Appl. Genet.* 43:49-53.

- Madhyastha, M.S. and Bhat, R.V. 1984. *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:376-379.
- Mallozzi, M.A.B., Correa, B., Haraguchi, M., and Neto, F.B. 1996. Effect of flavonoids on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Rev. Microbiol.* 27:161-165.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. 545p.
- Marsh, S.F. and Payne, G.A. 1984a. Scanning EM studies on the colonization of dent corn by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74:557-561.
- Marsh, S.F. and Payne, G.A. 1984b. Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74:1284-1289.
- Mayne, R.Y., Bennett, J.W., and Tallant, J. 1971. Instability of aflatoxin producing strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 63:644-648.
- Meyer, A., Miersch, O., Büttner, C., Dathe, W., and Sembdner, G. 1984. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Reg.* 3:1-8.
- Meyer, D.M., Obrian, G., Du, W.L., Bhatnagar, D., and Payne, G.A. 1998. Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Appl. Environ Microbiol.* 64:3713-3717.
- Neucere, J.N. and Zeringue, H.J. 1987. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth by fractions of salt-extracted proteins from maize kernel. *J. Agric. Food Chem.* 35:806-808.
- Nielsen, K. Payne, G.A., and Boston, R.S. 2001. Maize ribosome-inactivating protein inhibits normal development of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 14:164-172.
- Norton, R.A. 1997. Effect of carotenoids on aflatoxin B₁ synthesis by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 87:814-821.

- Norton R.A. 1999. Inhibition of aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus flavus* by anthocyanidins and related flavonoids. *J. Agric Food Chem.* 47:1230-1235.
- Pfahler, P.L. and Linskens, H.F. 1971. Biochemical composition of maize (*Zea mays* L.) pollen. II. Effects of the endosperm mutants, waxy (wx), shrunken (sh) and sugary (su) on the carbohydrate and lipid percentage. *Theor. Appl. Genet.* 41:2-4.
- Pfahler, P.L. and Linskens, H.F. 1974. Ash percentage and mineral content of maize (*Zea mays* L.) pollen and style. I. Genotypic effects. *Theor. Appl. Genet.* 45:32-36.
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B., Reinbothe, C. 1994. JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by Jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell* 6:1197-1209.
- Ryan, C.A. 2000. The Systemin Signaling Pathway: Differential Activation of Plant Defensive Genes. *Bioch. Biophys. Acta* 1477:112-121.
- Sembdner, G. and Parthier, B. 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:569-589.
- Sharp, J.K., Valent, B., and Albersheim, P. 1984. Purification and Partial Characterization of a β -Glucan Fragment That Elicits Phytoalexin Accumulation in Soybean. *J. Biol. Chem.* 259: 11312-11320.
- Sinha, K.K. 1985. Screening of chlorophyllous plants against aflatoxin production and aflatoxin producing fungi. *J. Food Science Tech.* 22:225-228.
- Skromne, I., Sánchez, O., and Aguirre, J. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brIA regulatory gene. *Microbiology* 141:21-28.
- Soave, C., Tardani, L., Di-Fonzo, N., and Salamini, F. 1981. Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the *opaque-2* and *opaque-6* loci. *Cell* 27:403-410.

- Stripe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., and Lappi, D.A. 1992. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10:405-412.
- Taylor, L.P. and Briggs, W.R. 1990. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *Plant Cell* 2:115-127.
- Toshikazu, T. 2001. Perception of pathogen signals to initiate active defense. In: Keen, N.T., Mayama, S., Leach, J.E., and Tsuyumu, S.(eds). *Delivery and perception of pathogen signals in plants*. APS Press. Minnesota USA. pp 1-11.
- Uraih, N. And Chipley, J.R. 1976. Effects of various acids and salts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* NRRL 3145. *Microbios* 17:51-59.
- Walker-Simmons, M., Jin, D., West, C.A., Hadwiger, L. and Ryan, C.A. 1984. Comparison of Proteinase Inhibitor-Inducing Activities and Phytoalexin Elicitor Activities of a Pure Fungal Endopolygalacturonase, Pectic Fragments, and Chitosans. *Plant Physiol.* 76:833-836
- Wang, J-S. and Groopman, J.D. 1999. DNA Damage by Mycotoxins. *Mutation Res.* 424:167-181.
- Windstrom, N.W. 1992. Aflatoxin developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. In: Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., and Arora, D.K. (eds). *Handbook of Applied Mycology. Vol 5: Mycotoxins in Ecological System*. Marcel Dekker, Inc. USA. pp 23-58.
- Wotton, H.R. and Strange, R.N. 1985. Circumstantial evidence for phytoalexin involvement in the resistance of peanuts to *Aspergillus flavus*. *J. Gen. Microbiol.* 131:487-494.
- Wright A.D., Sampson M.B., Neuffer M.G, Michalczuk L., Pemise-Slovin J., and Cohen J.D. 1991. Indole-3-Acetic Acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* 254:998-1000.

- Yu, J-H., Rosén, S., and Adams, T.H. 1999. Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the *Aspergillus* FlbA regulator of G-protein signaling domain protein. *Genetics*. 151:97-105.
- Zaika L.I. and Buchanan R.L. 1987. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxins. *J. Food Protect.* 50:691-708.

APÉNDICE A

Efecto (inhibitorio, estimulador o sin efecto) de los diferentes reguladores de crecimiento sobre las cepas *A. nidulans* FGSC-26, *A. parasiticus* Ap³⁻⁵ y *A. parasiticus* ATCC 16992, en cualquiera de las concentraciones evaluadas en este estudio.

<u>Cepa</u> Regulador de crecimiento	Efecto sobre los procesos metabólicos de:		
	Crecimiento	Esporulación	Micotoxinas
<u>A. nidulans</u> FGSC-26			
2,4-D (sal de Na)	Sin efecto	Inhibitorio	Sin efecto
AG ₃ (forma pura)	Sin efecto	Sin efecto	Estimulador
AG ₃ (sal de K)	Inhibitorio	Sin efecto	Inhibitorio
AIA (forma pura)	Inhibitorio	Inhibitorio	Sin efecto
AIA (sal de Na)	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
AIB (forma pura)	Inhibitorio	Sin efecto	Sin efecto
AIB (sal de K)	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
Ácido Jasmónico	Sin efecto	Inhibitorio	Sin efecto
ANA (forma pura)	Inhibitorio	Inhibitorio	Inhibitorio
ANA (sal de K)	Inhibitorio	Inhibitorio	Inhibitorio
<u>A. parasiticus</u> Ap³⁻⁵			
AG ₃ (forma pura)	Sin efecto	Sin efecto	No evaluado

ANA (forma pura)	Inhibitorio	Inhibitorio	No evaluado
ANA (sal de K)	Inhibitorio	Inhibitorio	No evaluado

A. parasiticus ATCC 16992

2,4-D (sal de Na)	Inhibitorio	Inhibitorio	Inhibitorio y estimuladorio
AG ₃ (forma pura)	Sin efecto	Sin efecto	Estimuladorio
AIB (sal de K)	Inhibitorio	Estimuladorio	Inhibitorio
ANA (forma pura)	Inhibitorio	Estimuladorio	Estimuladorio
ANA (sal de K)	Inhibitorio	Estimuladorio	Inhibitorio

2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético); AG₃ (Ácido Giberélico); AIA (Ácido Indolacético);
AIB (Ácido Indolbutírico); ANA (Ácido Naftalenacético).

Es de hacer notar que cuando los reguladores de crecimiento utilizados tuvieron algún efecto, la mayoría fue inhibitorio. Solo la forma pura del AG₃ se tuvo un efecto estimuladorio en la síntesis de micotoxinas a las concentraciones evaluadas, tanto en *A. nidulans* como en *A. parasiticus*. Igualmente el efecto fue estimuladorio en la esporulación de la cepa *A. parasiticus* ATCC 16992 cuando se utilizaron el ANA (puro y en forma de sal de Potasio) y AIB (sal de Potasio). Tanto la sal de Sodio del 2,4-D como la forma pura del ANA también tuvieron efecto estimuladorio en la síntesis de aflatoxinas, pero sus resultados no fueron consistentes.



