

Análisis de la actividad enzimática de peroxidasas en maíces nativos de Oaxaca infectados por *Aspergillus parasiticus*

RESUMEN: El maíz es el cereal de mayor consumo en México y durante su crecimiento está expuesto a diferentes condiciones como cambios de temperatura, humedad, salinidad o ataque de patógenos, generando pérdidas económicas y daños a la salud de los consumidores. Las peroxidasas son enzimas de respuesta en plantas cuando son sometidas a estrés por factores físicos, químicos o biológicos. En el presente estudio se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de enzimas peroxidasas en coleóptilos y raíces de cinco muestras de maíces nativos de Oaxaca infectados con *Aspergillus parasiticus*. Se realizó la extracción de proteínas totales utilizando un buffer con tris-HCl, β -mercaptoetanol y NaCl; la cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford y la actividad peroxidasa se determinó mediante el ensayo dependiente de DTT.

En las pruebas realizadas, en tres de las cinco muestras, hubo una disminución en la concentración de proteínas totales tanto en coleóptilo de maíz como en raíz y en el ensayo de actividad peroxidasa, la actividad enzimática fue mayor en cuatro de las cinco muestras en coleóptilos y raíces de maíces infectados con *A. parasiticus*, obteniendo una respuesta de estas enzimas en maíz ante la infección por *Aspergillus*.

PALABRAS CLAVE: Enzimas, peroxidasas, *Aspergillus parasiticus*, Bradford, DTT.



Colaboración

Carlos Francisco Varapizuela Sánchez; Marco Antonio Sánchez Medina; Alma Dolores Pérez Santiago, Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Oaxaca

ABSTRACT: Maize is the cereal with the highest consumption in Mexico and during its growth it is exposed to different conditions such as changes in temperature, humidity, salinity or attack of pathogens, generating economic losses and damage to the health of consumers. Peroxidases are response enzymes in plants when they are subjected to stress by physical, chemical or biological factors. The present study shows the results obtained from the evaluation of peroxidase enzymes in coleoptils and roots of five samples of native maize from Oaxaca infected with *Aspergillus parasiticus*. Total protein extraction was performed using a buffer with tris-HCl, β -mercaptoethanol and NaCl; Protein quantification was performed using the Bradford technique and peroxidase activity was determined by DTT-dependent assay.

In the tests carried out, in three of the five samples, there was a decrease in the concentration of total proteins in both corn and root coleoptile and in the peroxidase activity test, the enzymatic activity was higher in four of the five samples in coleoptiles and maize roots infected with *A. parasiticus*, obtaining a response of these enzymes in maize to *Aspergillus* infection.

KEYWORDS: Enzymes, peroxidases, *Aspergillus parasiticus*, Bradford, DTT.

INTRODUCCIÓN

El maíz es el principal producto agrícola de México, en el país, a la fecha se conocen 64 razas, denominadas "razas criollas o nativas", que son resultado de la manipulación tradicional de los campesinos y de la variabilidad ambiental presente en los numerosos nichos ecológicos en que se cultivan, lo que contribuye a la conservación y a la generación de la diversidad genética del cultivo, llegando a formarse nuevos tipos, variedades o razas [1,2].

Debido a la situación geográfica en que se ubica, Oaxaca posee una alta variación genética en el cultivo del maíz, alta variación climática, topografía variada, diferentes tipos de suelos, facilidad de entrecruzamiento de esta especie y principalmente al gran número de grupos étnicos que han formado diferentes variedades nativas mediante selección a través de miles de años [3]. La diversidad de maíz localizada en el estado (35 razas) representa el 55 % de la diversidad reportada para México. En Oaxaca el maíz tiene una diversidad de colores de grano, predominando el color blanco con el 62.9% de las muestras, le sigue el amarillo con el 20.1%, el azul con 7%, negro con 3.4%, naranja con 2% y rojo con 1.4%; además, existe un 2.75% de colectas que no tienen reportes [4]. El maíz durante su crecimiento y en almacenamiento está expuesto a ser contaminado por hongos, principalmente *Aspergillus parasiticus* y *A. flavus*, que bajo condiciones óptimas de crecimiento producen aflatoxinas, siendo la aflatoxina B1 el carcinógeno natural más potente conocido en la actualidad [5,6]. Estudios para comprender el mecanismo de resistencia de maíz contra la infección por *A. flavus* y la contaminación por aflatoxinas indican que las proteínas son el factor que mayormente contribuye a la resistencia [7,8]. La resistencia del grano podría deberse no solo a la presencia de altos niveles de proteínas antifúngicas, sino también a altos niveles de proteínas relacionadas al estrés y proteínas de almacenamiento que captan agua con facilidad [9]. Las peroxidases catalizan la reducción de peróxidos tóxicos para la célula haciéndolo inofensivo, reduciéndolo y haciéndolo inofensivo cuando las plantas están en condiciones normales y bajo estrés [10, 11]. A la fecha, no hay trabajos que evalúen la actividad de estas enzimas en maíces oaxaqueños, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad enzimática de peroxidases en maíces nativos de Oaxaca en diferentes etapas de crecimiento de la planta, con la finalidad de conocer el comportamiento de estas enzimas de respuesta al estrés ante la infección por *Aspergillus parasiticus* [12].

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Alimentos del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Oaxaca ubicado en la Avenida Ing. Vico Bravo Ahuja No. 125, esquina Calzada Tecnológico, en Oaxaca de Juárez, Oaxaca.

Cepa de *Aspergillus parasiticus*.

Para los ensayos con *A. parasiticus* se utilizó la cepa ATCC 16992 donada por la Dra. Doralinda Guzmán Ortiz, jefa del laboratorio de micotoxinas del CINVESTAV Unidad Irapuato. En condiciones de esterilidad, se inocularon por plaqueo 0.1 ml de una solución concentrada de esporas de 5×10^7 esporas/ml en placas con medio PDA (agar papa-dextrosa) y se incubaron durante 7 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en una incubadora INDELAB IDL-CD-80. Se recuperaron las esporas en agua con tritón al 0.01% y se almacenaron a 5°C hasta su utilización.

Obtención de coleoptilos y raíces de maíz.

Se utilizaron cinco muestras de maíz (numeradas del 1 al 5) de tres razas diferentes: dos de raza vandeño (muestras 1 y 4), dos de raza arrocillo (2 y 3) y una de raza elote cónico (5) (Tabla 1). Para la obtención de coleoptilos y raíces se desinfectaron 30 semillas de cada muestra en alcohol etílico al 70% durante 10 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. En condiciones de esterilidad, se colocaron 5 granos de cada muestra en una caja Petri con una cama de algodón y papel filtro humedecidos. Tres placas se utilizaron como controles sanos y tres más se inocularon con 50 μl de una suspensión de esporas de *A. parasiticus* a cada grano. Las placas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante siete días.

Tabla 1. Muestras de maíces nativos de Oaxaca.

Número de muestra	Raza	Color	Lugar de procedencia
1	Vandeño	Amarillo	Santa Cruz Mixtepec
2	Arrocillo	Morado	Zimatlán de Álvarez
3	Arrocillo	Blanco	San Antonio Huitepec
4	Vandeño	Naranja	Tlahuitoltepec
5	Elote cónico	Rojo	San Antonio Huitepec

Extracción y cuantificación de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó por maceración utilizando el buffer de extracción [9] con una relación 1:1 (p/v) y centrifugando las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se cuantificaron por triplicado mediante la técnica de Bradford utilizando una curva estándar de BSA (Albúmina de suero bovino) (Figura 1), la ecuación de regresión lineal fue: $y = 0.0043x + 0.0198$ con un coeficiente de correlación de 0.9903, por tanto, la ecuación indicó una alta relación entre las variables. Los extractos fueron almacenados a -20°C en un congelador FRIGIDAIRE hasta su utilización.

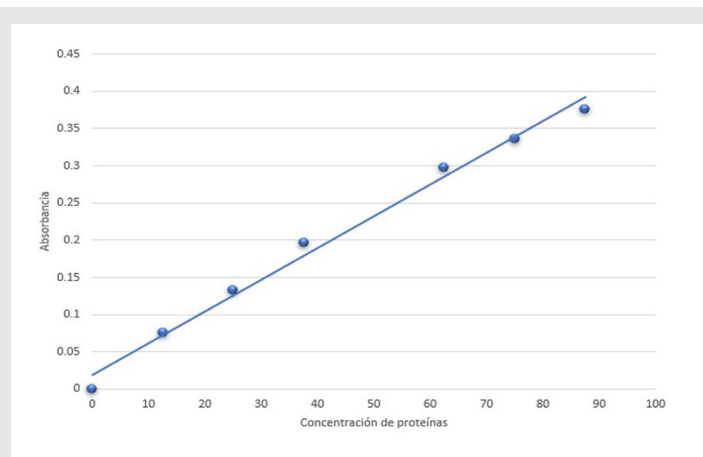


Figura 1. Curva estándar de proteínas utilizando BSA.

Ensayo de actividad enzimática de peroxidasa.

El ensayo se basó en la capacidad que tienen las peroxidasa de utilizar al DTT como donador de electrones y poder reducir hidropéroxidos, utilizando la técnica reportada por [13] con algunas modificaciones. Se inició el ensayo con una mezcla de pre incubación a 37 °C durante 10 minutos que contenía en un volumen de 600 µl, 50 µM de tris-HCl pH 8.0, 4 mM de DTT y 200 µg de extracto de proteínas de cada muestra (coleoptilo y raíz). Posteriormente se añadieron 600 µl de una solución de 100 µM de H₂O₂ y se incubó la reacción 10 minutos a 37 °C. El precipitado de proteínas se eliminó mediante centrifugación de 3 minutos a 500 rpm y se añadió a la reacción 400 µl de sulfato ferroso amónico 10 mM y 200 µl de tiocianato de potasio 2.5 M, los cuales reaccionan con el hidropéroxido remanente y forman un complejo color púrpura. La concentración de peróxido se determinó espectrofotométricamente a 480 nm en un equipo SPECTRONIC 20D utilizando una curva estándar de H₂O₂.

RESULTADOS

Aspergillus parasiticus.

A. parasiticus en medio PDA de 7 días de incubación a 28 ± 2°C, tuvo un crecimiento abundante, de color verde oscuro y de tipo algodónoso [12] (Figura 2).

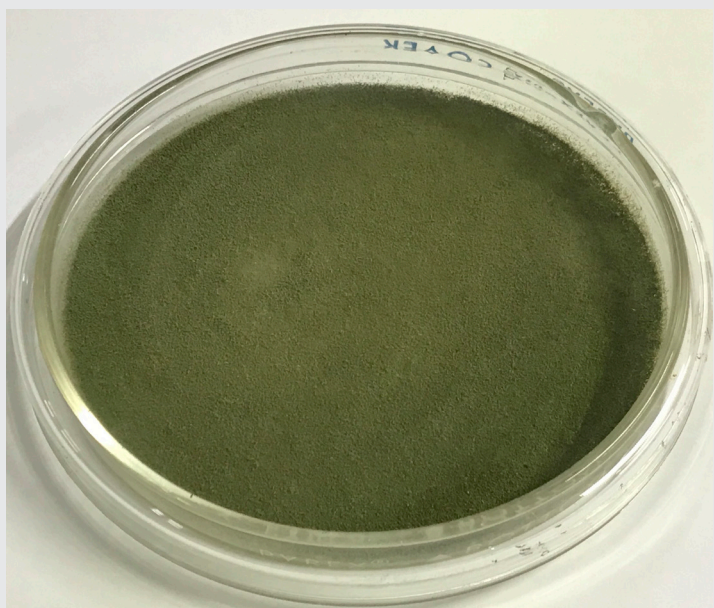
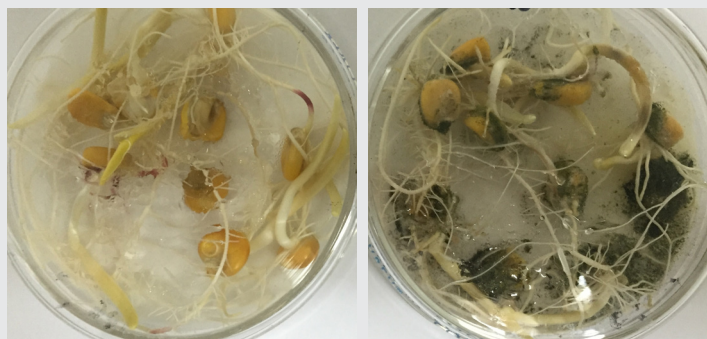


Figura 2. Crecimiento de *Aspergillus parasiticus* en medio PDA de 7 días de incubación a 28 ± 2°C.

Obtención de las muestras de coleoptilo y raíz.

Los coleoptilos de maíz de 7 días de incubación a 28 ± 2°C en las muestras sin hongo, presentaron un crecimiento regular, con coleoptilos de color amarillo y en algunas partes hialinos (Figura 3a). En las muestras infectadas con A. parasiticus, el crecimiento fue menor, además de que presentaron partes enfermas de color café a negro y crecimiento del hongo sobre los granos de maíz (Figura 4b).



(a) Coleoptilo sano

(b) Coleoptilo infectado

Figura 3. Coleoptilos de maíz sanos e infectados con *Aspergillus parasiticus*.

Cuantificación de proteínas totales.

Se realizó la cuantificación de proteínas totales de las muestras de maíz (Tabla 2). Las muestras 1, 2 y 4 disminuyen su concentración de proteínas totales en coleoptilos infectados, a diferencia de las muestras sanas y sin presencia del hongo.

Tabla 2. Concentración de proteínas totales en coleoptilos de maíz.

Concentración de proteínas mg/ml		
Muestra	Sano	Infectado
1	5.23	5.06
2	6.08	4.50
3	4.64	5.48
4	4.69	2.44
5	4.88	5.17

En los resultados de la cuantificación de proteínas totales en raíces de maíz (Tabla 3), las muestras 1, 2 y 4 presentaron menor concentración de proteínas en raíces en presencia de *Aspergillus*, a diferencia de las muestras 3 y 5, teniendo el mismo comportamiento que las muestras de coleoptilo de maíz, donde estas mismas muestras disminuyeron su concentración de proteínas en presencia del hongo.

Tabla 3. Concentración de proteínas totales en raíces de maíz.

Concentración de proteínas mg/ml		
Muestra	Sano	Infectado
1	4.79	4.39
2	4.00	3.20
3	4.96	5.50
4	4.26	3.12
5	3.98	4.43

Actividad peroxidasa en coleoptilos y raíces de maíz.

Se analizó la capacidad destoxicadora de los extractos de proteínas de coleoptilo y de raíz de maíz hacia el H₂O₂. En cuanto a la actividad enzimática en coleoptilos de maíz, tres de las cinco muestras presentaron mayor actividad peroxidasa en coleoptilos de maíz infectados con A. parasiticus, las cuales fueron las mues-

tras 3, 4 y 5, sin embargo, solo en las muestras 3 y 5 la diferencia fue significativa. La muestra 1 presentó mayor actividad en el coleoptilo sano, pero no hubo diferencia significativa con el coleoptilo infectado, mientras que la muestra 2 tuvo valores de reducción de hidróperóxido muy bajos en comparación con las demás muestras (Figura 4).

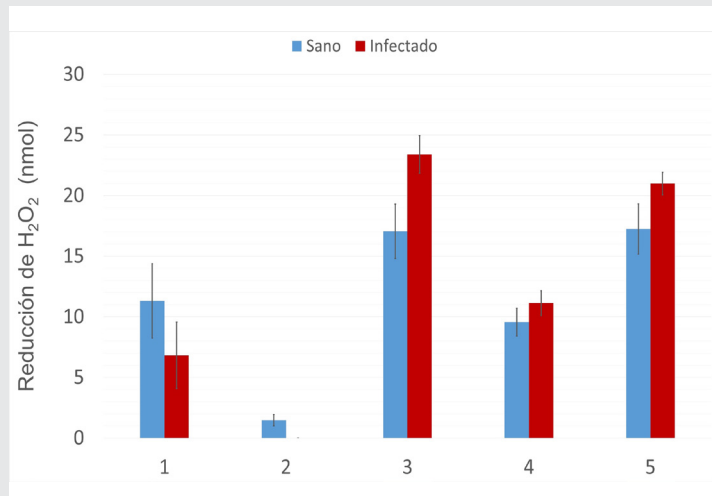


Figura 4. Reducción de H₂O₂ en muestras de coleoptilos de maíz sanos e infectados con *Aspergillus parasiticus*.

En el análisis enzimático de los extractos de raíz, las cinco muestras presentaron una diferencia significativa mayor en la actividad peroxidasa en las raíces infectadas con *A. parasiticus* a diferencia de los controles sanos, superando al menos tres muestras los niveles de reducción de H₂O₂ de las muestras de coleoptilo maíz (Figura 5).

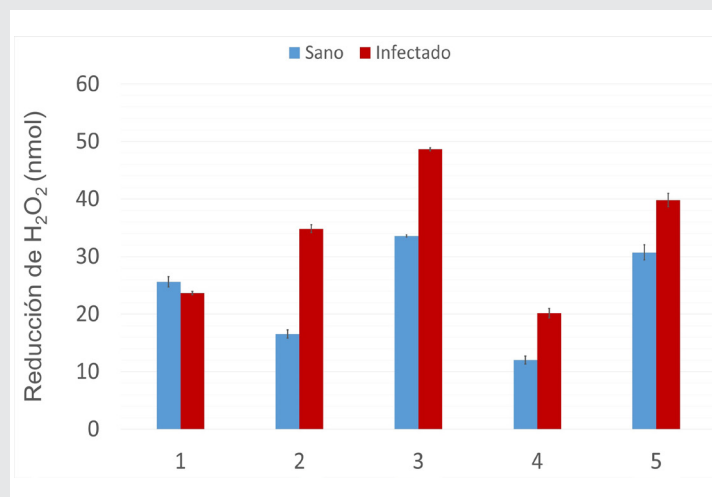


Figura 5. Reducción de H₂O₂ en muestras de raíces sanas e infectadas con *Aspergillus parasiticus*.

Tanto los extractos de coleóptilo de maíz como de raíz, presentaron una alta variabilidad de los resultados de la actividad enzimática de peroxidasa. Las muestras 3, 4 y 5, presentaron mayor actividad enzimática tanto en coleóptilo como en raíz, a diferencia de las muestras

1 y 2, esto puede deberse al lugar de procedencia de las muestras, ya que provienen de diferentes regiones geográficas del estado, propiciando que los mecanismos de respuesta sean distintos en cada caso.

CONCLUSIONES

Se evaluó la capacidad de enzimas peroxidasa en coleoptilos y raíces de maíces nativos de Oaxaca como respuesta a la infección por *Aspergillus parasiticus*. En tres de las cinco muestras, tanto en coleoptilos como en raíz, se mostró una disminución en la concentración de proteínas totales en maíces infectados con el hongo.

En el análisis de actividad peroxidasa, tres muestras de coleoptilo de maíz, tuvieron mayor actividad enzimática en las muestras infectadas que en las muestras sanas, y en muestras de raíz, cuatro aumentaron su actividad de peroxidasa en raíces infectadas con el hongo, obteniendo mayor reducción de peróxidos que los extractos de coleoptilos de maíz, obteniendo una respuesta de estas enzimas al estrés generado por *A. parasiticus* en esa etapa de crecimiento de la planta.

Este trabajo sienta las bases para continuar realizando la búsqueda de la expresión de proteínas de respuesta al estrés bajo condiciones bióticas y abióticas en maíces nativos de Oaxaca, con la finalidad de identificar razas de maíz que se adapten mejor a condiciones adversas de crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. De la Torre, D. A. P. (2016). *Estas son las 64 razas de maíz en México*. Obtenida el 16 de mayo del 2016 de la página electrónica: <https://masdemx.com/2016/05/estas-son-las-64-razas-de-maiz-en-mexico/>
- [2]. Romero, P., A., Hernández, J., M., León M., A., Sangermán-Jarquín D. Ma. (2015). *Impacto en el mercado mexicano de maíz en ausencia de políticas de producción de biocombustibles en Estados Unidos de América*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6(5), 1023-1033.
- [3]. Massieu, T. Y., & Lechuga, M. J. (2002). *El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo*. *Revista Análisis Económico*. 17(36), 281-303.
- [4]. Aragón-Cuevas F. (2006). *Actualización de la información sobre los maíces criollos de Oaxaca*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS002 México D. F.
- [5]. Martínez, P., H., Y., Hernández, D., S., Reyes, M., C., A., Vázquez, C., G. (2013). *El género Aspergillus y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y Perspectivas*.

[6]. Fouad, A., M., Ruan, D., El-Senousey, H., K., Chen, W., Jiang, S., Zheng, C. (2019). Harmful Effects and Control Strategies of Aflatoxin B1 Produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Strains on Poultry: Review. *Toxins*. 11(176). doi:10.3390/toxins11030176

[7]. Brown, R., L., Chen, Z., Y., Warburton, M., Luo, M., Menkir, A., Fakhoury, A., Bhatnagar, D. (2010). Discovery and Characterization of Proteins Associated with Aflatoxin-Resistance: Evaluating Their Potential as Breeding Markers. *Toxinas*. 2, 919-933. doi:10.3390/toxins2040919

[8]. Chen, Z., Y., Brown, R., L., Damann, K., E., Cleveland, T., E. (2004). Identification of a Maize Kernel Stress-Related Protein and Its Effect on Aflatoxin Accumulation. *Phytopathology*. 94(9), 938-945.

[9]. Chen, Z., Y., Brown, R., L., Damann, K., E., Cleveland, T., E. (2007). Identification of Maize Kernel Endosperm Proteins Associated with Resistance to Aflatoxin Contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*. 97(9), 1094-1103. doi:10.1094 / PHYTO-97-9-1094

[10]. Bania, I. & Mahanta, R. (2012). Evaluation of peroxidases from various plant sources. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2(5).

[11]. Padmarajaiah, N., Anantharaman, S., Ashwinee, K., S. (2009) Development and Evaluation of Kinetic Spectrophotometric Assays for Horseradish Peroxidase by Catalytic Coupling of Paraphenylenediamine and Mequinol. *Analytical Sciences*. 25, 1243-1248.

[12]. Kamal, A., J., K., & Beher, D., V. (2002) Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase. *Biochemistry*. 41, 9034-9042.

[13]. Barranco, M., S. (2006). Caracterización bioquímica y molecular de una peroxirredoxina mitocondrial de *Pisum sativum*. Tesis de doctorado. Universidad de Granada. Departamento de bioquímica y biología molecular. CSIC. UNAM. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.14/num12/art53/>