



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DEL CIEMPIÉS *Scolopendra viridis* Say SOBRE PLAGAS Y PATÓGENOS AGRÍCOLAS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

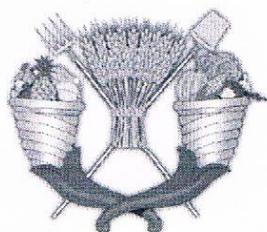
EDGAR ALBERTO HUERTA CASARRUBIAS

Director: Dr. Samuel Ramírez Alarcón.

Asesora: Dra. Lidia González Morales

Asesora: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DEL CIEMPIÉS
Scolopendra viridis Say SOBRE PLAGAS Y PATÓGENOS
AGRÍCOLAS**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

EDGAR ALBERTO HUERTA CASARRUBIAS

Director: Dr. Samuel Ramírez Alarcón.

Asesora: Dra. Lidia González Morales

Asesora: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma



REGION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
CICLO DE EXAMENES PROFESIONALES



La presente tesis titulada “**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DEL CIEMPIÉS *Scolopendra viridis* Say. SOBRE PLAGAS Y PATÓGENOS AGRÍCOLAS**” fue elaborada por el **C. Biol. Edgar Alberto Huerta Casarrubias**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EM CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Director:



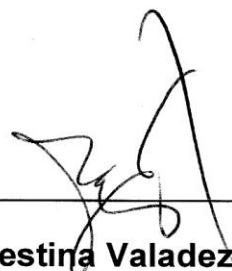
Dr. Samuel Ramírez Alarcón

Asesor:



Dra. Lidia González Morales

Asesor:



Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

Chapingo, Estado de México, Diciembre de 2012

Datos Biográficos

Edgar Alberto Huerta Casarrubias. Nacido en México, Distrito Federal. Concluyó sus estudios de Licenciatura en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, obteniendo el Título de Biólogo.

Realizó el trabajo de investigación: Estudio etnobotánico y poblacional con una propuesta de propagación de la Cola de León (*Sphaeropteris horrida*) en la región de Chicahuales, Chilpancingo Guerrero.

Participó en la elaboración de una Lotería de Plantas Medicinales de Mercados dirigida por la Dra. Alicia Brechú y el M. en C. Armando Gómez Campos con el apoyo de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Impartió la cátedra de Biología a nivel Medio Superior del Colegio Hebreo Maguen David.

Culminó sus estudios de Posgrado en el año 2012 en el programa de Maestría en Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo.

Dedicatoria

La presente investigación está dedicada a Vania, fuente de mi pasión e inspiración de mi corazón. A todos mis compañeros y amigos, con mención especial a Eli Fernández, Pedro Estrella, David Piedra y Olivia Gijón que en todo momento estuvieron presentes en el desarrollo de la misma. Una dedicatoria especial a mi familia que apoyaron incondicionalmente el esfuerzo plasmado en este escrito.

He aprendido a no intentar
convencer a nadie. El
trabajo de convencer es una
falta de respeto, es un intento
de colonización del otro.

...y en Comala comprendí
que al lugar donde has sido
feliz, no debieras intentar
volver.

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero y tutorial brindado al proyecto. Numero de Beca:
- A los asesores Dr. Samuel Ramírez Alarcón, Dra. Lidia González Morales y a la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por todas las aportaciones y sugerencias proporcionadas al proyecto.
- A la Dra. Lidia González Morales por entera participación y apoyo en cada momento del proyecto.
- Al Dr. Nahúm Marbán por las sugerencias y correcciones al escrito y sus aportación a la revisión de la traducción del resumen
- A la Dra. Ernestina Valadez por la donación de las cepas bacterianas
- Al Dr. Gerardo Leyva Mier por la donación de las cepas fúngicas.
- Al Dr. Marcelo Acosta por su apoyo y sugerencias en los seminarios.
- Al M. en C. Juan Vázquez Sánchez por la donación de la cepa de *Salmonella sp.*
- Al M. en C. Luis Emilio Castillo Márquez por su apoyo en la parte estadística.
- A la M. en C. Marisol López por sus sugerencias en la redacción del escrito.
- A mis familiares y amigos que me apoyaron en todo momento y dedicaron un espacio y tiempo al debate de este proyecto.

Lista de abreviaturas

ATCC= American Type Culture Collection

cm= centímetros

CMI= Concentración Mínima Inhibitoria

COP`s= Contaminantes Orgánicos Persistentes

CRISP= Proteínas secretadas ricas en cisteína

Da= Dalton

DL₅₀ = Dosis letal media

DL₁₀₀= Dosis letal cien

FAO = Food Agriculture Organization

g= gramos

GABA= Ácido gama aminobutírico

HPLC= Cromatografía líquida de alta resolución

kDa= KiloDalton

µg= microgramos

µL=microlitros

mL= mililitros

mm=milímetros

nm= nanómetros

pI= Punto isoeléctrico

PLA= Fosfolipasa tipo “A”

S. s. mutilans= *Scolopendra subspinipes mutilans*

SENER Secretaria Nacional de Energía

UACH= Universidad Autónoma Chapingo

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

ÍNDICE

1.ABSTRACT	I
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	6
3.1 BIOLOGÍA DE ESCOLOPENDRAS	6
3.2. COMPONENTES DEL VENENO.....	9
3.3 PROTEÍNAS.....	10
3.4 ENZIMAS	12
3.5 COMPONENTES NO PEPTÍDICOS	13
3.6 ESPECIES SUSCEPTIBLES AL VENENO DE ESCOLOPENDRAS	14
4. OBJETIVOS.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODO	16
5.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
5.1.1 <i>Colecta de ejemplares</i>	16
5.1.2. <i>Extracción de veneno</i>	17
5. 2 BIOENSAYOS ANTIBACTERIANOS.....	17
5. 3 BIOENSAYOS ANTIFÚNGICOS	20
5.4. BIOENSAYOS INSECTICIDAS	21
6. RESULTADOS.....	22
6.1 BIOENSAYOS ANTIBIÓTICOS	22
6.2 BIOENSAYOS ANTIFÚNGICOS.....	25
6.3 BIOENSAYO INSECTICIDA	27
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES.....	35
ANEXO I.....	40
ANEXO II.....	42
ANEXO III.....	44
ANEXO IV	45

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DEL CIEMPIÉS *Scolopendra viridis* Say SOBRE PLAGAS Y PATÓGENOS AGRÍCOLAS

BIOLOGICAL ACTIVITY OF POISON CENTIPEDE *Scolopendra viridis* Say AGAINST AGRICULTURAL PEST AND PATHOGEN

1. Abstract

The centipede has a powerful multitoxic venom that affects a wide variety of organisms. Under laboratory conditions, the crude venom of centipede *Scolopendra viridis* Say extracted by 10 volts electrical stimulation, showed antibiotic activity in growth-inhibition assays against pathogenic Gram-negative bacteria *Salmonella* sp. *Pectobacterium carotovorum*, *P. caticida* and *Erwinia amylovora* in doses of 60, 90 and 120 µg. and against fungal pathogens *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in a dose of 120 µg. The strains *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp. and *Rhizopus stolonifer*. showed no evidence of susceptibility. The venom also exhibited insecticide activity against *Tenebrio molitor* larvae with a LD₅₀ 20.5 µg and *Leptophobia aripa* larvae with a LD₅₀ 25.5 µg. This research suggests the presence of molecules in the *S. viridis* Say venom which could be a new alternative for the agro-industry in order to create new pesticides.

Resumen

El ciempiés tiene un potente veneno multitóxico que afecta a una gran diversidad de organismos. En condiciones de laboratorio, el veneno crudo del ciempiés *Scolopendra viridis* Say extraído por electroestimulación de 10 voltios mostró actividad antibiótica contra las bacterias patógenas *Salmonella* sp. *Pectobacterium carotovorum*, *P. caticida* y *Erwinia amylovora* en dosis de 60, 90 y 120 µg y contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* en una dosis de 120 µg. Las cepas de *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp., y *Rhizopus* sp. no mostraron evidencia de susceptibilidad. El veneno también mostró actividad insecticida sobre larvas de *Tenebrio molitor* con una DL₅₀ 20.5 µg y de larvas de *Leptophobia aripa* con una dosis DL₅₀ de 25.5 µg. Este trabajo propone la presencia de moléculas en el veneno de *S. viridis* Say las cuales pueden ser una nueva alternativa en la industria agrícola para la creación de nuevos plaguicidas

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VENENO DEL CIEMPIÉS *Scolopendra viridis* Say SOBRE PLAGAS Y PATÓGENOS AGRÍCOLAS

Huerta C. E. A., Ramírez A. S., González -Morales. L., Valadez M. E.

2. Introducción

Una de las problemáticas que enfrentan los productores agrícolas en cada ciclo de cultivo, es la presencia de plagas y enfermedades que causan grandes daños a los cultivos. Por ejemplo: la presencia de gusanos que se alimentan de follaje y de granos disminuyen considerablemente el rendimiento del cultivo; los insectos chupadores por su parte, son vectores de virus y fitoplasmas que intervienen en el desarrollo óptimo de las plantas y las plagas del suelo, dañan las raíces y causan heridas permitiendo la entrada de infecciones. Así mismo, las enfermedades fúngicas y bacterianas como los *tizones*, la *antracnosis*, las *cenicillas*, los *mildius*, el *Damping off* y las *podriciones blandas* en diversos cultivos registran incidencias por arriba del 50%, situaciones que de no prevenirse y tratarse de forma eficiente, causan el 100% de pérdidas en grandes extensiones de la superficie cultivada.

Además de la problemática presentada anteriormente, los productos agrícolas son reservorio de patógenos que afectan al humano como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Estos organismos llegan a los vegetales por medio de prácticas agrícolas inadecuadas como el riego con agua

contaminada, el uso de lixiviados de compostas mal elaboradas o la incorporación de estiércol sin procesar, provocando contaminación y graves problemas de salud. Tan solo en 2008 se reportó una incidencia de 114.75 de casos de Fiebre Tifoidea causados por *Salmonella entérica* (Hernández *et al.*, 2011).

La superficie agrícola en México está estimada en 29.9 millones de hectáreas (SAGARPA, 2011), las cuales son tratadas con diversos programas de control fitosanitario que garantizan la inocuidad del material vegetal. Las prácticas agrícolas en diversas partes del territorio, utilizan el método químico como principal herramienta para manejo de plagas y patógenos en campo y postcosecha. En el año 2007, la SENER (Secretaría Nacional de Energía) reportó un consumo de 95 025 toneladas de agroquímicos entre los que destacan los organofosforados, organoclorados, y triazínicos, considerados como contaminantes orgánicos persistentes (COP's) (UNEP, 2007). El uso continuo de estos productos ha provocado un aumentado en los reportes de tolerancia y resistencia en una gran cantidad organismos. De igual forma, se reportan efectos adversos como la contaminación atmosférica, la permanencia de químicos nocivos en suelos y cuerpos de agua (Cheng, 1990; Montes, 1996; Ongley 1996), la bioacumulación en redes tróficas y el envenenamiento directo de animales y humanos (FAO-PNUMA, 2004).

Actualmente, la estrategia política en México relacionada con el uso de insumos agrícolas, consiste en prohibir el uso de compuestos altamente dañinos establecidos en el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2007) y los

productos permitidos deben tener una etiqueta con la información relativa a su toxicidad y uso según lo establecido en la NOM-045-SSA1-1993, NOM-052-ECOL-1993 y la NOM-003-STPS-1999. A pesar de que a nivel mundial se han prohibido doce plaguicidas de alto impacto, en México hasta el año 2005 aún se toleraba el uso de algunos como el paraquat, lindano, paratión, malatión y endosulfán (Muñoz y Ávila, 2005).

Con la finalidad de disminuir los efectos dañinos de los plaguicidas, una gran cantidad de investigaciones se han orientado a encontrar nuevas moléculas que sean inocuas para el ambiente y el humano, que tengan una alta eficacia biológica, sean de fácil aplicación y que se vendan a un bajo costo. Como resultado a dicha búsqueda, en las últimas décadas se han obtenido componentes naturales (bioplaguicidas) que registran un desempeño igual o mayor a los agroquímicos convencionales. Según la FAO (2009), los bioplaguicidas se clasifican en tres categorías: los microorganismos benéficos, las plantas transgénicas y los semioquímicos. Esta última categoría, en sentido amplio, puede incluir sustancias producidas por organismos que tienen un efecto repelente o letal sobre patógenos o plagas agrícolas. En este trabajo se hará mención únicamente a estos últimos.

En los 80`s se descubrieron dos sustancias naturales de importancia agrícola. En 1981 se aisló una sustancia denominada *Cecropina* proveniente de la oruga *Hyalophora cecropia* que registró un efecto antibiótico generalizado, así mismo en 1982 el descubrimiento del *Spinosad* como resultado de la fermentación de *Saccharopolyspora spinosa* abrió la puerta a la investigación de bioplaguicidas.

Diversos estudios *In vitro* demostraron que los extractos de organismos tienen un efecto letal sobre fitopatógenos y plagas agrícolas y en la actualidad se han aislado de diversas plantas, moléculas con propiedades insecticidas que ya se comercializan. Ejemplos de ellas son el Bio-Crack (Alomonas), Bio-Agro (Humus de lombriz) y el Dimilin (Tamez *et al.*, 2001). Otros ensayos *In vitro* como el de Barrera-Necha y Bautista-Baños (2008) proponen extractos y polvos de cítricos con buenas funciones fungicidas.

También se han localizado péptidos con actividades antibióticas e insecticidas en las secreciones de algunos animales, principalmente en los venenos de serpientes, ranas, alacranes, arañas y ciempiés (Steiner *et al.*, 1981, Broekaert *et al.*, 1995, Nicolas y Mor 1995, Ganz y Lehrer 1998 y Bulet *et al.*, 1999), teniendo para el año 2002 un registro de alrededor de 500 péptidos con acción antibiótica (Zasloff, 2002). En general, los venenos animales contienen un coctel de compuestos químicos dirigidos a provocar la muerte de presas o depredadores. Dichos compuestos tienen blancos específicos de acuerdo a su naturaleza y afinidad que al actuar de forma simultánea, causan un efecto multitóxico, interfiriendo en las comunicaciones celulares, causando una parálisis o desestabilizando las membranas celulares produciendo necrosis (Zasloff, 2002). El modo de acción de algunos componentes tóxicos ha mostrado efectos inhibitorios para patógenos, por lo que se han explotado en la industria agrícola para creación de plantas transgénicas, como es el caso del péptido MS-99 derivado de la magainina usado para el control de Sigatoka Amarilla en banano y *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinérea* en tabaco (Chakrabarti *et al.*, 2003); y el péptido MsrA1 derivado de la

cecropina para la inducción de resistencia en papa contra los hongos *Phytophthora cactorum*, *Fusarium solani* y la bacteria *Pectobacterium carotovorum* (Osusky *et al.*, 2000). Uno de los organismos que ha sido poco estudiado pero tiene un veneno potente contra sus presas es el ciempiés.

El veneno de ciempiés ha sido reportado como multitóxico y con efecto sobre una diversidad de organismos como insectos, anfibios, reptiles y mamíferos pequeños que integran su dieta alimentaria. Las especies más grandes y mortales de ciempiés pertenecen al género *Scolopendra* y se encuentran distribuidas en todas las zonas tropicales del mundo incluyendo México. La diversidad de toxinas presentes en su veneno sugiere la existencia de compuestos que pueden ser de utilidad en el sector agrícola para el control de plagas y enfermedades.

3. Antecedentes

3.1 Biología de escolopendras

Las escolopendras son artrópodos (Arthropoda: Myriapoda) que pertenecen a la clase Chilopoda y están dentro del orden Scolopendromorpha. A nivel mundial, según el Catalogo Mundial de Ciempiés (Chilobase), se tienen registradas 94 especies del género *Scolopendra* distribuidas en todas las zonas tropicales y subtropicales del planeta (Elzinga, 1994). En México, se han reportado 8 especies endémicas y 5 (*Scolopendra heros*, *S. sumichrasti*, *S. polymorpha*, *S. gigantea* y *S. viridis*, Say) con una distribución más amplia que se extiende a territorios de Estados Unidos, Centroamérica y Sudamérica. Para fines de este estudio, cabe destacar la presencia de *S. viridis* Say en las zonas húmedas y subhúmedas de México es alta (**Figura 1**).



Figura 1. Distribución de *S. viridis* Say en México. Tomada de Cupul-Magaña, 2007.

Las características morfológicas del Género incluyen, un cuerpo vermiforme epimórfico, formado con una cantidad variable de terguitos o segmentos corporales. Cada segmento tiene un par de patas que presentan una espuela en el tarso. Así mismo, presenta espiráculos laterales en los segmentos 3, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20; en la placa cefálica (cabeza) que se traslapa con el primer terguito, la placa dental es corta (Lewis, 1981; Selley, 2002) y bajo ésta presenta un par de patas modificadas en apéndices venenosos robustos llamadas forcípulas o toxicognatos (Lewis, 1981). *S. viridis* Say se distingue por tener coloración verdosa dorsal con tonalidades amarillas laterales o ventrales, los espiráculos son triangulares y posee 21 segmentos y 20 pares de patas caminadoras con un par de patas terminales con una espuela, la placa cefálica tiene *sulcus* y sus forcípulas tienen un tono amarillo-rojizo (Shelley, 2002) como se muestra en la **Figura 2**.



Figura 2. (A)Ejemplar de *S. viridis* Say con 21 segmentos corporales (se), con una espuela (es) en cada pata terminal. (B) Detalle de cabeza con forcípulas (fc) color amarillo. Foto: Huerta (2012)

Las forcípulas son estructuras en forma de pinza que están constituidas por 4 segmentos (trocanterofemur, tibia, tarso y uña), la parte distal de la uña es puntiaguda y cuenta con receptores para activar la secreción de veneno a través de un poro (Ménez *et al.*, 1990). El veneno proviene de una glándula ubicada en la base del trocanterofemur (Lewis, 1981; Rosenberg y Hiken, 2006) y se conduce al exterior por un tubo quitinoso que termina en la uña. Cada glándula esta formada de células secretoras que producen gránulos de veneno de 24-1600 μm . de diámetro que maduran y son descargados dentro del cuerpo de secreción (Antoniazzi *et al.*, 2009; Ménez *et al.*, 1990) mediante una acción merocrina. El mecanismo de expulsión de veneno se realiza por constricción, la contracción de músculos adyacentes lo conducen al poro de la uña y lo liberan en el tejido de la víctima. Después de la descarga, las glándulas regeneran las células dañadas en el proceso de constricción (Ménez *et al.*, 1990; Rosenberg y Hiken, 2006) (**Figura 3**). El aparato venenoso de los

ciempiés difiere sustancialmente de otros artrópodos tanto en función como en morfológica (Undherim y King, 2011).

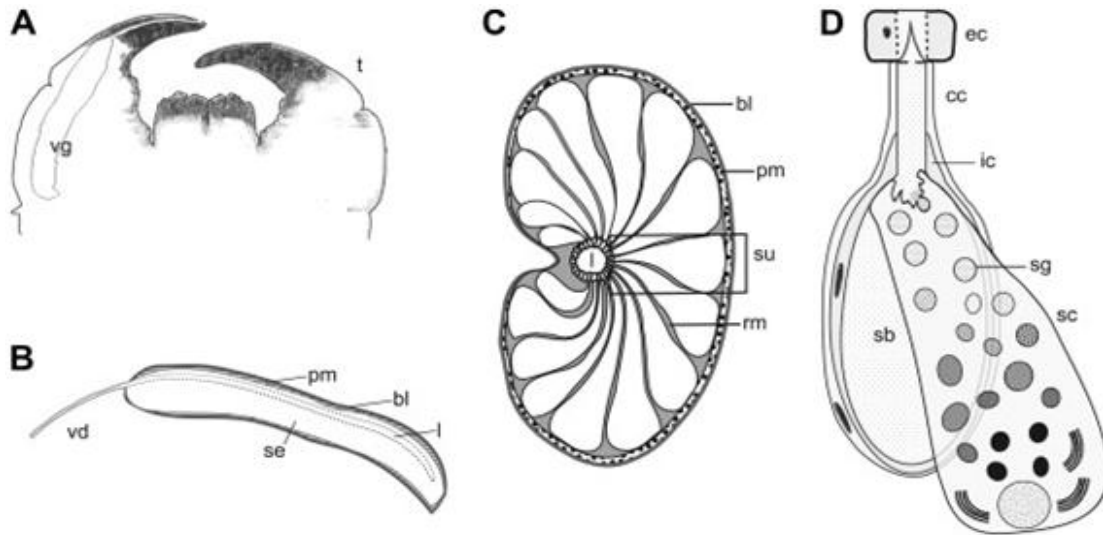


Figura 3. Glándula de veneno de un ciempiés. (A) Ubicación de la glándula (vg) dentro del toxicognato (t). (B) Sección longitudinal de la glándula de veneno donde se muestra el conducto de veneno (vd), el lumen (l) el epitelio secretor (se) rodeado por capa de células musculares (pm) y la lámina basal (bl). (C) Vista transversal de la glándula mostrando las fibras musculares radiales (rm) y las unidades secretoras (su). (D) Representación de una unidad secretora con células epiteliales quitinizadas (ec), células del canal (cc), células intermedias (ic) y células secretoras (sc) conteniendo gránulos secretores (sg) dentro del cuerpo secretor (sb). Diagramas adaptados de Undheim y King, (2011).

3.2. Componentes del veneno

Caracterizaciones del veneno de escolopendras han reportado componentes de naturaleza enzimática, lipídica, amina y protéica. Un análisis comparativo en electroforesis de tres venenos de escolopendromorfos, mostró la presencia de proteínas de rangos de 70kDa hasta casi 200kDa; estas proteínas son de naturaleza polimérica y todas registran un grado de toxicidad (Malta *et al.*, 2008). En otro análisis realizado en un cromatógrafo 2D se encontró que el veneno de *Scolopendra viridicornis nigra* y *S. angulata* contiene 62 y 65 tipos de proteínas respectivamente, con una masa molecular de 13 a 22.6 kDa, agrupadas en 10 familias, nueve de las cuales no mostraron semejanzas con proteínas de la base de datos UnitProt (Rates *et al.*, 2007).

3.3. Proteínas

El veneno de escolopendras contiene moléculas de naturaleza proteica que juegan diversos roles en el proceso de intoxicación y que no necesariamente cumplen con una función enzimática. Los péptidos neurotóxicos son los compuestos más abundantes, dado que proporcionan una manera eficiente de paralizar rápidamente a las presas. El primer efecto directo del veneno de ciempiés sobre el sistema nervioso de un insecto fue descrito por Stankiewicz *et al.* (1999), quien aisló una fracción neurotóxica de alto peso molecular (mayor 80 kDa) de una escolopendra de Brasil. Esta fracción llamada SC1 causó un incremento en contracciones del axón gigante de la cucaracha *Periplaneta americana* debido aparentemente a la formación de poros en la membrana. Posteriormente Gutiérrez *et al.* (2003) registró que una fracción del veneno ordeñado de una escolopendra mexicana aplicada al ganglio ventral abdominal del crustáceo *Cambarellus cambarellus*, estimulaba a la liberación del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA).

Otros estudios dirigidos a determinar la actividad del veneno, han reportado que dosis pequeñas de varias especies entre ellas *S. viridicornis*, causan una parálisis instantánea en moscas, cucarachas y grillos (Rates *et al.*, 2007). Al separar fracciones de éste, usando una HPLC en fase reversa, se registró que seis de las 13 fracciones obtenidas provocaban respuestas fisiológicas como agitación, movimientos rápidos de patas y alas, salivación y pérdida de la locomoción en ejemplares de *Musca domestica*, aunque ninguna de ellas fue letal por separado (Rates *et al.*, 2007). En este mismo estudio, se compararon dos proteínas, una de *S. angulata* y otra de *S. viridicornis*, las cuales tuvieron una secuencia significativamente homóloga a las proteínas con cisteína

(CRISP) de avispas que son las responsables de provocar respuestas alergénicas. Aunque la función en los ciempiés no está determinada, se sabe en general que las CRISP bloquean el flujo de voltaje en los canales de calcio y potasio, induciendo la parálisis del músculo liso (Fry, 2005).

Las proteínas citotóxicas presentes en el veneno de escolopendras son, a diferencia de las neurotóxicas, de bajo peso molecular y carentes de cisteína, altamente catiónicas y tienen un punto isoeléctrico típico (pI) mayor a 8.75 (Khun-Nentwig, 2003). Estudios realizados con las especies *S. multidentis*, *S. subspinipes mutilans* (*S.s. mutilans*), *S. viridicornis* y *S. subspinipes dehaani* (*S. s. dehaani*) han mostrado una actividad sobre eritrocitos y otros cultivos celulares (Gomes *et al.*, 1982b; Malta *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009). Dentro de este grupo de proteínas, están las que atacan el tejido muscular, y que al igual que las PLA2 (fosfolipasas A2) inducen un elevado grado de creatinina quinasa que generan mionecrosis (Lima y Brochetto-Braga, 2003). El efecto en animales pequeños aumenta, ya que se han reportado necrosis generalizada y muerte (Peng *et al.*, 2009).

La principal actividad de los componentes citotóxicos en diversas especies de escolopendras, es de mecanismos inmunes que previenen el consumo y establecimiento de patógenos y mantienen un ambiente aséptico en los conductos de las forcípulas (Undheim y King, 2011). En el veneno de *S. s. mutilans* se han descrito 3 péptidos antimicrobiales. El primero de estos fue la *Scolopendrina I*, un péptido de 4498 Da. el cual mostró actividad letal sobre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y algunos hongos, actividad que se mantuvo a pesar de un tratamiento de preincubación a 100 °C. En este mismo

experimento se determinó que la *Scolopendrina I* no tuvo actividad hemolítica ni de aglutinación hacia los eritrocitos de ratón, lo que sugiere que estos péptidos son exclusivos antimicrobianos o que el proceso de purificación desactivó las otras propiedades (Wenhua *et al.*, 2006). Los otros dos péptidos antimicrobianos fueron *Scolopin 1* y *Scolopin 2* descritos por Peng *et al.* (2009). Éstos contenían 21 y 25 péptidos residuales de naturaleza catiónica, anfipática, sin cisteína (Khuns-Nenwig, 2003; Peng *et al.* 2009). Estos dos péptidos presentaron efectos letales sobre hongos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo las cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Bacillus dysenteriae*. Además, y contrario a la *Scolopendrina I* estos dos péptidos mostraron una actividad hemolítica moderada (Peng *et al.*, 2009; Wenhua *et al.* 2006) e indujeron la secreción de histamina (Peng *et al.*, 2009).

3.4 Enzimas

Diversas enzimas han sido registradas en el veneno de escolopendra. Zaid (1958) demostró la presencia de endo y exopeptidasas del veneno de *S. morsitans*. Posteriormente Mohamed *et al.* (1983), determinó 3 diferentes tipos de aminopeptidasas en extractos de las forcípulas de la misma especie. Las proteasas existentes en el veneno de escolopendras pertenecen al grupo de las meltaloproteasas que se relacionan con procesos hemorrágicos (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Malta *et al.* 2008). Varias esterases se han detectado en los extractos de veneno de *S. morsitans*: 4-naftil acetato esterasa, 3 ácido-fosfatasa y 4 alcalino-fosfatasa (Kass y Batsakis, 1979; Mohamed *et al.*, 1983). A éstas se les atribuye la función de auxiliares en la formación de purinas endógenas multitóxicas, causando efectos como inmovilización por hipotensión (Dhananjaya y D'Souza, 2010). Otras enzimas presentes son las

PLA2, las cuales se han extraído de las especies *S. viridicornis* y *S. viridis* y que se sugiere una función de supresión e inactivación de enzimas (González-Morales *et al.*, 2009; Malta *et al.*, 2008). De las PLA2 identificadas, la Scol/Pla de *S. viridis* Say es la única caracterizada y se sabe que está compuesta de cinco puentes disulfuro y tiene un peso molecular de 13.75 kDa (González-Morales *et al.*, 2009). La presencia de hialuronidasas, se ha encontrado en bandas de gel de masas de 40-66 kDa en *S. viridicornis* pero se desconoce su función en el proceso de envenenamiento (Malta *et al.* 2008).

3.5 Componentes no peptídicos

Diversos componentes no proteicos también complementan el coctel tóxico del veneno de ciempiés. Mohamed *et al.* (1983) reportó la presencia de lipoproteínas, fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres en el veneno de *S. morsitans*, aunque el autor comenta que algunos de ellos pudieron provenir de contaminación en la extracción. La serotonina ha sido descrita en *S. viridicornis* (Welsh y Batty, 1963) y se ha sugerido que provoca dolor instantáneo similar a la acetilcolina. Estas moléculas también facilitan la dispersión del veneno e incrementan la permeabilidad de la membrana. Además de causar dolor, la serotonina causa un incremento en la permeabilidad vascular teniendo un efecto cardiotóxico. Se ha propuesto la presencia de histamina, ya que esta molécula causa dolor agudo instantáneo e incrementa la permeabilidad vascular (Chahl y Kirk, 1975), también es edematogénico y está relacionado con la respuesta inmunológica, provocando una inflamación general, comezón severa, erupción e inflamación de nódulos linfáticos. Estos síntomas son típicos en los casos del envenenamiento por ciempiés (Supakthanasiri *et al.* 2004). La histamina participa junto a los

neurotransmisores y genera una rápida respuesta de hipotensión, dolor, rigidez muscular y parálisis en los insectos (Hoyle, 2011).

3.6 Especies susceptibles al veneno de escolopendras

Las escolopendras son depredadores generalistas que incluyen una amplia diversidad de presas. En condiciones naturales los anfibios (Carpenter y Gillingham, 1984; Forti *et al.*, 2007) y reptiles (Easteria, 1975) han mostrado una susceptibilidad alta al veneno. Mamíferos pequeños como ratones o murciélagos responden con parálisis o muerte a la picadura de ciempiés. En el laboratorio Minelli (1978) y Ménez *et al.* (1990) determinaron que la toxicidad hacia los mamíferos varía entre especies. Ambos describieron que la DL_{50} para adultos de ratón con un peso de 20 g. varía en unidades de veneno según la especie (*Otostigmus scabricauda* (Scolopendridae: Otostigminae) y *Scolopocryptops ferrugineus* (Scolopocryptopidae), *Cryptops iheringi* (Cryptopidae), *Scolopendra viridicornis* y *S. subspinipes*.

Debido a que la dieta principal de las escolopendromorfos está basada en artrópodos, su veneno registra una actividad insecticida similar o mayor a las de algunas arañas (Quistad *et al.*, 1992). Ménez *et al.* 1990 reportó que dosis de tan sólo 0.3 glándulas de la especie *Ethmostigmus rubripes* inyectadas abdominalmente sobre *Locusta migratoria* inducen la muerte, mientras que la DL_{100} en la palomilla *Helicoverpa punctigera* para el mismo veneno fue de 0.02 glándulas.

A pesar de los avances en el estudio del veneno de escolopendras, el conocimiento sobre sus propiedades aún no ha sido explorado en el ámbito agrícola. Con base en los antecedentes, se sugiere que en veneno de especies

que se distribuyen en México, pueden encontrarse sustancias con propiedades antibióticas e insecticidas que contribuyan a la generación de nuevos bioplaguicidas, por lo que la presente investigación tiene como objetivos:

4. Objetivos

Generales:

Determinar la actividad antibacterial, antifúngica e insecticida del veneno del ciempiés *S. viridis* Say en diferentes plagas y patógenos agrícolas.

Específicos:

- Determinar la actividad antibacterial *In vitro* del veneno de *S. viridis* Say sobre bacterias patógenas y fitopatógenas.
- Determinar la actividad antifúngica *In vitro* del veneno de *S. viridis* Say sobre hongos fitopatógenos.
- Determinar la actividad insecticida del veneno de *S. viridis* Say sobre plagas agrícolas.

5. Materiales y Método

5.1. Obtención de material biológico

5.1.1 Colecta de ejemplares

Se utilizaron ejemplares de *S. viridis* Say que fueron colectados en las localidades de “La Cima” ubicada a 19° 6’ 42.89” N y 98° 11’ 40.68” O sobre la carretera federal 95 México-Cuernavaca en la Delegación Tlalpan, en un tramo de la carretera 113 Xochimilco-Oaxtepec a ubicada a 19° 9’ 36.51” N y 98° 59’ 12.38” O en la delegación Milpa Alta y en la localidad de “El Vigía” a 19° 1’ 42.89” N y 98° 57’ 19.92” O en el estado de Morelos (**Figura 4**).



Figura 4. Ubicación espacial de las zonas de colecta de *S. viridis* Say. El símbolo  indica los sitios: La Cima, “El Vigía” y el tramo de la carretera Xochimilco-Oaxtepec. Fotografía satelital tomada de Google Earth, 2012.

Se colectaron 60 ejemplares de *S. viridis* Say de entre 5 a 15 cm. de longitud y se depositaron individualmente en cajas plásticas de 15x15x8 cm. preparadas previamente con un sustrato estéril. Las cajas se mantuvieron en un cuarto oscuro dentro del Laboratorio de Control Biológico de la UACH (Universidad Autónoma Chapingo), con humedad relativa de 70% y temperatura ambiente.

5.1.2. Extracción de veneno

El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica dando 10 voltios sobre la base de las forcípulas de cada escolopendra. Previo a la extracción, los ejemplares fueron inmovilizados con CO₂. El veneno fue recuperado con puntas de micropipeta y colocado en tubos Eppendorff de 1.5 mL. con 10 µL. de agua destilada estéril a una temperatura de 4°C y almacenados por un periodo máximo de 24 horas para evitar su degradación (**Figura 5**). Las extracciones se realizaron cada 15 días. Esta técnica fue sugerida por la Dra. Lidia González, investigadora del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Comunicación personal 10 de Octubre 2011). La cantidad de proteína en el veneno se estimó mediante la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. en un Nanodrop ND-1000. La dosis para cada experimento se ajustaron con agua destilada estéril a las siguientes concentraciones: 30, 60, 90 y 120 µg. para los ensayos de actividad antibiótica y 15, 30, 60 y 90 µg. para los ensayos de actividad insecticida (**Figura 6**).

5. 2 Bioensayos antibacterianos

La actividad antibacteriana se realizó en campana de flujo laminar con cepas Gram-negativas ATCC de: *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium carotovorum*,

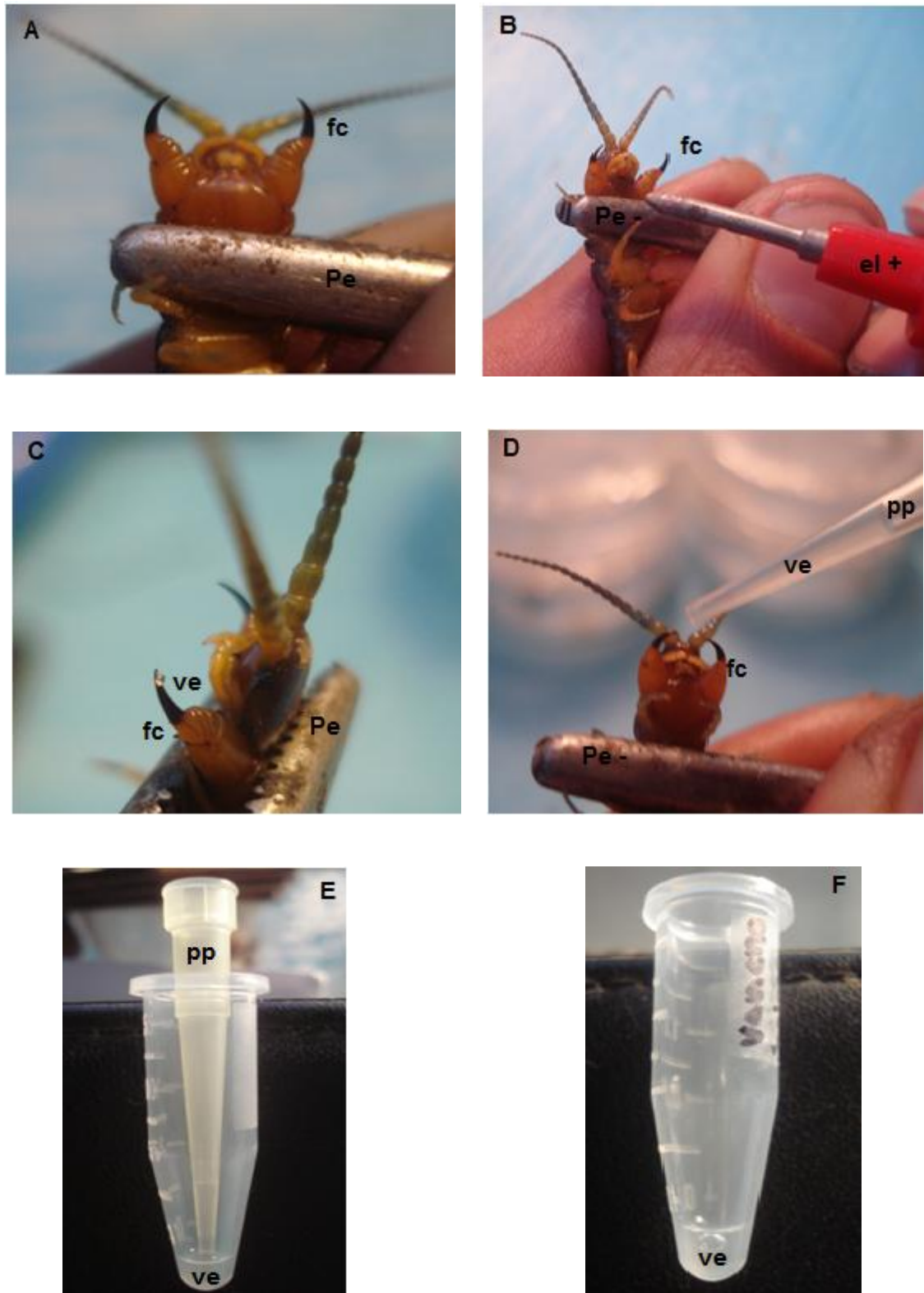


Figura 5. Procedimiento de extracción de veneno. (A) Posición de extracción con las forcípulas (fc) abiertas y sujetando con pinzas entomológicas (Pe). (B) Estimulación de la glándula veneno por descarga eléctrica, las (Pe) tiene carga (–) y el electrodo rojo carga (+). (C) Salida de veneno (ve) de la punta de la fc. (D) Recolección del veneno con una punta de pipeta (pp). (E yF). Almacenamiento del veneno en tubos etiquetados. Foto Huerta (2012).

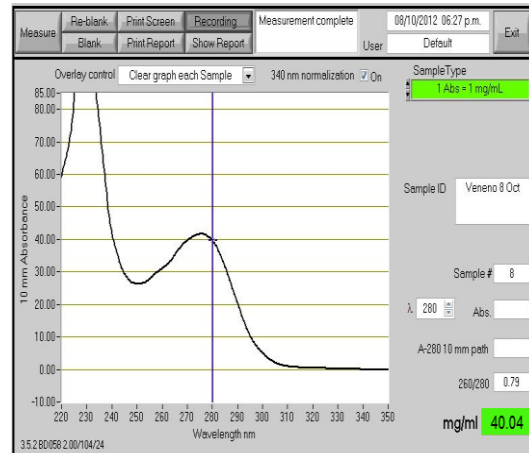
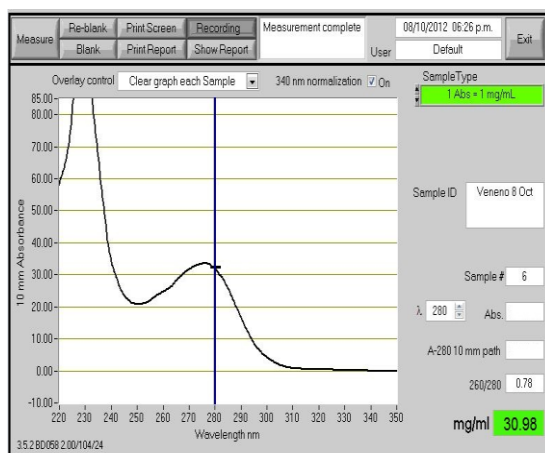
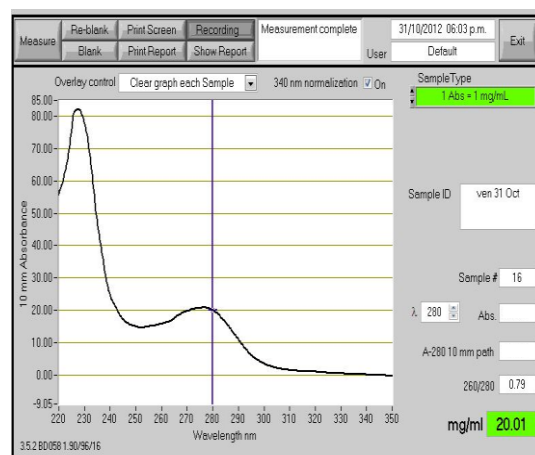
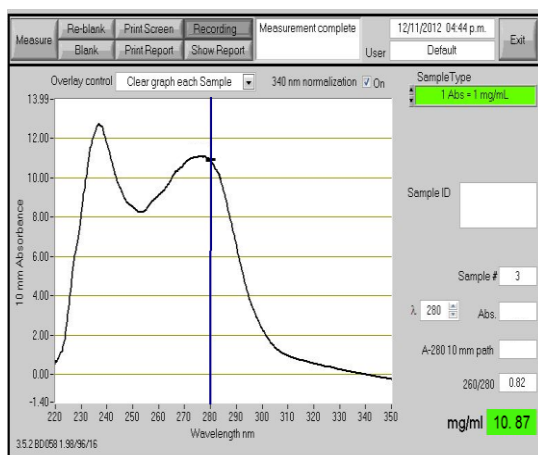
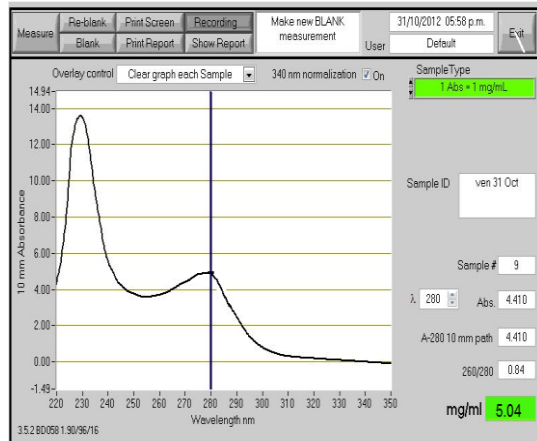
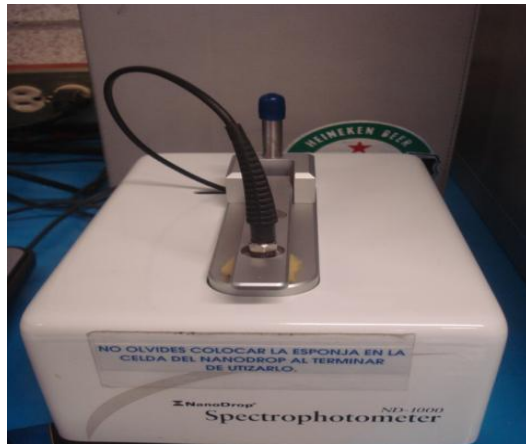


Figura 6. Espectrofotómetro utilizado para determinar las dosis de veneno de *S. viridis* Say. Espectros obtenidos de las concentraciones estimadas con el programa A Proteín 280. De estas muestras se tomaron los 3 μ L. para cada ensayo.

Pantoea agglomerans y *Pectobacterium caticida* proporcionadas por el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la UACH y cepas de *E. coli* y *Salmonella spp.* provenientes del Laboratorio de Hongos del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH.

Se utilizó una variante de la técnica de antibiograma Kerby-Bauer (1966), la cual consistió en colocar 4 discos de papel filtro con un diámetro de 3 mm de forma equidistante sobre la superficie del medio LB de una caja Petri, previamente inoculado con una cepa bacteriana en una concentración de 1×10^8 UFC ajustada con el 0.4 McFarland. Previamente se impregnaron dos discos de papel con 3 μ L. de veneno en una de las dosis especificadas, otro disco se saturó con 3 μ L. agua destilada estéril para usarse de control negativo y el último disco se saturó con 3 μ L. de Agri-mycin (Sulfato de gentamicina y Clorhidrato de oxitetraciclina) como testigo positivo en una dosis comercial (120 μ g.). Se incubó por 24 horas a una temperatura de 30 °C y posteriormente se midió el diámetro de halos de inhibición (en milímetros) para cada disco usando un vernier. Se realizaron 4 repeticiones; los datos se analizaron en un Diseño Completamente al Azar y una prueba de contraste de medias de Tukey en el programa estadístico SAS versión 9.0.

5. 3 Bioensayos antifúngicos

Los bioensayos se realizaron en campana de flujo laminar con cepas monospóricas de: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Rhizoctonia solani* proporcionadas por el Laboratorio de Hongos Fitopatógenos de la UACH y de *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum sp.* adquiridas en el Laboratorio de Biología Molecular del Depto. de Fitotecnia de la UACH.

Se utilizó la misma variante de la técnica de antibiograma Kerby-Bauer (1966) que en los bioensayos antibacterianos, se colocaron los 4 discos de papel filtro con un diámetro de 3 mm. de forma equidistante sobre la superficie del medio PDA (papa dextrosa agar) de una caja Petri previamente inoculado con una cepa fúngica en una concentración de 1×10^8 UFC ajustada con el 0.4 McFarland. Dos discos se saturaron con 3 μ L. de la dosis correspondiente de veneno, otro disco se saturó con 3 μ L. de agua destilada estéril para usarse de control negativo y el último disco se saturó con 3 μ L. de ANTRAK (Benomilo) a una dosis comercial (12 μ g.) como testigo positivo. Se incubó por 36 horas a una temperatura de 28 °C y posteriormente se midió el diámetro de halos de inhibición (en milímetros) para cada disco usando un vernier. Se realizaron 4 repeticiones; los datos se analizaron en un Diseño Completamente al Azar y una prueba de contraste de medias de Tukey en el programa estadístico SAS versión 9.0.

5.4. Bioensayos Insecticidas

Se utilizaron larvas de 3º y 4º instar de *Tenebrio molitor* (gusano de la harina y granos) y *Leptophobia aripa* (gusano rayado de la col) obtenidas de criaderos comerciales. Los bioensayos se realizaron por inyección abdominal; se suministró 3 μ L. de veneno a cada larva en las dosis de 15, 30, 60 y 90 μ g. con una jeringa marca HD especial para insulina. Las larvas se colocaron individualmente en cajas Petri después de ser tratadas. Se determinó el número de decesos después de 6 horas. Las aplicaciones se calendarizaron cada 15 días en lotes de 20 individuos para *T. molitor* y 10 individuos para *L.*

aripa con 4 repeticiones. Los datos se analizaron bajo un modelo PROBIT en el programa estadístico SAS versión 9.0.

6. Resultados

6.1 Bioensayos antibióticos

Para los ensayos antibióticos se utilizaron las cepas *Salmonella sp.*, *E. amylovora*, *P. carotovorum*, *P. agglomerans*, *P. cacticida*, utilizando las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 µg. de veneno. Los resultados obtenidos mostraron evidencia de la presencia de halos de inhibición después de 24 horas de incubación. Las cepas susceptibles al veneno de *S. viridis* Say fueron *E. amylovora*, *P. carotovorum*, *P. cacticida* y *Salmonella sp.* mientras que *E. coli* y *P. agglomerans* tuvieron un crecimiento sin rastros de inhibición (**Figura 7**). Las dosis de veneno que provocaron una respuesta inhibitoria significativa fueron 60 y 120 µg. en la cepas de *E. amylovora*; las dosis de 60, 90 y 120 µg. provocaron inhibición en *Salmonella sp.*; *P. carotovorum* mostró una susceptibilidad en dosis de 90 y 120 µg. y *P. cacticida* en dosis de 120 µg.

Tabla 1. Diámetro promedio expresado en milímetros de los halos de inhibición presentes en las cepas bacterianas

	Control	30 µg.	60 µg.	90 µg.	120 µg.	Agri-mycin
<i>E. amylovora</i>	3	3.5	4	3.5	4	7.5
<i>P. carotovorum</i>	3	3.2	3.5	4	4.2	8
<i>P. cacticida</i>	3	3	3	3.3	4.7	10
<i>Salmonella sp.</i>	3	3	5.7	4.2	6.2	7
<i>E. coli</i>	3	3	3	3.4	3.5	10
<i>P. agglomerans</i>	3	3	3.2	3.4	3.4	9

La dosis de 120 μg . registraron los halos de inhibición de mayor diámetro. En todas las pruebas, la cepa de *Salmonella sp.* Presentó la mayor susceptibilidad al veneno de *S. viridis* Say como se muestra en la **figura 8**. Todas las cepas bacterianas presentaron una respuesta inhibitoria a la dosis comercial de Agri-mycin con halos de inhibición mayores a cualquier dosis de veneno.

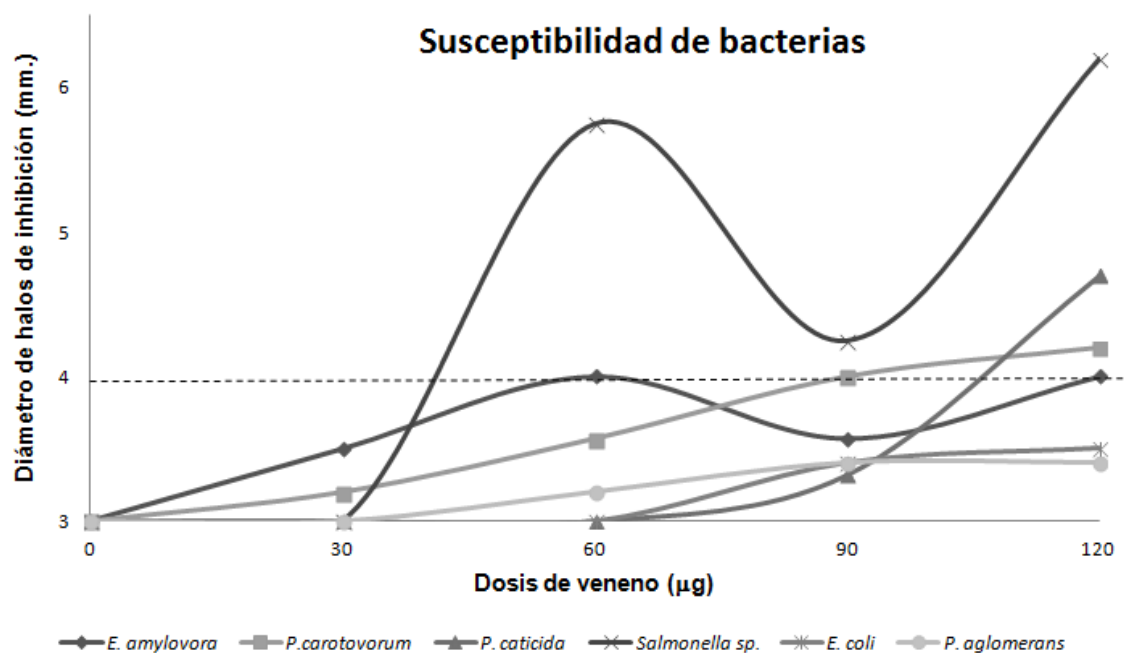


Figura 8. Inhibición de bacterias patógenas expuestas a distintas dosis de veneno de *S. viridis* Say. La línea punteada indica el límite estimado de significancia.

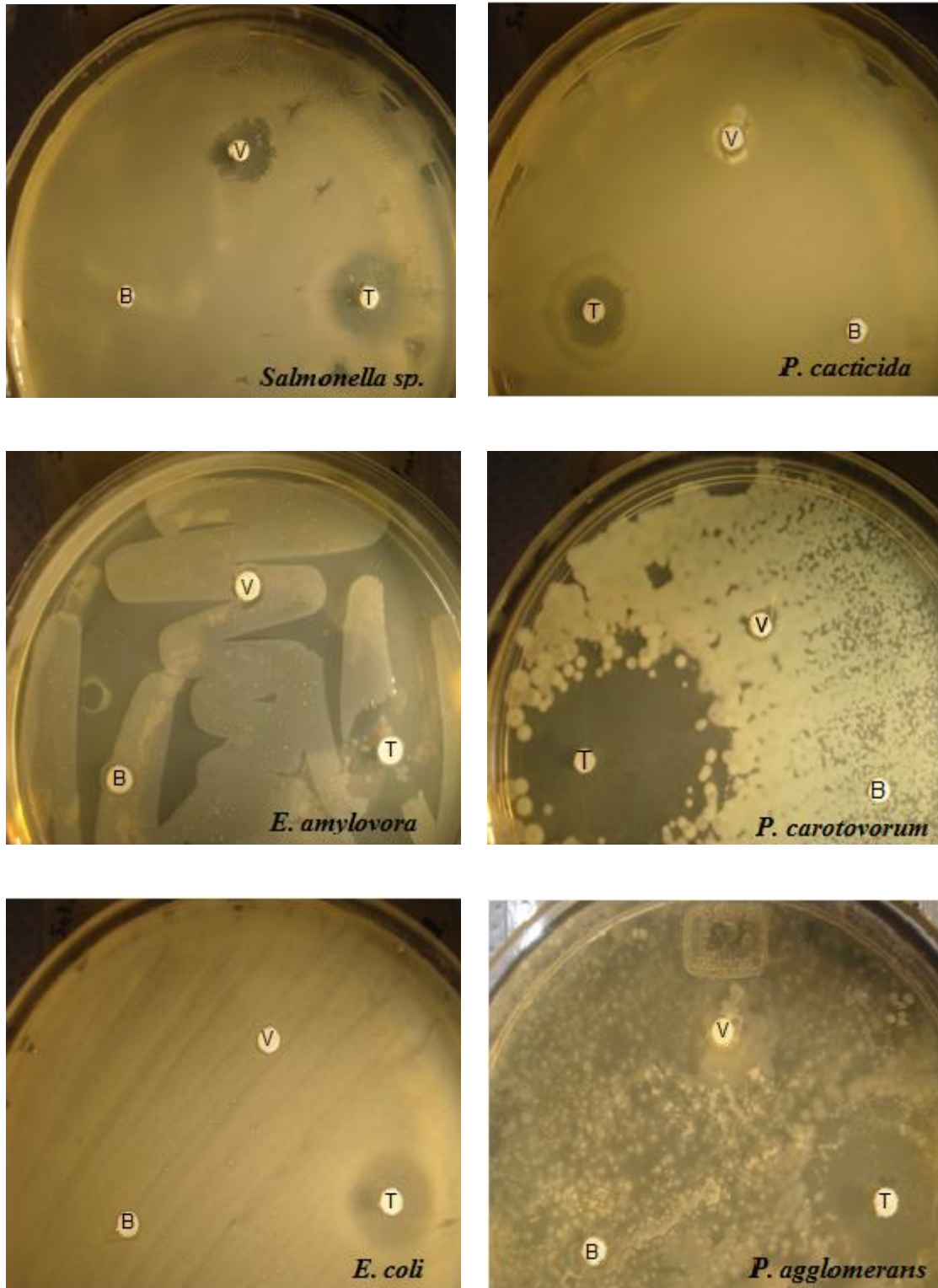


Figura 7. Ensayos de actividad biológica del veneno de *S. viridis* Say en una dosis de 120 μ g (V). Sensidiscos con el veneno (V), el control positivo (T) con Agri-mycin y (B) el blanco o testigo negativo con agua destilada estéril. Foto: Huerta (2012).

6.2 Bioensayos antifúngicos

Para el caso de los hongos, los resultados del experimento mostraron evidencia de la presencia de halos de inhibición después de las 36 horas de incubación (**Tabla 2**). Las cepas *F. oxysporum* y *R. solani* tuvieron una respuesta inhibitoria, mientras que *A. alternata*, *B. cinerea*, *Colletotrichum sp.* y *R. stolonifer* tuvieron un crecimiento aparentemente normal sin signos de susceptibilidad al veneno (**Figura 9**). La dosis más alta (120 µg.) fue la única que indujo inhibición en las cepas. (**Figura 8**).

Tabla 2. Diámetro promedio expresado en milímetros de los halos de inhibición presentes en las cepas fúngicas

	Control	30 µg.	60 µg.	90 µg.	120 µg.	ANTRAK
<i>R. stolonifer</i>	3	3	3	3	3	3
<i>Colletotrichum sp.</i>	3	3	3	3.2	3.2	4
<i>A. alternata</i>	3	3	3	3.2	3	6.2
<i>B. cinerea</i>	3	3	3	3.2	3	7
<i>F.oxysporum</i>	3	3	3	3	3.5	4
<i>R. solani</i>	3	3	3	3	3.5	4

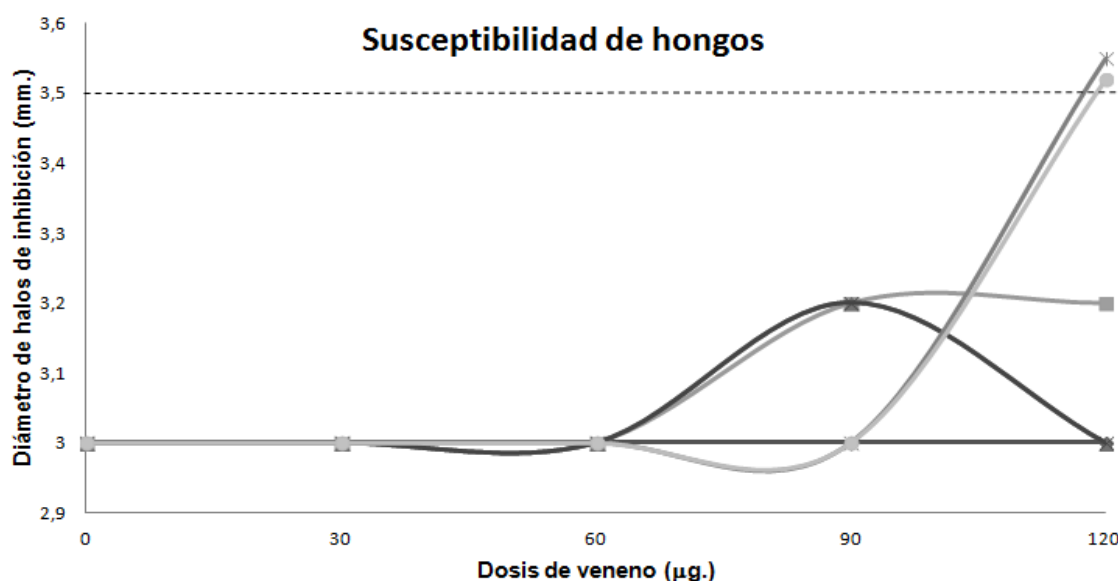


Figura 8. Inhibición de hongos fitopatógenos expuestas a distintas dosis de veneno de *S. viridis* Say. La línea punteada indica el límite estimado de significancia.

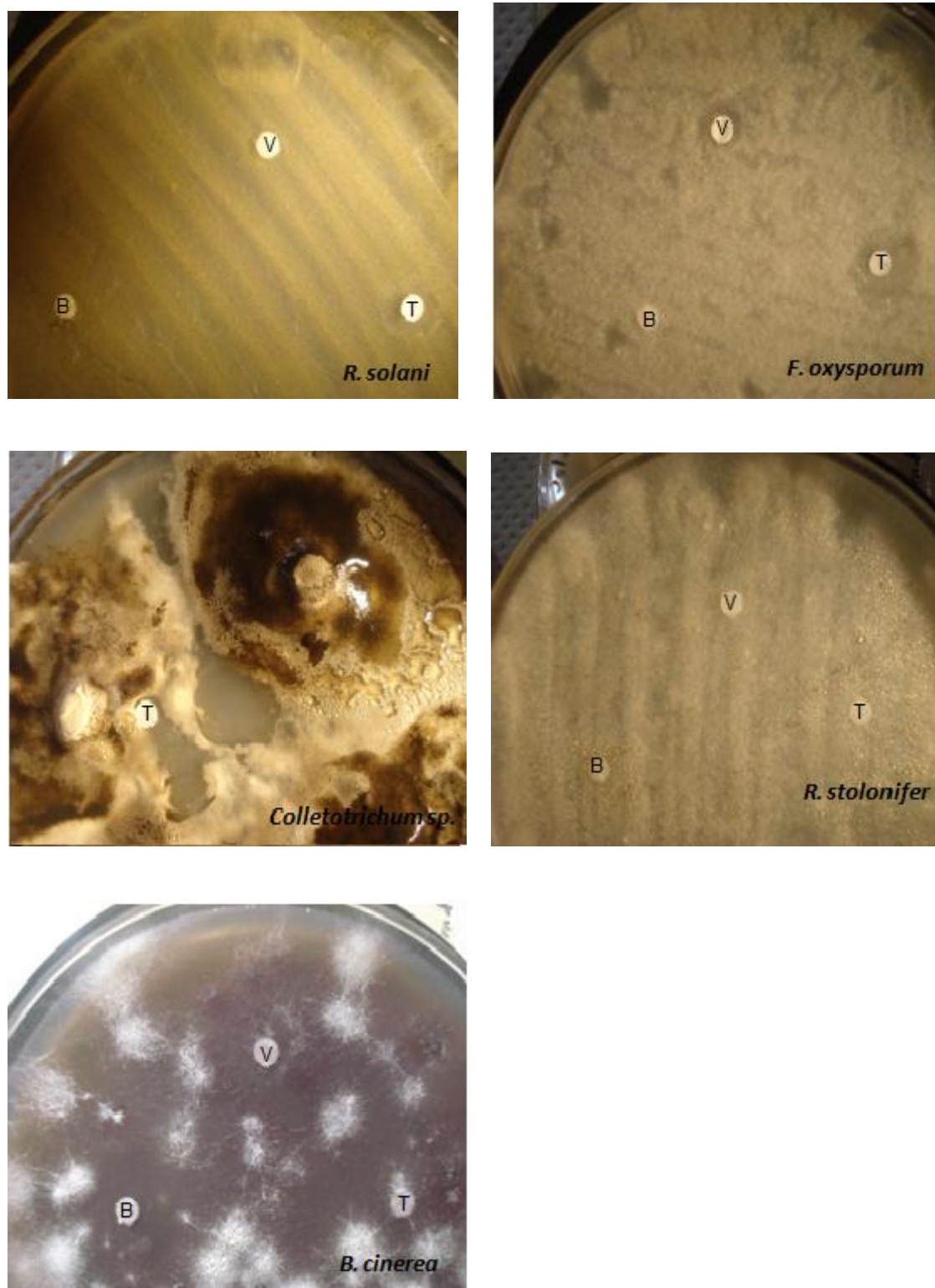


Figura 9. Formación de halos de inhibición en las cepas fúngicas como respuesta a los tratamientos. V) Dosis de veneno de 120 μ g, (T) control positivo Dosis comercial de ANTRAK y (B) control negativo con agua destilada estéril. Fotos: Huerta (2012)

6.3. Bioensayo insecticida

Los bioensayos insecticidas mostraron evidencia de que las especies *T. molitor* y *L. aripa* muestran susceptibilidad al veneno de *S. viridis* Say. Estas especies perdieron casi de forma inmediata la movilidad, quedando paralizadas totalmente y de forma permanente a los 15 minutos de la aplicación; después de 2 horas el tejido alrededor de la punción fue tornándose de color marrón hasta tomar una tonalidad oscura que invadió todo el cuerpo aproximadamente a las 6 horas de la aplicación (**Figura 9**). El porcentaje de mortalidad con la dosis de 15 μg . fue de 28.7% en *T. molitor* y 2.25% en *L. aripa*. La dosis de 30 μg . causó una mortalidad de 67.5 % y 67 %, la dosis de 60 μg . provocó 81% y 77% de muerte y la dosis de 90 μg . causó una mortalidad del 100% y 92. 5% respectivamente como se indica en la **figura 10**.

Los individuos que se usaron como control presentaron una mortalidad de 1.25% probablemente relacionado con la inserción de la aguja, sin embargo el resto de la población se recuperó y mantuvieron actividad normal.

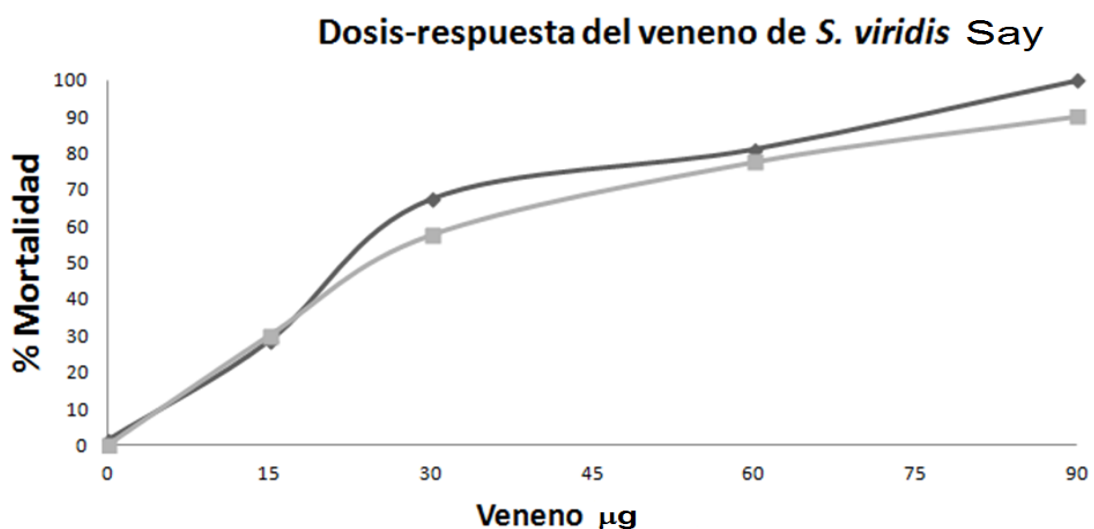


Figura. 10. Porcentaje de mortalidad para las especies de *T. molitor* y *L. aripa* al veneno de *S. viridis* Say. La población total por tratamiento de *T. molitor* fue de 80 individuos y de *L. aripa* 40 individuos.

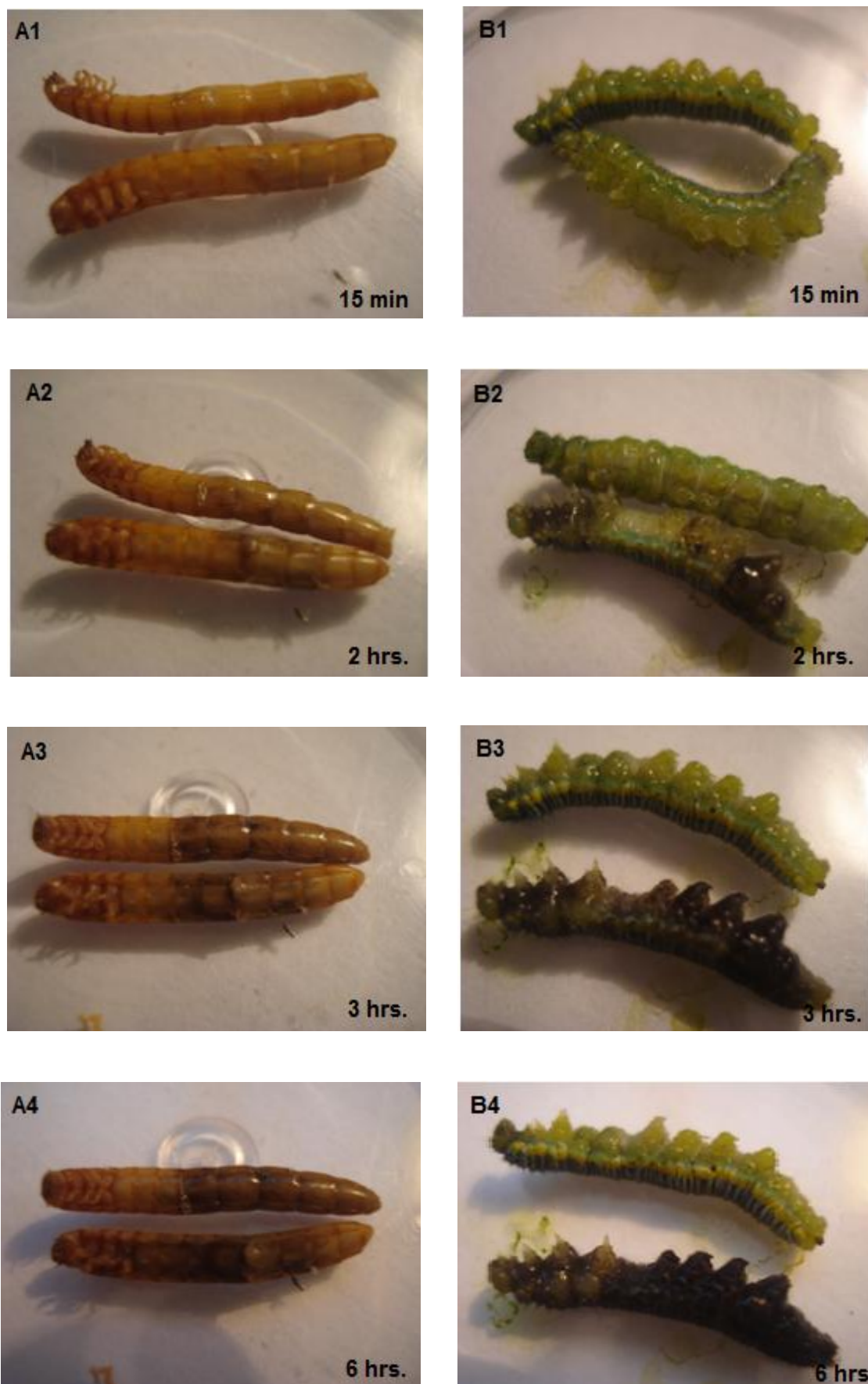


Figura. 9. Proceso de envenenamiento de la especies (A) *T. molitor* y (B) *L. arripa* después de la aplicación por inyección abdominal de 3 µL. de veneno a una dosis de 90 µg. Fotos: (Edgar 2012).

A partir de los ensayos con las distintas dosis de veneno de *S. viridis* Say y el porcentaje de mortalidad que registraron, se estimó la DL_{50} para *T. molitor* y *L. aripa* usando la función Probit del Programa SAS versión 9.0. La DL_{50} obtenida para las larvas de *T. molitor* fue de 20.5 μg . de veneno como se muestra en la **figura 11**, mientras que para *L. aripa* fue de 25.5 μg . (**Figura 12**).

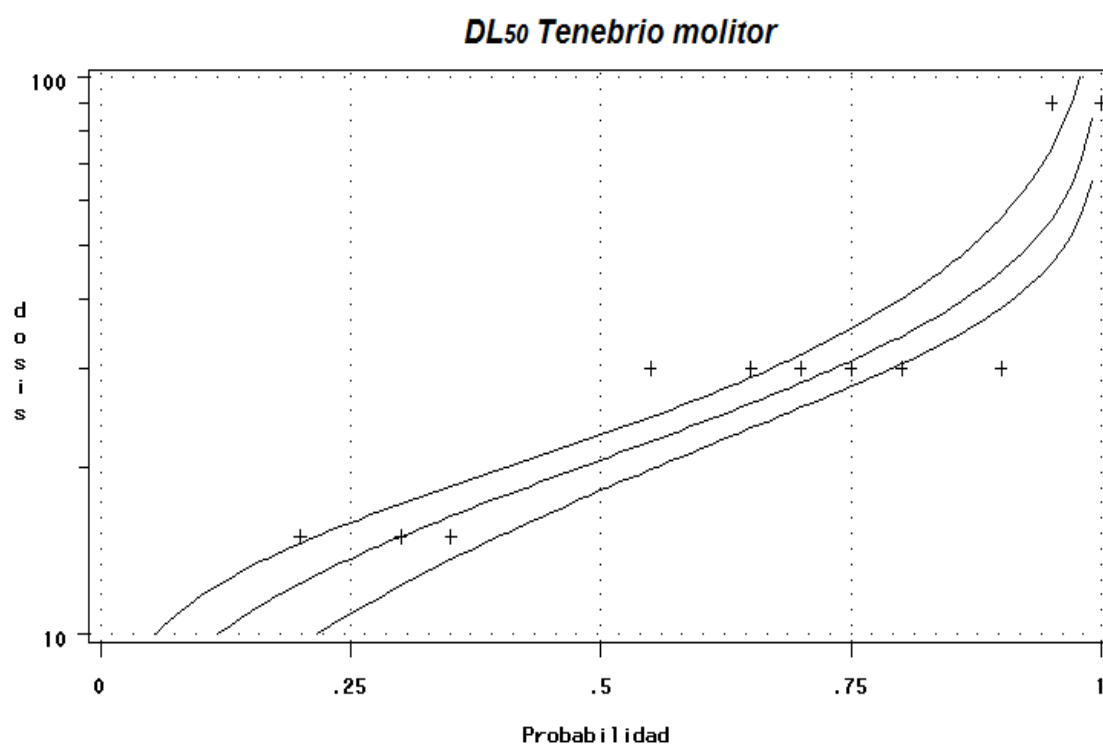


Figura 11. Curva respuesta de la DL_{50} de *T. molitor* al veneno de *S. viridis* Say. Salida del programa Probit SAS versión 9.0

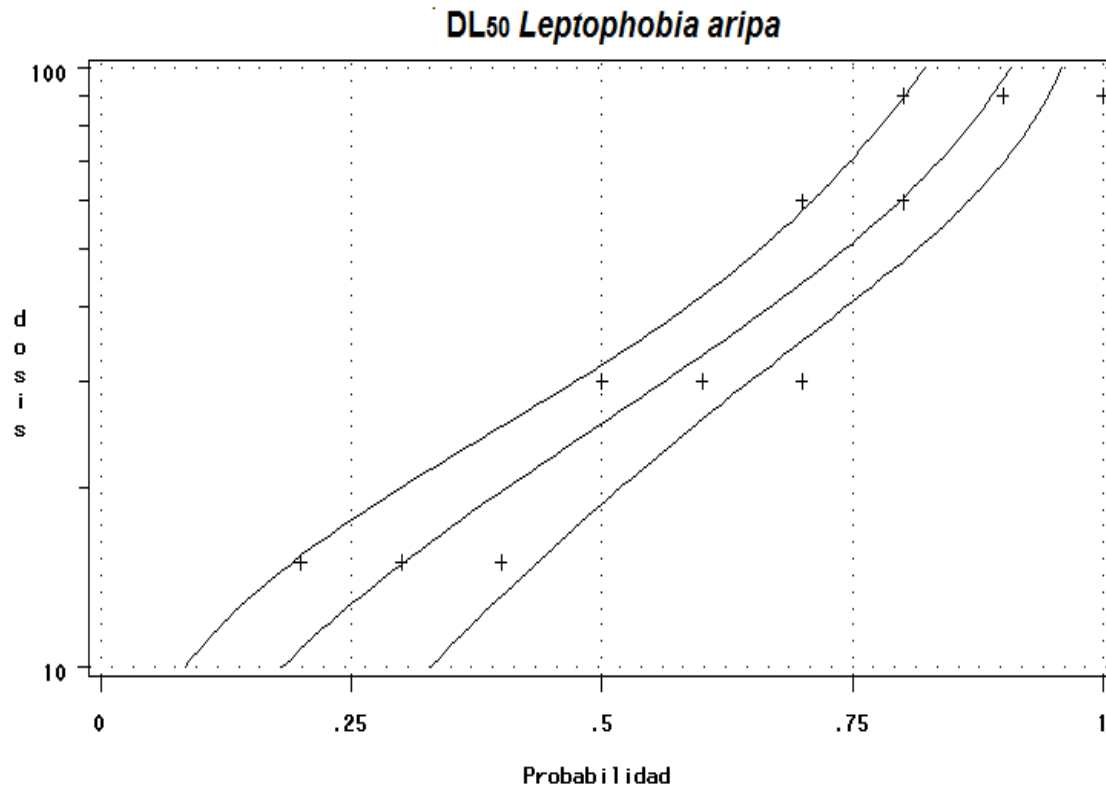


Figura 12. Curva respuesta de la DL_{50} de *L. aripa* al veneno de *S. viridis* Say. Salida del programa Probit SAS versión 9.0

7. Discusión

Como ya se mencionó, la escolopendras son organismos fotofóbicos que pasan la mayor parte del tiempo bajo el suelo, rocas o coberturas vegetales donde proliferan una gran cantidad de microorganismos; su dieta está basada en una alta diversidad de especies (Carpenter y Gillingham, 1984; Easteria, 1975 y Forti *et al.*, 2007), por lo que al momento de alimentarse, como lo menciona Wenhua *et al.* (2006), deben asegurar que las presas estén libres de patógenos. Al igual que otros artrópodos, los ciempiés carecen de un sistema inmune con anticuerpos y deben secretar sustancias, principalmente de naturaleza enzimática y proteica, para defenderse contra infecciones (Muller *et al.*, 2008; Pujol, 2008). El veneno, al ser inyectado en los tejidos, además de

paralizar y matar, podría jugar una función desinfectante, como previamente lo menciona Undheim y King (2011). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en el veneno de *S. viridis* Say existen componentes con actividad antibacteriana y antifúngica que podrían estar relacionadas con los hábitos y la fisiología del ciempiés.

Hasta el momento, la única molécula caracterizada en veneno de *S. viridis* Say ha sido la fosfolipasa Scol/PLA, la cual se sugiere está relacionada con propiedades de supresión enzimática o miotóxicas por lo que en esta investigación no puede relacionarse directamente con la respuesta antibiótica obtenida. Por otro lado, dicha respuesta podría estar vinculada con la presencia de proteínas citotóxicas.

En diversos artrópodos se ha registrado una intensa actividad contra patógenos por parte de las proteínas contenidas en su veneno, un ejemplo es la “vejovina” encontrada en el alacrán *Vaejovis mexicanus* (Hernández-Aponte *et al.*, 2011). En particular, las especies de *Scoloendra* sp. (Cohen y Quistad, 1998), *S. multidentis*, *S. s. mutilans* (Peng *et al.*, 2009) y *S. viridicornis* (Malta *et al.*, 2008) han reportado diversas proteínas con propiedades hemolíticas. Las proteínas catiónicas anfipáticas con acción hemolítica encontradas en diversos organismos, como la magainina de *Xenopus laevis* (Rossi *et al.*, 2008), se han relacionado con actividad biológica contra muchos patógenos debido a la interacción de éstas con las membranas celulares (**ANEXO III**). Las proteínas *Scolopedrina I* aislada por Wenhua *et al.* (2006) y las *Scolopin I* y *Scolopin 2* reportadas por Peng *et al.* (2009) en la especie *S. s. mutilans* pertenecen este grupo de proteínas catiónicas y han mostrado efectos antibióticos, lo que

sugiere que en el veneno de la especie mexicana *S. viridis* Say podrían existir proteínas de la misma naturaleza química que de igual manera, estén relacionadas con la actividad antibacterial y antifúngica reportada.

De acuerdo con los resultados de inhibición obtenidos, el veneno de *S. viridis* Say produce un efecto de susceptibilidad mayor en las bacterias que en los hongos; estos datos se asemejan a los reportados por Wenhua *et al.* (2006) para el veneno de la especie *S. s. mutilans* que registra una respuesta en un rango de 4–7 µg/mL. para bacterias y de 7-14 µg/mL. para hongos. Lo anterior sugiere que los hongos necesitan una mayor concentración de veneno para inhibir su crecimiento o bien que existe una presencia mayor de componentes antibióticos específicos para bacterias. Las dosis de veneno de *S. viridis* Say que produjeron actividad antibiótica son más altas que las reportadas para *S. s. mutilans*, lo cual puede estar relacionado con el método utilizado por Wenhua *et al.* 2006, ya que en *S. mutilans* hubo una pre-inducción con un patógeno. A diferencia de *S. s. mutilans*, *S. viridis* Say mostró la presencia de componentes antibióticos sin previa inducción con cepas de *E. coli*.

Las bacterias utilizadas en los bioensayos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y presentan características morfológicas similares, por lo que no se encontró relación evidente en las diferencias de susceptibilidad por parte de las especies *P. carotovorum*, *Salmonella sp.*, *E. amylovora* y *P. cacticida*; y la respuesta se le atribuye a otros factores. Así mismo, dado que los hongos susceptibles utilizados para los bioensayos pertenecen a distintos Ordenes dentro de la División Ascomycota no fue posible una comparación por lo que la respuesta de *Fusarium oxysporum* del Orden Hypocreales y

Rhizoctonia solani del Orden Agonomycetales se atribuye a factores desconocidos.

La parálisis inmediata que experimentaron las larvas de *L. aripa* y *M. molitor* después de la aplicación del veneno de *S. viridis* se relaciona con la presencia de componentes neurotóxicos. Rates *et al.* (2007) reportan en *S. viridicornis* 13 componentes que generan parálisis inmediata en moscas, grillos y cucarachas (Rates *et al.*, 2007). Así mismo, Gutiérrez *et al.* (2003) reporta que el veneno de una escolopendra mexicana provocó un aumento del GABA en el crustáceo *Cambarellus cambarellus* produciendo parálisis. Las proteínas neurotóxicas de alto peso molecular con cisteína reportadas en estos estudios, podrían estar presentes de igual forma en el veneno de *S. viridis* Say y ser las responsables de la parálisis, aunque como argumenta Rates *et al.* (2007) no provocar la muerte de las larvas.

La mortalidad mostrada por el veneno de *S. viridis* Say contra las larvas de *T. molitor* y *L. aripa* . sugiere la presencia de componentes letales diferentes a los neurotóxicos. González-Morales *et al.* (2009) reportaron la presencia de la fosfolipasa Sco/PLA en *S. viridis* Say con actividad hemolítica. Por lo que se puede sugerir que la Sco/PLA está relacionada con el proceso de hemolisis en las larvas del gusano de la harina y del gusano rayado de la col causando las tonalidades marrón y negras (necrosis) registradas lo largo del proceso de muerte. Los componentes antibióticos sugeridos en este veneno también podrían estar relacionados con el proceso de envenenamiento, debido a que en la especie *S. s. mutilans* se ha registrado que las proteínas catiónicas además

de los efectos antibacteriales y antifúngicos, tienen un efecto hemolítico (Wenhua *et al.*, 2006).

Es probable que otros péptidos catiónicos estén involucrados en la mortalidad de los insectos, debido a los efectos líticos que ocasionan en las células. En el veneno de *S. multidentis*, *S. s. mutilans*, *S. viridicornis* y *S. subspinipes deehani* se ha reportado una acción citotóxica sobre eritrocitos y otros cultivos celulares (Cohen y Quistad, 1998; Gomes *et al.* 1982b; Malta *et al.* 2008; Peng *et al.* 2009).

De acuerdo con los resultados y la estimación de la DL_{50} , *T. molitor* es más susceptible al veneno de *S. viridis* Say que *L. aripa*. Esta diferencia puede estar relacionada con la biomasa de ambas especies ya que *L. aripa* es ligeramente más grande y se puede sugerir que requiere de una dosis o una concentración mayor. Por otra parte, no se descarta la idea de que en el gusano rayado de la col exista una tolerancia al veneno relacionada con un mecanismo de resistencia.

En la actualidad aun no se han descrito todos los componentes del veneno de *S. viridis* Say por eso es necesario realizar más investigaciones con el fin de obtener más información sobre sus componentes. Si bien, es probable la existencia de una molécula que dentro del veneno de este ciempiés, que de forma individual tenga la capacidad de matar un insecto o inhibir el crecimiento de patógenos, quizás sea necesario la interacción de varias moléculas para potencializar el efecto letal, tal como lo menciona Rates *et al.* (2007).

8. CONCLUSIONES

Se determinó que en el veneno del ciempiés *S. viridis* Say existen compuestos con un efecto antibiótico en dosis de 90 y 120 µg. contra los fitopatógenos *P. carotovorum*, *E. amylovora*, *P. cacticida*, *F. oxysporum* y *R. solani* los cuales son causantes de varias enfermedades que generan daños considerables en frutales y hortalizas

Se determinó un efecto antibiótico en dosis de 60, 90 y 120 µg. contra el patógeno *Salmonella sp.* el cual ocupa los primeros lugares de incidencia en enfermedades gastrointestinales en México.

Se reportó la acción insecticida contra las larvas *T. molitor* y *L. aripa* determinando las DL_{50} que corresponden a 20.5 µg. y 25.5 µg. respectivamente.

La susceptibilidad que presentaron los fitopatógenos, patógenos y plagas agrícolas ante el veneno de *S. viridis* Say abre la posibilidad a diversos estudios para el desarrollo de una nueva generación de plaguicidas. Dichos estudios estarían encaminados a la identificación y caracterización de los componentes antibióticos e insecticidas para su purificación y síntesis. En particular, para la fabricación de plaguicidas para uso en el campo, poscosecha y desinfectantes.

La utilización de péptidos y enzimas antimicrobianas e insecticidas constituye una alternativa para el combate de enfermedades y plagas agrícolas ya que retardan la aparición de resistencia por parte de los patógenos. Así mismo, los péptidos que resulten con actividad biológica podrían ser considerados para la

creación de plantas transgénicas con resistencia a los fitopatógenos y plagas que en este estudio resultaron susceptibles.

9. Bibliografía

Antoniazzi M. M., Pedroso C. M., Knysak I, Martins R. , Guizze S. P., Jared C., Barbaro K. C. 2009. Comparative morphological study of the venom glands of the centipede *Cryptops iheringi*, *Otostigmus pradoi* and *Scolopendra viridicornis*. *Toxicon*. 53(3):367-74.

Barrera-Necha L. y Bautista-Baños S. 2008. Actividad Antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26 (1): 27-31.

Bauer A. W. , Kirby W. M. , Sherris J. C., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 45(4): 493-6.

Broekaert W. F., Terras F.R, Cammue B.P., Osborn R.W. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*. 108: 1353-1358.

Bulet P., Hetru J., Dimarcq J. y Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Development and Comparative Immunology*. 23: 329 – 344.

Carpenter C.C., Gillingham, J.C., 1984. Giant centipede (*Scolopendra alternans*) attacks marine toad (*Bufo marinus*). *Caribb. J. Sci*. 20, 71–72.

Chahl L.A., Kirk E.J., 1975. Toxins which produce pain. *Pain* 1: 3–49

Chakrabarti A., Ganapathi T. R., Mukherjee P.K. y Bapat, V.A. 2003. MSI-99 a magainin analogue. Imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. *Planta* 216:587-596.

Cheng H.H. 1990. Pesticides in the soil environments. An overview. En: *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modelling*. (H. Cheng, Ed.). Soil Science Society of America. 2: 1-5.

Cohen E., Quistad G.B., 1998. Cytotoxic effects of arthropod venoms on various cultured cells. *Toxicon* 36: 353–358.

Cupul-Magaña .G. 2007. *Scolopendra viridis* Say, 1821 Cienpatas, Ciempiés, Cientopiés, Escolopendra CHILOPODA: SCOLOPENDROMORPHA: SCOLOPENDRIDAE. *Dugesiana* 14(2): 53-57.

Dhananjaya B. L., D'Souza C.J.M., 2010. The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. *Cell Biochem. Funct* 28, 171–177.

Easterla D.A. 1975. Giant desert centipede preys upon snake. *Southwest Nat*. 20: 411.

Elzinga, R.J. 1994. The use of legs as grasping structures during prey capture and feeding by the centipede *Scolopendra viridis* Say (Chilopoda: Scolopendridae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 67(4):369-372.

FAO. 2009, *Glosario de Agricultura Orgánica*, en <http://www.fao.org/organicag/es> 15/07/2012.

FAO-PNUMA. 2004. *ONU insta a proteger a los agricultores de los plaguicidas*, en <http://www.un.org/spanish/News/fullstory.newsasp?>, 11/08/2012.

Fry G. B. 2005. *From genome to venom molecular origin and evolution of a snake proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequence and related body proteins*. *Genome RES.* 15 (3): 403-420.

Forti L. R., Fischer H.Z., Encarnação L.C. 2007. *Treefrog Dendropsophus elegans (Wied-Neuwied, 1824) (Anura: Hylidae) as a meal to Otostigmus tibialis Brölemann, 1902 (Chilopoda: Scolopendridae) in the Tropical Rainforest in southeastern Brazil*. *Braz. J. Biol.* 67: 583–584.

Ganz T. & R.I. Lehrer. 1998. *Antimicrobial peptides of vertebrates*. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 41-44.

García de L. S. y Mier T. 2010. *Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. Sociedades rurales, producción y medio ambiente.* 10 (20).

Gomes A., Datta A., Sarangi B., Kar P.K. y Lahiri S. C. 1982b. *Occurrence of histamine and histamine release by centipede venom*. *Indian J. Med. Sci.* 76: 888.

González-Morales L., Diego-García E., Segovia L., Gutiérrez M..C., Possani L.D. 2009. *Venom from the centipede Scolopendra viridis say: purification, gene cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A2*. *Toxicon* 54: 8–15.

González R. M., Silva R. H, Mascorro, G. J. 2005. *Ensayo In vitro del péptido antimicrobiano melitina contra diferentes bacterias fitopatógenas*. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 23 (002) 176-182.

Gutiérrez J. M., Rucavado A., 2000. *Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage*. *Biochimie* 82: 841–850.

Gutiérrez M. C., Abarca C., Possani L. D., 2003. *A toxic fraction from Scolopendra venom increases the basal release of neurotransmitters in a ventral ganglia of crustaceans*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol.* 135 (2): 205-214.

Hernández-Aponte C. A., Silva-Sanchez J., Quintero-Hernández V., Rodríguez-Romero A., Balderas C., Possani L. D., Gurrola G. B. 2010. *Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of Vaejovis mexicanus*. *Toxicon.* 2011 Jan;57(1):84-92.

Hernández C. C., Aguilera A. Ma. G. y Castro E. G. 2011. *Situación de las enfermedades gastrointestinales en México*. *ENF. INF. MICROBIOL.* 31 (4): 137-151.

Hoyle C. H. V., 2011. *Evolution of neuronal signalling: Transmitters and receptors*. *Auton. Neuroscience.* 05:007.

Kass L., Batsakis J. G., 1979. *Cytochemistry of esterases*. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 10, 205–223.

Kuhn-Nentwig L., 2003. *Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2651–2668.

Lewis J. G. E. 1981. *The biology of centipedes*. Cambridge University Press, Cambridge.

Lima P. R., Brochetto-Braga M.R. 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera* J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. 9(2).

Malta M. B., Lira M. S., Soares S. L., Rocha G.C., Knysak I., Martins R., Guizze S.P., Santoro M.I., Barbaro K.C. 2008. Toxic activities of Brazilian centipedes venoms. Toxicon 52: 255-263.

Ménez A., Zimmerman K., Zimmerman S. y Heatwole H. 1990. Venom apparatus and toxicity of the centipede *Ethostigmus rupides* (Chilopod, Scolopendridae). Journal. Morphology., 206:303-12.

Minelli A., 1978. Secretions of centipedes. In: Bettini, S. (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology: Arthropod Venoms. Springer-Verlag, Berlin.

Mohamed A. H., Abu-Sinna G., El-Shabaka H.A., Abd El-Aal A., 1983. Proteins, lipids, lipoproteins and some enzyme characterizations of the venom extract from the centipede *Scolopendra morsitans*. Toxicon 21: 371-377.

Montes, B. R. 1996. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 3: 99-106.

Muñoz P. C. y Ávila F. S. 2005. Los efectos de un impuesto ambiental a los plaguicidas en México. Gaceta Ecológica, INE. Enero-Marzo 074: 43-53.

Nicolas P. y Mor A. 1995. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. Annu. Rev. Microbiol. 49: 277-304.

Ongley E. D. 1996. Control of water pollution from agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper 55: 111.

Osusky M., Guoqing Z., Osuka L., Hancock R. E., Kay W. W. y Misra S. 2000. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. Nature Biotechnology. 18: 1162-1166.

Peng K., Kong Y., Zhai L., Wu X., Jia P., Liu J., Yu H., 2009. Two novel antimicrobial peptides from centipede venoms. Toxicon 55: 274-279.

Pujol M. E. 2008. Sistema inmunológico en insectos. El Faro. 29: 8-10.

Quistad G.B., Dennis P.A., Skinner W.S. 1992. Insecticidal activity of spider (Araneae), centipede (Chilopoda), scorpion (Scorpionidae), and snake (Serpentes) venoms. J. Econ. Entomol. 85: 33-39.

Rates B., Bemquerer M. P., Richardson M., Borges M. H., Morales R. A., De Lima M.E., Pimenta A. M. 2007. Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* y *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha) shedding light on venoms from a neglected group. Toxicon 49 (6): 810-826.

Rosenberg J., Hilken G., 2006. Fine structural organization of the poison gland of *Lithobius forficatus* (Chilopoda, Lithobiomorpha). Nor. J. Entomol. 53:119-127.

SENER (2007). Anuario estadístico de la industria petroquímica. Secretaría de Energía. México, D.F. 289 pp.

Shelley R. M. 2002. A synopsis of the North American centipedes of the order Scolopendromorpha (Chilopoda). Virginia Museum of Natural History Memoir, 5: 1-108.

Stankiewicz M., Hamon A., Benkhalifa R., Kadziela W., Hue B., Lucas S., Mebs D., Pelhate M. 1999. Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus* oocyte receptor and an expressed *Drosophila* muscarinic receptor. *Toxicon* 37 (10), 1431-1445.

Steiner H., D. Hultmark A., Engstrom H., Bennich y Boman H.G., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292 (5820): 246-248.

Supakthanasiri, P., Ruxrungtham, K., Klaewsongkram, J., Chantaphakul, H. 2004. Anaphylaxis to centipede bite. *J. Allergy Clinical Immunology* 113: S 244.

Tamez G. P., Medrano R. H., García G. C., Rodríguez P. C., Gómez F. R., Tamez G. R. *Bioplaguicidas: Su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL IV (002)* 143-152.

UNEP. 2007. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. United Nations Environment Programme. [en línea]. http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_sp.pdf. 21/10/20012.

Undheim E. A. B. y King G. F. 2011. On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. *Toxicon* 57: 512-524.

Welsh J. H., Batty C. S., 1963. 5-Hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts. *Toxicon* 1: 165-170.

Wenhua, R., Shuangquang, Z., Daxiang, y S., Guang, 2006. Induction, purification and characterization of an antibacterial peptide scolopendrin I from the venom of centipede *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 43 (2) 88-93.

Zaid E., 1958. On the peptidases and esterases in the venom of *Buthus quinquestriatus* and *Scolopendra morsitans*. *Proc. Egypt. Acad. Sci.* 13: 76-84.

Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395

ANEXO I

Lista de especies mencionadas con su autor

Alternaria alternata (Fr.:Fr)

Bacillus dysenteriae (Shiga, 1898)

Botrytis cinerea (Deb)

Cambarellus cambarellus (Faxon 1898)

Cryptops iheringi (Brölemann, 1902)

Erwinia amylovora (Burill) Winslow et al.

Escherichia coli

Ethmostigmus rubripes (Brandt, 1980)

Fusarium oxysporum (Schlecht.)

Fusarium solani (Mart.) (Sacc.)

Helicoverpa punctigera (Wallengren)

Hyalophora cecropia (Linnaeus, 1758)

Leptophobia aripa (Boisduval, 1836)

Locusta migratoria (L.)

Musca domestica (L.)

Otostigmus scabricauda (Humbert y Saussure, 1870)

Pantoea agglomerans (Swing y Fife, 1972)

Pectobacterium cacticida corrig. (Alcorn et al. 1991) Hauben et al.

Pectobacterium carotovorum (Jones) Waldee

Periplaneta americana (L.).

Phytophthora cactorum (Leb. & Cohn) Schröet

Rhizoctonia solani (Kuhn.)

Rhizopus stolonifer Ehrenb. (Ex Fr.) Lind

Salmonella entérica (L.)

Saccharopolyspora spinosa (Mertz y Yao)

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary

Scolopocryptops ferrugineus (Linnaeus, 1758)

Scolopendra (Linnaeus, 1758)

Scolopendra angulata (Newport, 1844)

Scolopendra gigantea (Linnaeus, 1758)

Scolopendra heros (Girard, 1853)

Scolopendra polymorpha (Wood, 1861)

Scolopendra morsitans (Linnaeus, 1758)

Scolopendra multident (Newport, 1844)

Scolopendra subspinipes (Leach, 1815)

Scolopendra subspinipes. dehaani (Brandt, 1840)

Scolopendra subspinipes mutilans (L. Koch, 1878)

Scolopendra sumichrasti (Saussure)

Scolopendra viridicornis nigra (Bücherl, 1941)

Scolopendra viridis (Say, 1821)

Staphylococcus aureus (L.)

Tenebrio molitor (L.)

Vaejovis mexicanus (C. L. Koch, 1836)

Vibrio cholera (L.)

Xenopus laevis (Daudin, 1802)

ANEXO II

Salida del programa estadístico SAS versión 9.0 con el que se analizaron los bioensayos del veneno de *S. viridis* Say

Prueba Tukey para *Salmonella sp.*

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 15
Error de cuadrado medio 0.903167
Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
Diferencia significativa mínima 2.0751

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	5.5750	4	E 120 µg
A	5.4500	4	C 60 µg
A	4.2500	4	D 90 µg
B	3.0000	4	B 30 µg
B	3.0000	4	A 0 µg

Prueba Tukey para *E. amylovora*

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 15
Error de cuadrado medio 0.124333
Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
Diferencia significativa mínima 0.7699

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	4.0750	4	E 120 µg
A	3.9500	4	C 60 µg
A	3.5750	4	D 90 µg
B	3.5000	4	B 30 µg
B	3.0000	4	A 0 µg

Prueba de Tukey para *P. cacticida*

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 15
Error de cuadrado medio 0.217833
Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
Diferencia significativa mínima 1.0191

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	4.7000	4	E 120 µg
B	3.1250	4	D 90 µg
B	3.0000	4	C 60 µg
B	3.0000	4	B 30 µg
B	3.0000	4	A 0 µg

Prueba Tukey para *P. carotovorum*

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 15
Error de cuadrado medio 0.207167
Valor crítico del rango estudentizado 4.36699
Diferencia significativa mínima 0.9938

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	4.2000	4	E 120 µg
A	4.0750	4	D 90 µg
B	3.2000	4	C 60 µg
B	3.2000	4	B 30 µg
C	3.0000	4	A 0 µg

DCA para *E. coli*

Análisis de un DCA Veneno					
Procedimiento GLM					
Variable dependiente: Numero					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	1.09200000	0.27300000	2.97	0.0542
Error	15	1.37750000	0.09183333		
Total correcto	19	2.46950000			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Numero Media		
0.442195	9.338680	0.303040	3.245000		
Fuente	DF	Tipo IV SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	4	1.09200000	0.27300000	2.97	0.0542

DCA para *P. agglomerans*

Análisis de un DCA Veneno					
Procedimiento GLM					
Variable dependiente: Numero					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	1.09200000	0.27300000	2.18	0.1207
Error	15	1.87750000	0.12516667		
Total correcto	19	2.96950000			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Numero Media		
0.367739	10.90259	0.353789	3.245000		
Fuente	DF	Tipo IV SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	4	1.09200000	0.27300000	2.18	0.1207

Prueba Tukey para *F. oxysporum*

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 18
 Error de cuadrado medio 0.02375
 Valor crítico del rango estudentizado 4.49442
 Diferencia significativa mínima 0.3463

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	4.0000	4	F Benomilo
B	3.5250	4	E 120 µg
C	3.0000	4	C 60 µg
C	3.0000	4	D 90 µg
C	3.0000	4	A 0 µg
C	3.0000	4	B 30 µg

Prueba Tukey para *Rhizoctonia solani*

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 18
 Error de cuadrado medio 0.146111
 Valor crítico del rango estudentizado 4.49442
 Diferencia significativa mínima 0.859

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	4.5000	4	F Benomilo
A	4.2000	4	E 120 µg
B	3.2500	4	D 60 µg
B	3.0000	4	C 90 µg
B	3.0000	4	A 0 µg
B	3.0000	4	B 30 µg

Prueba Tuckey para *Botrytis cinerea*

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 18
 Error de cuadrado medio 0.588333
 Valor crítico del rango estudentizado 4.49442
 Diferencia significativa mínima 1.7237

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	7.0000	4	F Benomilo
B	3.6500	4	D 120 µg
B	3.0000	4	A 60 µg
B	3.0000	4	C 90 µg
B	3.0000	4	E 0 µg
B	3.0000	4	B 30 µg

Prueba Tukey para *Alternaria alternata*

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 18
 Error de cuadrado medio 0.598889
 Valor crítico del rango estudentizado 4.49442
 Diferencia significativa mínima 1.7391

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	6.2500	4	F Benomilo
B	3.9500	4	D 120 µg
B	3.0000	4	A 60 µg
B	3.0000	4	C 90 µg
B	3.0000	4	E 0 µg
B	3.0000	4	B 30 µg

Prueba Tukey para *Rhizopus Stolonifer*

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 18
 Error de cuadrado medio 0.055556
 Valor crítico del rango estudentizado 4.49442
 Diferencia significativa mínima 0.5297

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	3.5000	4	F Benomilo
A	3.0000	4	A 120 µg
A	3.0000	4	C 60 µg
A	3.0000	4	D 90 µg
A	3.0000	4	E 0 µg
A	3.0000	4	B 30 µg

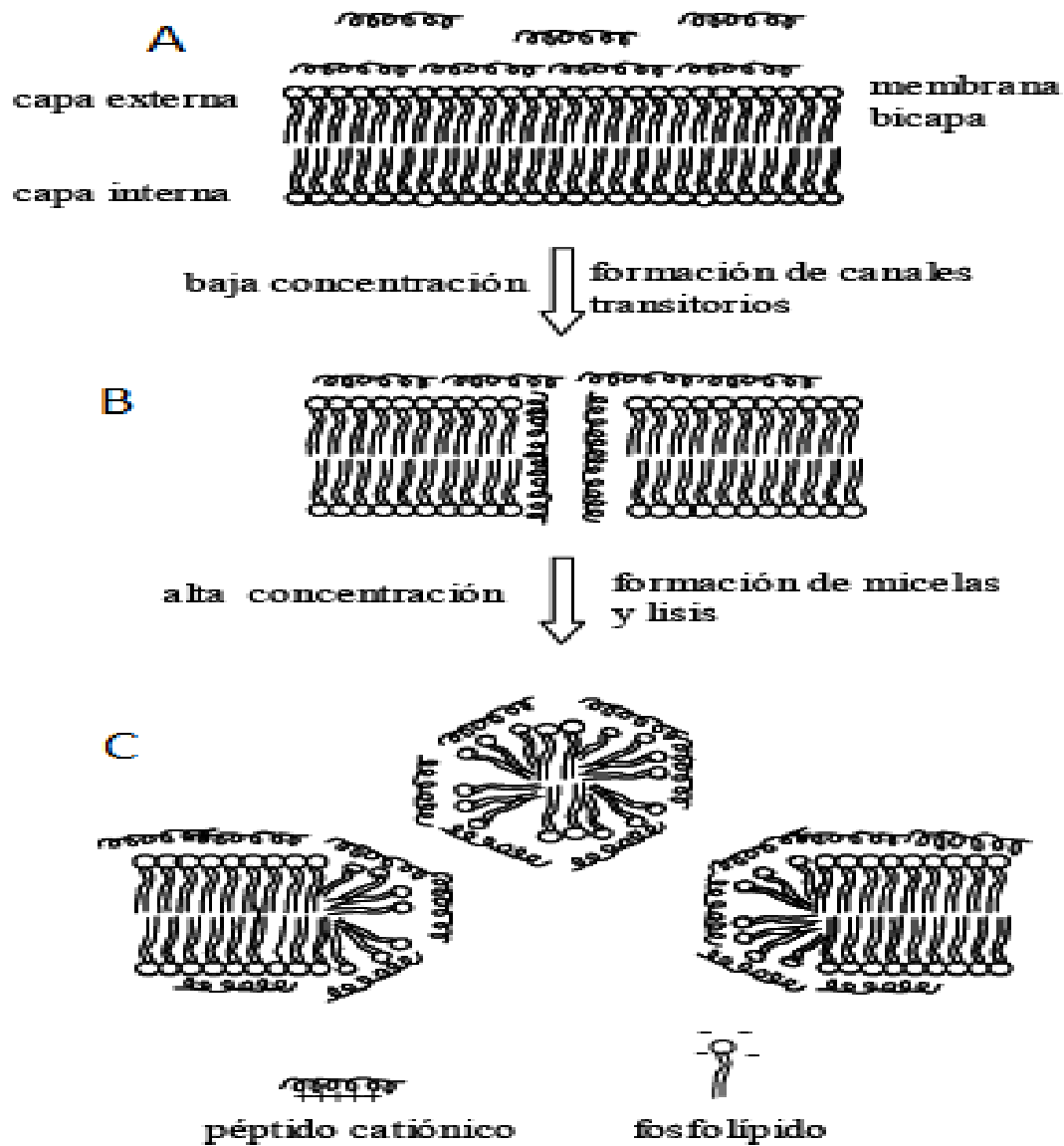
Prueba Tukey para *Colletotrichum sp.*

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 18
 Error de cuadrado medio 0.055556
 Valor crítico del rango estudentizado 4.49442
 Diferencia significativa mínima 0.5297

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	trat
A	3.5000	4	F Benomilo
A	3.0000	4	A 120 µg
A	3.0000	4	C 60 µg
A	3.0000	4	D 90 µg
A	3.0000	4	E 0 µg
A	3.0000	4	B 30 µg

ANEXO III



Interacción de péptidos catiónicos con la membrana celular. (A) Interacción de péptidos con la membrana celular. (B) Formación de poros. (C) Formación de micelas y lisis. (Modificado de González, 2005).

ANEXO IV

1.2. Método de difusión en agar según Kirby Bauer

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica (no concentración) de antimicrobiano, es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CMI.

Esta metodología se encuentra estandarizada para el estudio de *Enterobacteriaceas*, *Pseudomonas aeruginosas* y *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio cholerae*.

El agar Mueller-Hinton deshidratado se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Después de su esterilización en autoclave se deja enfriar en baño María a 50°C, se vacía en placas Petri sobre una superficie plana y asegurando que la profundidad de 4 mm aprox., se puede dejar enfriar a temperatura ambiente, si no se utiliza el mismo día se debe guardar en refrigeración a 2-8 °C por no más de 7 días.

Se deja un control de esterilidad de placas incubando un período de 24 horas.

El pH debe ser controlado, para este medio de cultivo el pH debe ser de entre 7.2-7.4

después de solidificado, por debajo de este valor el antibiótico perderá potencia mientras que otros pueden aumentar su actividad.

También se deberá controlar la humedad, no debe haber agua en la tapa de la placa ni en el agar, si ésta es grande se debe poner las placas en una estufa a 35°C por 10-30 mins.

Para preparar la solución estándar 0.5 de McFarland a 0.5 ml de 0.048 mol/l (1.175 % p/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) se le agrega 99.5 ml de 0.18 mol/l (0.36 N) H_2SO_4 (1% p/v) agitando constantemente para mantener una suspensión para controlar la densidad se utiliza un espectrofotómetro la absorbancia a 625 nm debe leer entre 0.08-0.1 para la solución 0.5 McFarland.

Para la preparación del inóculo se toman de 3-5 colonias y se siembran en 4-5 ml de caldo tripticasa soya, se incuba a 35°C por 2-6 horas y se mide turbidez para que sea igual al estándar de McFarland.

La placa se inocula casi de inmediato en tres direcciones en ángulos de 60°.

Los discos se aplican separados sin recolocar y se dejan incubar a 35°C por 16-18 hrs. para *Staphylococcus* (excepto para vancomicina y oxacilina 48 hrs.), se lee el halo de inhibición y se clasifica dependiendo del resultado (susceptible, susceptibilidad intermedia, resistente). (Vjera, 2000)

Extraído de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/aguiar_g_ae/apendiceB.pdf

Consultado el 01.12. 2012