



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Identificación de *Fusarium verticillioides* en granos de cebada, trigo y maíz mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ROSELL CHÁVEZ MARTHA GABRIELA

ASESOR: Dr. Francisco Montiel Sosa

(Co) ASESOR(a): M. en C. Karla Mariana García Banda



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. EN A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisaremos el: Trabajo de Tesis

Identificación de *Fusarium verticillioides* en granos de cebada, trigo y maíz mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Que presenta la pasante: Martha Gabriela Rosell Chávez
Con número de cuantía: 307110309 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Junio de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. José Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>Dra. Clara Inés Álvarez Marriquet</u>	
SECRETARIO	<u>I.A. Miriam Álvarez Velasco</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dr. Sergio Jiménez Ambríz</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza</u>	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo de Tesis:

Primero que nadie a Dios ya que gracias a él pude llegar hasta aquí.

A mis papas Manuel Rosell Bistrain y Ma. Del Carmen Chávez Jardón que gracias a su educación y esfuerzo para brindarme una preparación estoy aquí. A ellos que siempre fueron mi motor y empuje para crecer profesionalmente, ya que sin su apoyo y motivación no pudiera haber logrado esta meta. A ustedes papitos les dedico éste trabajo lleno de esfuerzo y dedicación ya que sé que a ustedes más que a nadie les llena de orgullo y felicidad ver a su tercer hija realizada profesionalmente ya que no creían que llegaría hasta éste punto, por ello les dedico con todo mi corazón éste gran logro. Gracias por tanto.

A mis hermanos Pamela Berenice Rosell y Jonathan Israel Rosell que a pesar de peleas y burlas como todos los hermanos los quiero mucho y sé que a ustedes también les llena de orgullo ver a su hermanita la menor como una profesionista, les agradezco tanto aquellos consejos e incluso regaños durante éstos 24 años. A ustedes al igual que mis papas les dedico este trabajo ya que siempre fueron mi motivación y ejemplo a seguir para mí desde muy pequeña para superarme y crecer profesionalmente.

A mi changuito que sé que aunque no pueda leer esto le dedico también este gran logro ya que es uno de los regalos más bonitos que la vida me ha dado.

A mis amigos y amigas que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas.

A Felipe que sé que si no lo pongo se enojara, a él que más que nadie me soportó en los últimos semestres de mi carrera y me apoyó en todo momento creyendo en mí.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo recibido por el proyecto PAPIIT.

IN211413

A la Dr. Clara Inés Álvarez por su gran pasión y conocimiento en la microbiología quien fue quien me motivo para realizar éste trabajo.

Al Dr. Francisco Montiel por su enseñanza, conocimiento y apoyo en éste trabajo.

A la M. en C. Karla Mariana García por su enseñanza, compromiso y dedicación para el logro de éste proyecto.

A todos los compañeros y profesores del laboratorio de Biotecnología de los cuales obtuve algún aprendizaje.

Al laboratorio de Biotecnología por brindarme su espacio y material, ya que sin él no se podría haber llevado a cabo éste proyecto.

A cada uno de mis sinodales que con su ayuda pude realizar éste trabajo profesional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES.....	4
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CEBADA	4
1.1.1 Origen	4
1.1.2 Descripción	5
1.1.3 Morfología	5
1.1.4 Clasificación	7
1.1.5 Valor nutritivo	7
1.1.6 Producción	7
1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TRIGO	9
1.2.1 Origen	9
1.2.2 Descripción	10
1.2.3 Morfología	10
1.2.4 Clasificación	12
1.2.5 Valor nutritivo	13
1.2.6 Producción	13
1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MAÍZ	14
1.3.1 Origen	14
1.3.2 Descripción	15
1.3.3 Morfología	15
1.3.4 Clasificación	18
1.3.5 Valor nutritivo	18
1.3.6 Producción	19
1.4 CARACTERÍSTICAS DE HONGOS DE CAMPO	20
1.4.1 Hongos que atacan a la cebada, trigo y maíz.....	20
1.4.2 <i>Fusarium verticillioides</i>	20
1.4.2.1 Morfología.....	21
1.4.2.2 Importancia	22

1.5 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS PATÓGENOS	23
1.5.1 Técnicas basadas en ácidos nucleicos.....	23
1.5.1.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	23
1.5.1.1.1 Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	23
1.5.1.1.2 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	24
1.5.1.1.3 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	25
1.5.1.1.4 Electroforesis	27
1.5.1.1.5 Ventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	27
1.5.1.1.6 Desventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
 CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA	 29
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	29
2.2 OBJETIVO GENERAL	29
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES	30
2.3.1 Particular 1.....	30
2.3.2 Particular 2.....	30
2.3.3 Particular 3.....	30
2.4 Hipótesis.....	31
2.5 Cuadro metodológico	32
2.6 Materiales	33
2.6.1 Material biológico.....	33
2.6.2 Reactivos.....	33
2.6.3 Material de laboratorio	33
2.6.4 Equipo de laboratorio	34
2.7 Métodos	34
2.7.1 Extracción de ADN.....	34
2.7.2 Cuantificación de ADN	35
2.7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa	36
2.7.4 Electroforesis	37

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.1 Cuantificación de ADN de <i>Fusarium verticillioides</i>	39
3.2 Especificidad de cebadores.....	39
3.2.1 Especificidad de cebadores con otras especies	39
3.3 Extracción de ADN	41
3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	49
3.4.1 Evaluación de <i>Fusarium verticillioides</i> en cebada	49
3.4.2 Evaluación de <i>Fusarium verticillioides</i> en trigo.....	51
3.4.3 Evaluación de <i>Fusarium verticillioides</i> en maíz	53
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS	58
ANEXOS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1 Morfología de la espiga de cebada.....	6
1.2 Morfología del grano de cebada.....	6
1.3 Principales estados productores de cebada 2001-2010	8
1.4 Morfología de la planta de trigo.....	11
1.5 Morfología del grano de trigo	12
1.6 Morfología de la planta de maíz.....	17
1.7 Morfología del grano de maíz.....	18
1.8 Producción del maíz.....	19
1.9 Morfología de <i>Fusarium verticillioides</i>	22
1.10 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
2.1 Cuadro metodológico	32
2.2 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para <i>Fusarium verticillioides</i> ...	37
3.1 Especificidad de cebadores de <i>Fusarium verticillioides</i> con especies filogenéticamente cercanas y lejanas	40
3.2 Especificidad de cebadores para <i>Fusarium verticillioides</i> reportados por Bertechini F.C. et al., 2012	41
3.3 Extracción de ADN de granos de cebada.....	44
3.4 Extracción de ADN de granos de trigo	46
3.5 Extracción de ADN de granos de maíz	48
3.6 PCR para granos de cebada.....	50
3.7 Incidencia de mohos en granos de cebada sin desinfectar y desinfectados	50
3.8 PCR para granos de trigo	52
3.9 Frecuencia de hongos identificados en granos de trigo	53
3.10 PCR para granos de maíz	54
3.11 Especies de <i>Fusarium</i> identificados en granos de maíz.....	55

ÍNDICE DE CUADROS

1.1 Composición química de cebada.....	7
1.2 Composición porcentual de los principales componentes del grano de trigo	13
1.3 Composición química del grano de maíz	19
2.1 Componentes de la PCR.....	36
2.2 Cebadores específicos para <i>Fusarium verticillioides</i>	36
3.1 Concentración de ADN de <i>Fusarium verticillioides</i>	39
3.2 Obtención de muestras	42
3.3 Concentración de ADN para los granos de cebada.....	44
3.4 Concentración de ADN para los granos de trigo	46
3.5 Concentración de ADN para los granos de maíz	48

GLOSARIO

ADN ácido desoxirribonucleico.

ADN molde ácido desoxirribonucleico delimitado por los cebadores, al que se dirige la PCR.

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Bret Bromuro de Etidio.

EDTA ácido etilendiaminotetraacético.

dNTP's Desoxirribonucleosidos trifosfato.

Gen Segmento corto de la cadena de ADN.

Cebadores Primers. Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo con el propósito de identificar la contaminación por uno de los hongos patógenos del género *Fusarium* (*Fusarium verticillioides*), en granos de cebada, trigo y maíz, debido a que son hongos caracterizados en atacar a los cereales en el campo antes de su almacenamiento, produciendo micotoxinas capaces de causar efectos crónicos en el ser humano y animales.

La posible identificación del hongo *Fusarium verticillioides* en la cebada, trigo y maíz, se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo una técnica altamente específica, sensible y confiable para una excelente obtención de resultados. Previo a la PCR, se realizó la extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a granos de cebada, trigo y maíz.

La PCR se llevó a cabo en 25µL, con 35 ciclos a temperaturas de 94, 55 y 72°C utilizando los cebadores específicos para *Fusarium verticillioides* reportados por Bertechini F. C., (2012).

Se evaluaron los resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, dando como resultado la identificación de *Fusarium verticillioides* en sólo tres muestras de 30 analizadas, de las que solamente se identificó la presencia de éste hongo en los granos de maíz.

INTRODUCCIÓN

En México se producen granos básicos en la alimentación del ser humano. La cebada, el trigo y el maíz son cereales básicos en la alimentación, siendo la cebada el cuarto lugar en importancia después del trigo y del maíz (Chavarri M, *et. al.*, 2009). La cebada es utilizada en la alimentación porcina, en avicultura y como materia prima para piensos; también tiene importantes aplicaciones en la industria tales como fabricación de cerveza, destilería para obtener alcohol, elaboración de harinas para la panificación, entre otras (Moreno M, *et al.*, 2000). Por otra parte la importancia del trigo en la dieta de los seres humanos reside principalmente en su alto valor energético, además de que contiene más proteínas que el maíz y el arroz. A su ventaja nutritiva se suman sus características de procesamiento únicas entre los cereales, para elaborar una gran diversidad de alimentos procesados y varios otros productos no alimentarios (FAO, 2014). El valor nutricional del maíz es muy similar al de otros cereales, siendo algo superior al del trigo y solo ligeramente al del arroz (Martínez M, *et. al.*, 2009). Tradicionalmente el maíz había sido destinado fundamentalmente a la alimentación humana y animal. Sin embargo, en los últimos años con el avance en los conocimientos científicos y tecnológicos aplicados al estudio del maíz, se pueden obtener una variedad de productos a partir de este grano, incluidos los no alimentarios (SE, 2012).

La alimentación humana y animal en gran parte del mundo se basa en el consumo de granos y sus derivados, los cuales pueden ser invadidos por hongos que causan diferentes problemas en la producción agropecuaria, así como daños a la salud. *Fusarium*, contamina los cereales antes o durante la cosecha, sintetizando metabolitos tóxicos llamados micotoxinas (Chavarri M, *et. al.*, 2009). Los hongos producidos por algunas especies de *Fusarium* como por ejemplo, *Fusarium verticillioides*, son, en parte, los responsables de inhibir la germinación de las semillas, así como la pudrición de la mazorca en el caso del maíz, el deterioro y pérdidas de granos al provocar fumonisinas (Rebuffel P. A, 2014). La fusariosis, es una enfermedad fúngica importante en el trigo, cebada, avena, centeno y maíz, causada por las especies de *Fusarium* (Simsek S, *et al.*, 2012). *Fusarium verticillioides* es una especie de *Fusarium* muy importante que ocurre en el maíz en todo el mundo, capaz de producir una amplia gama de micotoxinas que son un peligro potencial para la salud de los animales y los seres

humanos (Mulé G., *et al.*, 2004). En la actualidad existen técnicas moleculares que permiten identificar al patógeno sin necesidad de cultivarlo con la gran ventaja de aumentar la sensibilidad y la rapidez de la detección fúngica comparada con las técnicas de identificación tradicional (Palomares J.C y Cuenca M, 2007).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica sencilla que permite amplificar una determinada región del genoma de los seres vivos para facilitar su estudio. Ésta técnica se ha abierto, en los últimos años, al ámbito de la micología molecular, cuyas aplicaciones a nivel de detección, identificación y clasificación de hongos se incrementan día a día (Llorens V, *et al.*, 1997). Para la identificación de *Fusarium verticillioides* por medio de técnicas de biología molecular se han utilizado diferentes genes tales como; calmodulina, TEF-1, β -tubulina y más recientemente se ha estudiado el gen *gaoB*. El gen *gaoB* participa en la reacción oxido-reducción de O₂ a H₂O₂ identificado en *Fusarium* y a su vez, clonado a partir de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium subglutinans*. Este estudio pretende plantear una estrategia metodológica que permita la detección de *Fusarium verticillioides* de una manera rápida y precisa, en granos de importancia alimentaria en nuestro país utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA CEBADA

La cebada es la principal materia prima de la industria maltera-cervezera, la malta que se extrae de la cebada también se usa en la fabricación de productos como el whisky, jarabes, sustitutos de café y algunos alimentos. Otros derivados de la malta son productos químicos y otros que se agregan a los alimentos balanceados para ganado y aves de corral. Se tiene una demanda en constante aumento; es uno de los cultivos más antiguos de la humanidad (SIAP, 2014).

1.1.1. Origen

La cebada, es el más antiguo de los cereales que el hombre ha cultivado. Tuvo su origen en Asia y su cultivo en China se registra hacia el 2.800 A.C. donde se utilizaba como alimento humano y animal. Igualmente y con los mismos fines, se cultivaba en Egipto. En lugares como Palestina, Siria, Valle del Éufrates, Irán y Este de Afganistán, se encontraron formas de cebada que fueron usadas por antiquísimos pobladores antes de que se conocieran las variedades cultivadas (en línea www.fenalce.org, 2014).

Originario de Asia occidental y África nororiental, este cereal es el más antiguo en cuanto a empleo alimentario y ha dado origen a los primeros panes que consumió la humanidad. Si bien luego fue desplazado por el trigo, su cultivo se expandió por el uso en destilación de bebidas muy populares (cerveza, whisky, malta, gin). Los primeros panes que consumió el hombre, hace unos 12.000 años, eran a base de cebada (*Hordeum vulgare*); eran oscuros y algo pesados, razón por la cual el trigo tomó luego su lugar. Sin embargo en algunas regiones nunca dejó de utilizarse: es el caso del pan ácimo de Medio Oriente, citado en la Biblia y usado por Jesús en “la multiplicación de los panes”. En las escuelas filosóficas, médicas y matemáticas de los griegos, era el alimento recomendado por Platón, Hipócrates y Pitágoras para los alumnos, por ser ideal para promover la capacidad de pensar, concentrarse y atender las enseñanzas, estando prohibido el consumo de alimentos muy proteicos. Existe una parte del pan que se elabora con cebada: pan de cebada (denominado “pan negro”). Otra pequeña

proporción se destina para la alimentación animal, particularmente de cerdos. Se elaboran bebidas no alcohólicas como son el kvas y el agua de cebada (Gil P., 2010).

1.1.2. Descripción

La cebada es una semilla de la planta herbácea perteneciente a la Familia Gramínea. Su nombre científico es "*Hordeum vulgare*", es el cereal con menor cantidad de proteínas. La planta suele tener un color verde más claro que la del Trigo y en los primeros estados de su desarrollo, la planta de Trigo suele ser más erguida; las flores tienen tres estambres y un pistilo de dos estigmas, es una planta autógama (SAGARPA, 2014).

1.1.3. Morfología

En la Figura 1.1. se muestra la morfología de la espiga de la cebada, donde las espiguillas se encuentran unidas directamente al raquis, dispuestas de forma que se recubren unas a otras. Las glumas son alargadas y agudas en su vértice y las glumillas están adheridas al grano, salvo en la cebada conocida por "desnuda". Las glumillas se prolongan por medio de una arista. La cebada es una planta de hojas estrechas y color verde claro. La planta de cebada suele tener un color verde más claro que la del trigo y en los primeros estadios de su desarrollo la planta de trigo suele ser más erguida. Se estima que un 60% del peso de las raíces se encuentra en los primeros 25 cm del suelo y que las raíces apenas alcanzan 1,20 m de profundidad. El tallo es de porte bajo. Las flores tienen tres estambres y un pistilo de dos estigmas. Es planta autógama; las flores abren después de haberse realizado la fecundación, lo que tiene importancia para la conservación de los caracteres de una variedad determinada (en línea www.infoagro.com, 2014).

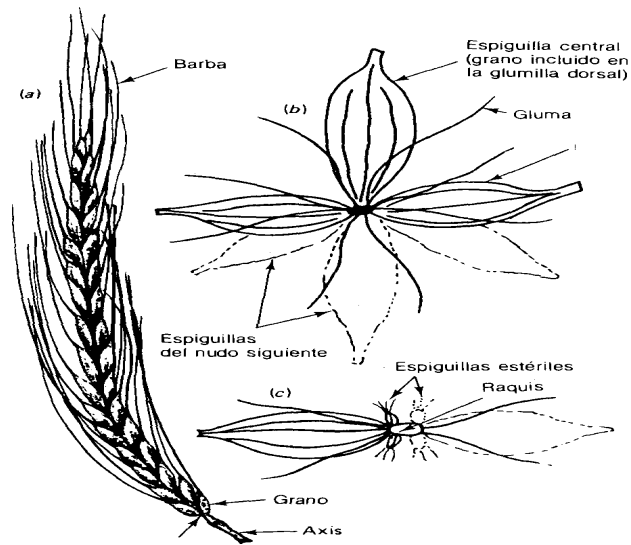


Figura 1.1. Morfología de la espiga de cebada www.rangaputhali.com, 2014.

- El grano:

El grano de cebada es de forma ahusada, más grueso en el centro donde se encuentra el endospermo y disminuyendo hacia los extremos conformado por varias capas del grano hasta llegar a la glumilla dorsal como se puede observar en la Figura 1.2. La cáscara de la cebada (en los tipos vestidos) protege al grano contra los depredadores y es de utilidad en los procesos de malteado y cervecería; representa un 13% del peso del grano, oscilando de acuerdo al tipo, variedad del grano y latitud de plantación (SAGARPA, 2014).

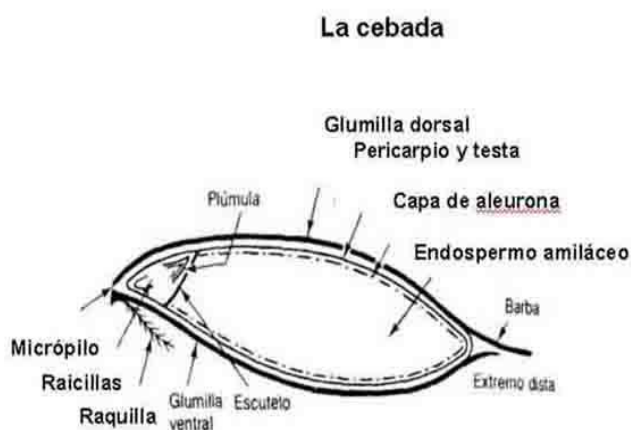


Figura 1.2. Morfología del grano de cebada. www.cervezadeargentina.com, 2014.

1.1.4. Clasificación

Las cebadas cultivadas se distinguen por el número de espiguillas que quedan en cada diente del raquis. Si queda solamente la espiguilla intermedia, mientras abortan las laterales, tendremos la cebada de dos carreras (*Hordeum distichum*); si aborta la espiguilla central, quedando las dos espiguillas laterales, tendremos la cebada de cuatro carreras (*Hordeum tetrastichum*); si se desarrollan las tres espiguillas tendremos la cebada de seis carreras (*Hordeum hexastichum*) (en línea www.infoagro.com, 2014).

1.1.5. Valor nutritivo

El grano de cebada contiene carbohidratos, compuestos nitrogenados, lípidos, vitaminas y minerales que en condiciones de almacén son susceptibles a alteraciones físicas y bioquímicas, siendo la temperatura y humedad relativa los principales factores físicos que causan daños severos y pérdida de la calidad fisiológica de semillas de varios cultivos. En el Cuadro 1.1., se muestran algunos de los componentes del grano de la cebada (Gupta, *et al.*, 2010).

Cuadro 1.1. Composición química de la cebada

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Humedad	12-13
Carbohidratos	65-72
Proteína	10-11
Grasa	1.5-2.5
Fibra	2.5-4.5
Ceniza	2-3

(Callejo, 2002).

1.1.6. Producción

En la actualidad la cebada es el cuarto cereal cultivado a nivel mundial después del trigo, arroz y maíz (FAO, 2014). En México, el cultivo de cebada ocupa una superficie superior a las 300 mil hectáreas al año. Una cuarta parte de esta superficie se siembra en

condiciones de riego en invierno. En la zona centro de México, los principales estados productores de cebada son Guanajuato, Querétaro, Michoacán y Jalisco. La producción de distintas variedades de ésta semilla se concentra en el estado de Guanajuato, en una superficie de 11,000 ha aproximadamente, de donde distribuye a todo el país (García J.J, *et al.*, 2008). A nivel nacional el mayor productor de cebada en el año 2010 fue Guanajuato al tener 225 mil toneladas de producción. La Figura 1.3. muestra que su comportamiento durante los años del diagnóstico no es constante, por lo que ha ocupado el primer lugar y segundo lugar en varios años, solamente superado por el estado de Hidalgo que a partir del año 2006 obtuvo una muy buena producción al llegar por arriba de las 300 mil toneladas de producción, el estado de Zacatecas ha mantenido una constante y durante los últimos años ha incrementado la superficie al llegar a las 7 mil toneladas, ocupando el noveno lugar a nivel nacional, entre Zacatecas, Guanajuato e Hidalgo están los estados de Puebla y Tlaxcala que tienen producciones menores a las 150 mil toneladas. A nivel nacional se cosecharon en el 2010, más de 672 mil toneladas, de las cuales la gran mayoría fue producida en la modalidad de temporal con más de 407 mil toneladas y el resto en la modalidad de riego, participando en ello 16 estados de la república; la gran mayoría de esta producción se destina para abastecer la industria cervecera del país, la mayoría de los estados realizan su producción en temporal siendo Guanajuato el estado que más producción de riego aporta al volumen nacional (SIAP, 2014).

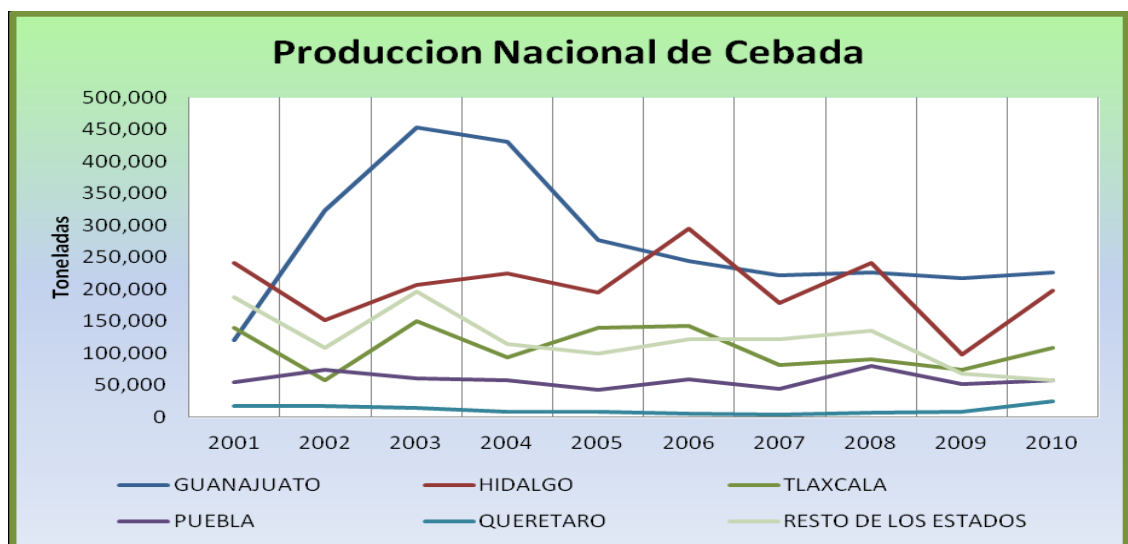


Figura 1.3. Principales estados productores de cebada 2001-2010

(SIAP, 2014).

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TRIGO

El trigo es la planta alimenticia de más extenso cultivo en el mundo entero. Los productos derivados del trigo se adecuan a los usos y costumbres de los pueblos, y han adquirido una gran importancia económica, nutricional y hasta religiosa en muchas partes del mundo (Álvarez L, 2001).

1.2.1. Origen

La industria de la Nueva España realmente consistió en el procesamiento de las materias primas como carnes, cueros, granos, lana y algodón. De estos procesos industriales, en Puebla se trabajó el trigo. El negocio de la harina y el pan exigía una base fuerte de dinero y un flujo constante de capital para adquirir la materia prima, el trigo, y si partimos de que la molienda del grano se convirtió en un magnífico negocio y la mayor preocupación de los panaderos era la consecución del mismo para mantener la reserva necesaria en sus trojes, el contar con liquidez era algo completamente indispensable para dedicarse al oficio; razón por la cual quienes pudieron entrar al oficio y mantenerse en él con éxito, fueron pocos, los que contaban con capital, es decir la clase favorecida, que logró como acabamos de afirmar, crear una oligarquía en la ocupación y controlarla completamente haciendo que se desarrollara bajo sus reglas y condiciones (Morales L. M, 2001). Este cereal es originario de Asia Menor, desde donde se habría extendido a la cuenca del Mediterráneo y a algunos países asiáticos. Posteriormente se difundió al resto de Europa y después de su descubrimiento, a América y Oceanía (Álvarez L, 2001). Entre los cereales, el trigo es uno de los más antiguos conocidos por el hombre (10000 años) y la molienda de sus granos es un proceso aún más antiguo que la agricultura, ya que los granos de trigo recolectados en condición silvestre eran triturados con piedras que hacían las veces de morteros (Evans, L.T, Peacock W.J, 1981). El trigo ha acompañado al hombre aproximadamente 90 siglos, lo que hace que se considere uno de los cultivos más viejos que el hombre ha sembrado como fuente de alimentación. Este cultivo se extiende ampliamente en muchas partes del mundo, quizás por ser una especie que tiene un amplio rango de adaptación y por su gran consumo en muchos países. La necesidad de producir trigo constituye una estrategia extraordinaria para la autosuficiencia económica en todos los países del universo (Moreno I, *et. al.*, 2006).

Desde el inicio de la civilización, el trigo es uno de los cereales más importantes en la alimentación humana. En general no se consume directamente; se usa en la elaboración de alimentos, sobre todo en la industria de la panificación, así como en la fabricación de pastas, galletas, bebidas y hasta en la producción de combustibles (SIAP, 2014).

1.2.2. Descripción

La planta del trigo es un miembro de la familia de las gramíneas del género de *Triticum* que comprende unos 600 géneros y más de 500 especies. Planta gramínea con espigas de cuyos granos molidos se saca la harina. La forma del grano de Trigo es ovalada con extremos redondeados, en uno de ellos sobresale el germen y en el otro hay un mechón de pelos finos conocido como el pincel; los granos de Trigo común pueden ser blandos o duros (SAGARPA, 2014).

1.2.3. Morfología

Las principales características de la planta del trigo se pueden observar en la Figura 1.4.

- 1) La altura varía entre 30 y 180 cm.
- 2) El tallo es recto y cilíndrico. Tiene nudos.
- 3) El nudo es sólido. La mayoría de los trigos tienen seis nudos aproximadamente.
- 4) La hoja es lanceolada, con un ancho de 0.5 a 1 cm y una longitud de 15 a 25 cm.
Cada planta tiene de cuatro a seis hojas.
- 5) La lígula es de longitud media.
- 6) La aurícula es despuntada y tiene pelos. La lígula y la aurícula si sirven en la identificación de las plántulas.
- 7) La plántula. En ella, las hojas se despliegan al nacer, girando en el sentido de las manecillas del reloj. Esta es también una característica en la identificación de las plántulas.
- 8) Amacollamiento. Esta es otra característica en los cereales, las plántulas producen macollos de número variable, generalmente de dos a siete.
- 9) Las raíces del trigo son semejantes a las de la cebada y de la avena.
- 10) Las raíces permanentes o secundarias nacen en el primer nudo.

- 11) Raíces que nacen a partir de la semilla. Normalmente existen cinco raíces seminales, una radical o primaria y cuatro laterales que funcionan durante toda la vida de la planta.
- 12) La espiga del trigo macarrón es densa y corta. Consiste en una infinidad de espiguillas que terminan en una arista o barba.
- 13) Los granos de trigo macarrón son generalmente alargados, puntiagudos, durísimos y de color ámbar rojizo.
- 14) Espiga del trigo común.
- 15) Los granos del trigo común pueden ser blandos o duros.

(Hernández G., 2012).

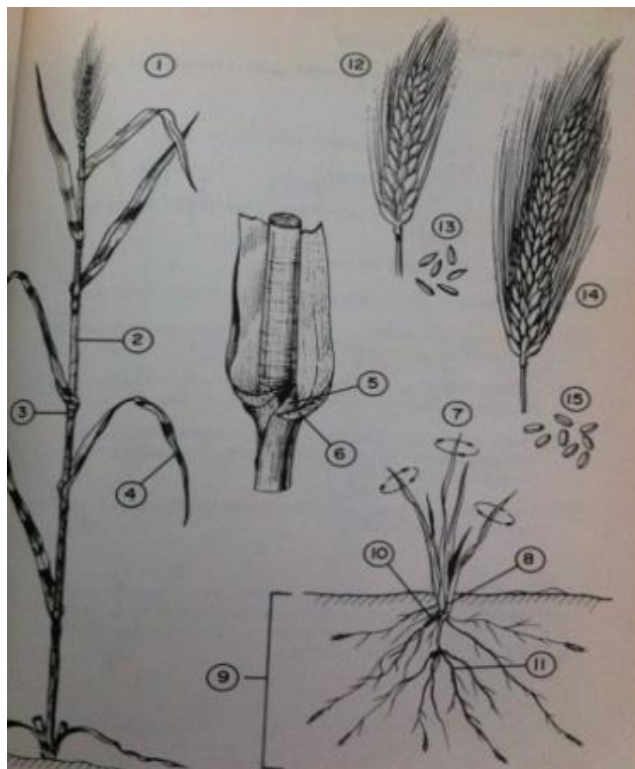


Figura 1.4. Morfología de la planta de trigo.

(Hernández G., 2012).

Los granos son cariósides que presentan forma ovalada con extremos redondos; el germen sobresale en uno de ellos y en el otro hay un mechón de pelos finos. El resto del grano, denominado endospermo, es un depósito de alimentos para el embrión que representa el 82% del peso del grano. A lo largo de la cara ventral del grano hay una

depresión (surco): una invaginación de la aleurona y todas las cubiertas. El grano del trigo contiene una parte de la proteína que se le llama gluten, que permite la elaboración de levaduras de alta calidad, que son necesarias en la panificación (SAGARPA, 2014). La estructura del grano se observa en la Figura 1.5.

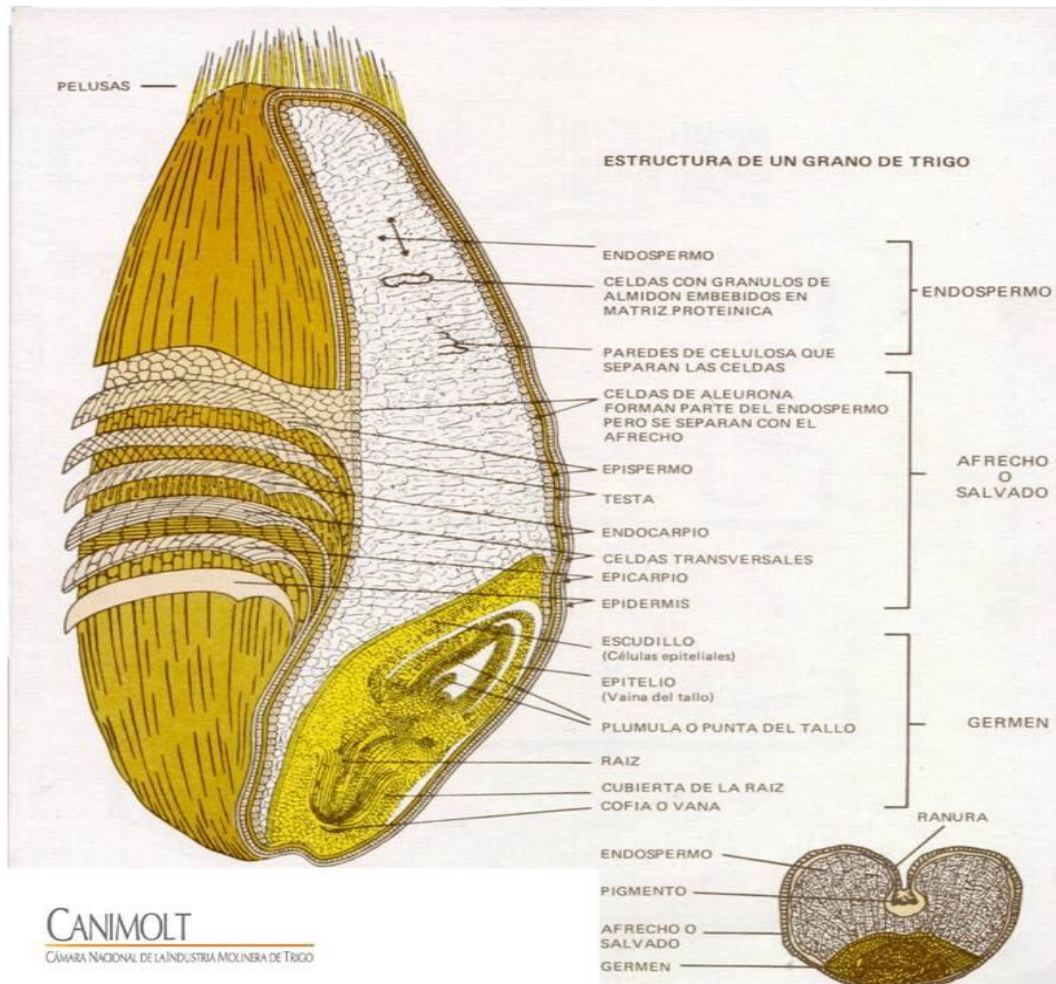


Figura 1.5. Morfología del grano de trigo.

(Hernández G., 2012).

1.2.4. Clasificación

El género *Triticum* comprende alrededor de 30 tipos de trigo, con suficientes diferencias genéticas para ser consideradas especies distintas o subespecies. De ellas, solamente se han reconocido 16 especies y el resto son silvestres, pero dentro de las cultivadas solo dos están en gran escala mundialmente. El trigo harinero y el trigo cristalino o duro son los tipos comerciales: el *Triticum aestivum* L y *Triticum durum* respectivamente. El

trigo harinero (*Triticum aestivum*) cubre cerca de 90% del área total sembrada con trigo mundialmente, mientras que el duro (*T. durum*) llamado también cristalino o macarronero, cubre cerca de 9% total del área triguera mundial, pero solamente aporta el 5% de la producción mundial (Moreno I, *et. al.*, 2006).

1.2.5. Valor nutritivo

El grano de trigo se puede considerar fundamentalmente compuesto por almidón, proteínas, otros polisacáridos que se expresan como fibra cruda, lípidos, minerales (cenizas) y vitaminas como se muestra en el Cuadro 1.2. (Shewry P.R, Halford N. G, 2002). El trigo es un alimento energético y aporta vitaminas a los organismos humano y animal. En los últimos años, el contenido de nutrientes del grano de trigo y sus componentes ha sido objeto de estudio, por lo que se ha conocido su valor como fuente proteica y su superioridad con respecto a la inmensa mayoría de los cereales (Moreno I, 2006).

Cuadro 1.2. Composición de los principales componentes del grano de trigo.

COMPONENTES	MINIMO (gr)	MAXIMO (gr)
Humedad	8.0	18.0
Almidón	60 mg	68 mg
Proteína	7.0	18.0
Lípidos	1.5	2.0
Fibra cruda	2.0	2.5
Cenizas	1.5	2.0

(Matz S, 1999).

1.2.6. Producción

El trigo se cultiva en más de 20 estados de la República Mexicana. Sin embargo, el 80% de la producción se genera en la zona norte (principalmente en el noroeste) y en Guanajuato en el ciclo otoño-invierno (O-I) bajo condiciones de riego; el resto se

genera, en su mayoría, en regiones del centro y el altiplano central en el ciclo primavera-verano (P-V) en condiciones de temporal (Peña R. J, *et al.*, 2007).

En el año 2011, se estimó una producción del orden de los cuatro millones de toneladas, alrededor de 10 por ciento más que en el año anterior (3.7 millones de toneladas). Durante el ciclo agrícola 2012-2013, en el valle de Mexicali, Baja California y Sonora, se produjeron 20,700 toneladas de grano de trigo, con la siembra de 3,813 hectáreas (SAGARPA, 2014).

1.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MAÍZ

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo de gran relevancia para los pueblos latinoamericanos y en especial para México, considerado como el centro de origen y diversidad del maíz, cultivo que ha estado prácticamente en toda su historia y desarrollo (Bedoya C. A., 2010).

1.3.1. Origen

El maíz, desde el Sistema Natural de Linneo (1748), se clasificó dentro del género *Zea* y no había sufrido modificaciones importantes hasta el siglo XX cuando se integró el teocintle a este género. Otros estudios taxonómicos y botánicos realizados a finales del siglo XIX y principios del XX recapitulan la relación y posible evolución del teocintle al maíz. Otros estudios sobre el origen del maíz sugieren que el maíz es un producto de la hibridación del teocintle con otro pasto, quizá extinto. El origen del maíz no ha sido sencillo de rastrear. La mazorca es única entre los cereales y de ahí que la dilucidación de su origen haya sido un gran desafío científico. Por otra parte, el registro fósil de los restos más antiguos del maíz, encontrados en diversas partes de México, demuestran un gran cambio morfológico desde la pequeña espiga femenina (“mazorquita”) del teocintle, con unos cuantos granos de fácil dispersión, y la espiga femenina (mazorca) del maíz con una gran cantidad de granos fuertemente adheridos al “olote” (raquis) (Serratos J. A., 2009).

De igual manera podemos afirmar que la domesticación y el mejoramiento del maíz están fuertemente correlacionados con el desarrollo de la complejidad cultural evidenciada por las grandes civilizaciones de la Mesoamérica prehispánica. La domesticación del teocintle antecede al período histórico Mesoamericano, entre los 4-3 000 años A.C. en la cuenca del río Balsas en el actual estado de Michoacán. Es un proceso que involucra una extensa tradición oral que alude a una época inmersa en mitos y folklore. El maíz no fue el primer cereal domesticado por los primeros mesoamericanos. Sin embargo, para el 2700 A.C. el maíz había sido introducido de Michoacán al Valle de Tehuacán, Puebla, los residentes de las cuevas de Coxcatlán en las estribaciones del sur del valle estaban utilizando un maíz reventador de pequeñas mazorcas (con 6 a 9 frutos por olote), y habían innovado el proceso para la molienda de los frutos de maíz utilizando morteros de piedra para elaborar una especie de pan de poco grosor (Salvador R. J., 2001).

1.3.2. Descripción

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada en éste género de gran importancia económica. Es conocida con varios nombres comunes; el más usado dentro de los países anglófonos es “maize”, excepto en los Estados Unidos de América y Canadá, donde se le denomina “corn” (Bonilla M. N., 2014).

1.3.3. Morfología

Respecto a sus características botánicas, el maíz pertenece a las monocotiledóneas gramíneas. Su morfología se observa en la Figura 1.6.

- ♣ La raíz: son fasciculadas y robustas y su misión es, además de aportar alimento a la planta, ser un perfecto anclaje de la planta que se refuerza con la presencia de raíces adventicias.
- ♣ El tallo: tiene aspecto de caña, con los entrenudos rellenos de una médula esponjosa, erecto, sin ramificaciones y de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 metros de altura. El maíz tiene escasa capacidad de ahijamiento, de hecho

la aparición de algún hijo es un efecto no deseado que perjudica la capacidad productiva.

- ♣ Las hojas: son alternas, paralelinervias y provistas de vaina que nace de cada nudo (gramínea). El número de hojas depende de la variedad y del ciclo, de la época de siembra, etc. pero, aunque podrían llegar hasta 30, lo normal en nuestras condiciones es que haya un máximo de 15 hojas. Parece que el número de hojas está relacionado con el potencial de producción.

El maíz es una planta monoica, tiene flores masculinas y flores femeninas separadas pero en el mismo pie. La flor masculina tiene forma de panícula y está situada en la parte superior de la planta. La flor femenina, la futura mazorca, se sitúa a media altura de la planta. La flor está compuesta en realidad por numerosas flores dispuestas en una ramificación lateral, cilíndrica y envuelta por falsas hojas, brácteas o espatas. Los estilos de cada flor sobresalen de las brácteas formando las sedas. Cada flor fecundada formará un grano que estará agrupado en torno a un eje grueso o zulo. El número de granos y de filas de la mazorca dependerá de la variedad y del vigor del maíz. En general las variedades cultivadas en nuestro entorno contienen entre 600 ó 1.000 granos por mazorca distribuidos entre 16 y 20 hileras (el rango oscila entre 12 y 24 hileras) conteniendo unos 50 granos cada una (Ortas L, 2008).

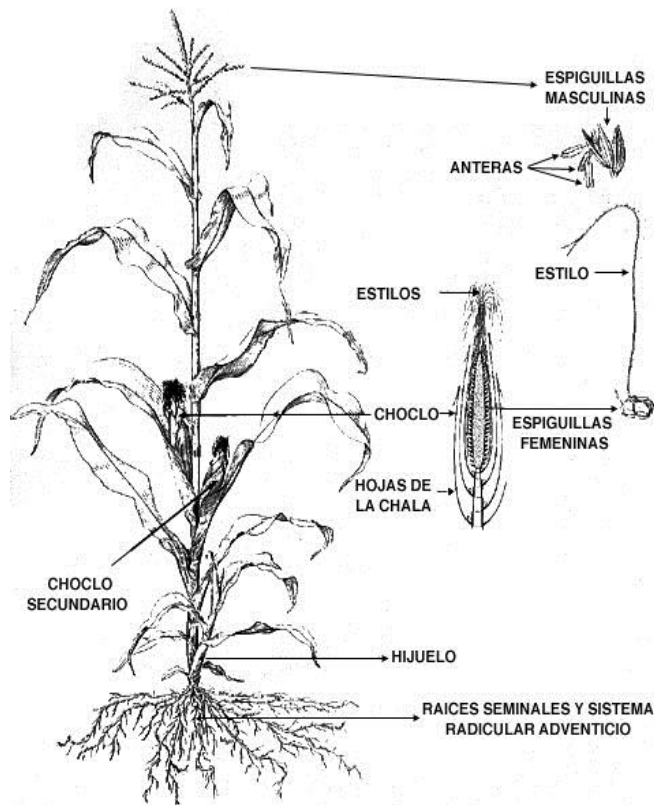


Figura 1.6. Morfología de la planta de maíz. www.imagui.com, 2014.

- El grano: El grano de maíz es el cereal más grande, con un peso de 250 a 300 mg cada uno. Como se observa en la Figura 1.7., éste se compone de una cáscara delgada que encierra a la semilla. La cáscara forma una cubierta completa de la semilla, y está compuesta de la cofia y el pericarpio. El pericarpio, que es la parte estructural más externa del grano, es una película cuyo espesor normalmente varía de 60 a 80 μm , el cual está formado por un tejido denso y correoso. Empezando desde la región exterior, las partes del pericarpio son la cutícula (con grosor de 0.7 a 1 mm), la epidermis (con grosor de 4 a 6 mm), el mesocarpio, las celdas cruzadas y las celdas tubulares (Bartolo P, *et. al.*, 1999).

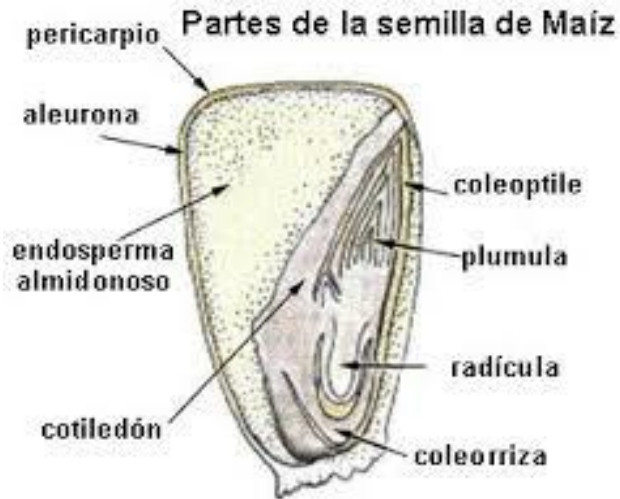


Figura 1.7. Morfología del grano de maíz. www.mejoravegetal.criba.edu.ar/semilla/Germina_2014.

1.3.4. Clasificación

El maíz es clasificado en dos tipos distintos dependiendo de la latitud y del ambiente en el que se cultiva. El maíz cultivado en los ambientes más cálidos, entre la línea ecuatorial y los 30°C de latitud sur y los 30°C de latitud norte es conocido como maíz tropical, mientras que aquel que se cultiva en climas más fríos, más allá de los 34°C de latitud sur y norte es llamado maíz de zona templada; los maíces subtropicales crecen entre las latitudes de 30° y 34° de ambos hemisferios. El maíz tropical a su vez, es clasificado en tres subclases, también basadas en el ambiente: de tierras bajas, de media altitud y de zonas altas (Bonilla M. N, 2014).

1.3.5. Valor nutritivo

Cada una de las partes del grano de maíz difiere considerablemente en su composición química, que a su vez varía ampliamente por causas tanto genéticas como ambientales. El componente químico principal del grano de maíz es el almidón como se puede observar en el Cuadro 1.3. (Benítez C. C, 2006).

Cuadro 1.3. Composición química del grano de maíz.

COMPONENTES	MAÍZ (%)
Agua	12.5
Proteína	9.2
Lípidos	3.8
Almidón	62.6
Fibra cruda	2.2
Minerales	1.3

(Astiazarán I y Martínez J. A, 1999).

1.3.6. Producción

La evolución histórica del consumo mundial de maíz muestra dos periodos importantes, el primero de 1984 a 2003 en el cual dicho indicador muestra una tasa media de crecimiento anual (TMCA) de 2.2%, mientras que en el periodo 2003-2010 ésta fue de 3.8%. Lo anterior indica que desde 2003 inició una nueva era en el dinamismo de la demanda de maíz en el mundo como se puede observar en la Figura 1.8. (SE, 2012).

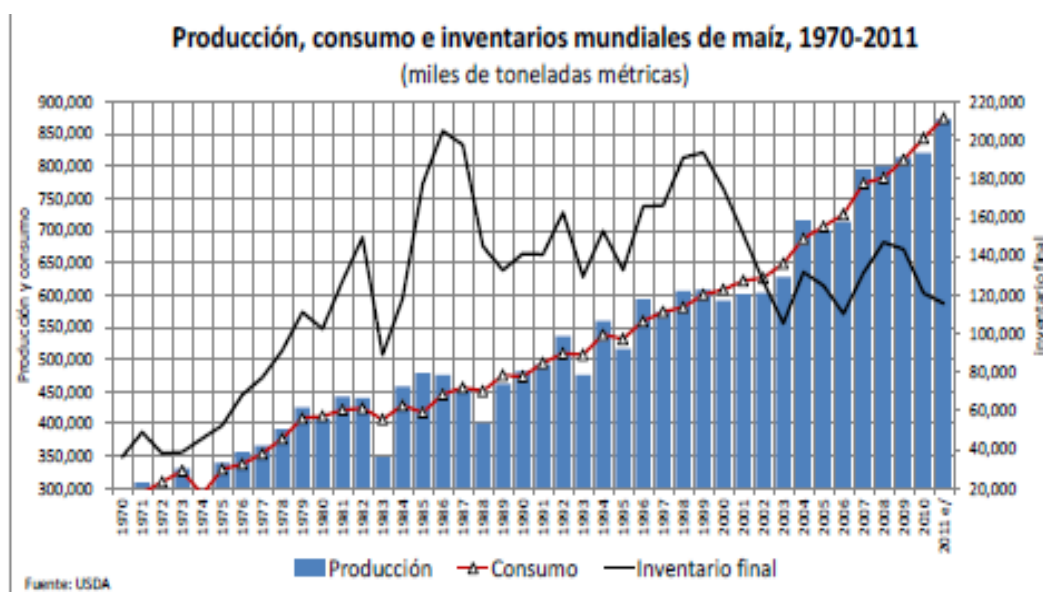


Figura 1.8. Producción del maíz.

(SE, 2012).

La producción mundial por su parte, si bien ha reaccionado de forma importante a los nuevos niveles de demanda en los últimos años, muestra una mayor inestabilidad, lo que hace que el nivel de inventarios aumente en ciertos periodos y se reduzca en otros, provocando inestabilidad en los mercados y presiones en los precios mundiales del maíz (SE, 2012).

1.4. CARACTERÍSTICAS DE HONGOS DE CAMPO

Los hongos de campo son aquellos que invaden las semillas durante su desarrollo en el campo o cuando éstas han madurado y permanecen en el campo, en espera de ser cosechadas. Esta clase de hongos requieren contenidos de humedad en los granos de 25 a 30 por ciento (base húmeda) por lo que detienen su desarrollo cuando las semillas infectadas alcanzan porcentajes de humedad inferiores. Los hongos de campo que predominan varían de acuerdo con la cosecha, localidad geográfica y el clima, pero en el trigo, arroz, cebada y avena, la mayoría corresponde a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Hemilthosporium* y *Fusarium* (Rebuffel P. A, 2014).

1.4.1. Hongos que atacan a la cebada, trigo y maíz.

Varias especies de hongos referibles a los género *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* contaminan los cereales antes o durante la cosecha; durante el almacenamiento pueden, además, sintetizar metabolitos tóxicos llamados micotoxinas (Chavarri M, *et al.*, 2009). Fusariosis, es una enfermedad fúngica importante en el trigo, cebada, avena, centeno y maíz, causada por las especies de *Fusarium* (Simsek S, *et al.*, 2012).

En la cebada las especies referibles al género *Fusarium* infectan al grano y producen tricotecenos (Moreno M, *et al.*, 2000).

Fusarium verticillioides es uno de los patógenos más importantes de maíz en climas más cálidos, lo que provoca la pudrición del tallo y la mazorca (Gherbawy Y, *et al.*, 2001).

1.4.2. *Fusarium verticillioides*

Anteriormente era conocido como *F. moniliforme*; actualmente el nombre de *F. verticillioides* es el que tiene prioridad y es aceptado en forma general, por lo cual, este

es el nombre que debe de ser usado para ésta especie. Está ampliamente distribuido alrededor del mundo y está asociado a granos como la cebada y trigo pero principalmente al maíz donde puede causar pudrición del tallo y podredumbre de la mazorca, siendo el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas cuantiosas y reducción en la calidad del grano que varían año con año. Es más común en climas secos y cálidos; su infección es particularmente dañina si comienza antes de la floración. *F. verticillioides* puede entrar sistemáticamente desde la semilla, a través de heridas en la planta o infecciones en la espiga; a éste hongo se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Este hongo produce micotoxinas conocidas como fumonisinas, que son tóxicas para algunas especies animales (Leslie J. F. y Summerell B. A., 2006; CIMMYT, 2004; De la Torre M.A, *et al.*, 2014).

Fusarium verticillioides puede estar presente en semillas asintomáticas y no es frecuente que reduzca el estar de las plántulas pero sí que su presencia en semilla implique su transmisión a la planta, vía sistémica o endofítica. La transmisión y la infección sistemática de *Fusarium verticillioides* es común y puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas (Carmona M, Scandiani M, 2011).

1.4.2.1. Morfología

El daño que causa *F. verticillioides* se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas de la mazorca. Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso o rayas blancas en el pericarpio y germinan estando aún en el olote. Por lo general, las mazorcas invadidas por barrenadores del tallo son infectadas por esta especie (Leslie J. F. y Summerell B. A., 2006; CIMMYT, 2004).

Morfológicamente *Fusarium verticillioides* es idéntico a las cepas de *F. thapsinum*, también es muy similar a *F. proliferatum* pero ésta última se caracteriza por formar cadenas de microconidios a partir de polifialides como se observa en la Figura 1.9. Las cadenas de microconidios producidas por *F. proliferatum* habitualmente son más

pequeñas que las producidas por *F. verticillioides*. *F. verticillioides* y *F. thapsinum* pueden ser diferenciados de manera fiable solamente utilizando pruebas de apareamiento o marcadores moleculares. *F. verticillioides* es similar en algunos aspectos a *F. nygamai* el cual forma cadenas cortas de microconidios o falsas cabezas en las monofiálides. (Leslie J. F. y Summerell B. A., 2006; CIMMYT, 2004).



Figura 1.9. Morfología de *Fusarium verticillioides* www.ls9.it, 2014.

1.4.2.2. Importancia

Fusarium verticillioides es una especie muy importante que ocurre en el maíz en todo el mundo, capaz de producir una amplia gama de micotoxinas que son un potencial peligro para la salud de los animales y los seres humanos (Mulé G., *et al.*, 2004).

Fusarium verticillioides ataca la planta y a diferentes partes de ella en todos los estadios de crecimiento, induciendo enfermedades de pre y postcosecha que causan una reducción de rendimientos y afectan la calidad del grano (Schulthess K. F., *et al.*, 2002).

1.5. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE HONGOS PATÓGENOS

El diagnóstico molecular se basa principalmente en dos grandes pilares: la hibridación de los ácidos nucleicos y los métodos de amplificación de los mismos. Estos métodos permiten aumentar la sensibilidad y la rapidez de la detección fúngica y, además, identificar al patógeno sin necesidad de cultivarlo. Las técnicas de Biología Molecular basadas en detección de ácidos nucleicos, dispone de pocos protocolos estandarizados con el aval de un uso amplio y contrastado (Palomares J.C y Cuenca M, 2007).

1.5.1. Técnicas basadas en ácidos nucleicos

Son técnicas basadas en el estudio de secuencias específicas de ADN. Las principales técnicas son la hibridación del ADN, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Una clara ventaja de los métodos de detección de ácidos nucleicos, es la posibilidad de detección de patógenos (Palomares, J.C y Cuenca M, 2007).

1.5.1.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (De Dios T, *et al.*, 2013).

1.5.1.1.1 Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) implica un conjunto de tratamientos desarrollados *in vitro* sobre una región de ADN para su amplificación selectiva. El proceso requiere el conocimiento previo de la secuencia de dos regiones cortas que flanqueen a la que se pretende amplificar; estas regiones son utilizadas como cebadores en la reacción de elongación (extensión) catalizada por la polimerasa, para lo cual es necesario previamente conseguir su asociación al ADN molde desnaturalizado (Perera J, *et al.*, 2002).

1.5.1.1.2 Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa consiste en una serie de ciclos como se muestra en la Figura 1.10, y cambios de temperatura. Los pasos de ciclos están precedidos por un choque térmico a una alta temperatura (90-94°C), existiendo otro choque térmico al final del proceso. Las temperaturas y el tiempo aplicados en cada uno de los ciclos dependen de ciertos parámetros (enzima utilizada, desosirribonucleósido-trifosfatos “dNTP’s”, longitud de ADN a amplificar) (Sambrook J y Russell D, 2001).

- **Desnaturalización.** La desnaturalización se debe a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los pares de bases sin existir un rompimiento de enlaces covalentes. Las dos hebras del ADN se separan y pasan a una conformación al azar sin que afecte a la estructura primaria. En ella, el ADN se incuba a elevada temperatura ($\pm 94^{\circ}\text{C}$) de tal manera que se logra la separación de las hebras quedando accesibles a la hibridación de los cebadores (en línea www.cultek.com, 2014).
- **Alineamiento.** Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN sólo se forman cuando la secuencia del primer es muy similar a la secuencia del ADN molde. En ella, la mezcla de reacción se enfría ($\pm 55 - 65^{\circ}\text{C}$) para permitir el alineamiento. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador. Los cebadores actúan como límites de la región de la molécula que se va a amplificar (Sambrook J, Russell D, 2001).
- **Extensión.** En esta etapa la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra de ADN molde añadiendo los Desosirribonucleósido-trifosfatos (dNTP’s) complementarios en dirección $5' \rightarrow 3'$. Esta etapa se suele realizar a $\pm 72^{\circ}\text{C}$, realizándose entre 30 y 50 ciclos en cada reacción (en línea www.cultek.com, 2014).

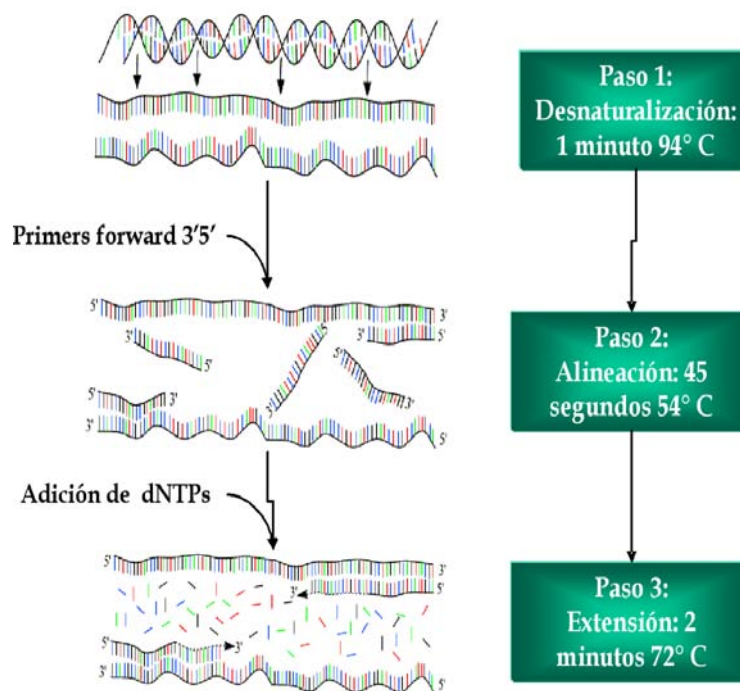


Figura 1.10. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1.5.1.1.3 Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un procedimiento efectivo para generar grandes cantidades de una secuencia específica de ADN *in vitro*. Requiere de componentes esenciales para llevarse a cabo (Balbás P, 2002).

- **Cebadores**

La especificidad y la estabilidad del híbrido formado entre la hebra molde y los cebadores es crucial para el resultado de la reacción de PCR. A la hora de diseñar la estructura de éstos últimos es necesario atender a diversos factores:

- La longitud de los oligonucleótidos utilizados para cebar la reacción de PCR suele ser del rango de 15 a 30 nucleótidos. Cuanto mayor sea su tamaño, mayor es la probabilidad de que se asocien a secuencias no perfectamente complementarias y conduzcan la amplificación de productos no específicos.
- La composición de bases de los cebadores es importante por el efecto que tiene sobre la estabilidad del híbrido.

- Deben evitarse secuencias con bases repetidas (más de 3 ó 4 seguidas), para dificultar uniones no correctas.

(Perera J, *et al.*, 2002).

- **ADN molde**

La cantidad total de ADN utilizada normalmente para la PCR está entre 0,05 y 1,0 µg, lo que permite la detección de ejemplares solos de la secuencia diana. Aunque las muestras no tienen que estar muy purificadas, sí es necesario eliminar algunos contaminantes, como la heparina, el formol, los agentes quelantes de Mg²⁺ o los detergentes, para evitar que inhiban el proceso de amplificación (en línea www.cultek.com, 2014).

- **ADN polimerasa**

Existen dos formas comerciales: la nativa, purificada de *Thermus aquaticus*, y otra modificada por ingeniería genética y expresada en *E. coli* (*AmpliTaq*^{MR}). En ambas la actividad polimerasa va acompañada de una exonucleasa 5' a 3' pero carecen de exonucleasa 3' a 5' por lo que no son capaces de corregir los errores producidos en la extensión, que resultan incorporados al fragmento amplificado con una frecuencia de alrededor de uno por cada 10⁴ nucleótidos. Sus propiedades son equivalentes y ambas se utilizan en reacciones de PCR. También se comercializan otras polimerasas termoestables, como la polimerasa Vent^{MR} de *Thermococcus litoralis*, o la polimerasa *Pfu*, aislada de *Pyrococcus furiosus*, presentación; o como algunas retrotranscriptasas termoestables, utilizadas particularmente en RT-PCR (Perera J, *et al.*, 2002).

- **Cationes divalentes**

En la PCR es fundamental la presencia de cationes divalentes. La concentración de MgCl₂ en la mezcla final de reacción suele estar entre 0,5 y 5,0 mM. Los iones Mg²⁺:

- Forman un complejo soluble con los dNTP, lo cual es fundamental para la incorporación de estos.
- Estimulan la actividad polimerásica.
- Aumentan la temperatura de fusión (T_f) de la interacción cebador / ADN molde (con lo que estabilizan la interacción entre las dos cadenas).

Generalmente, una concentración baja de Mg_{2+} provoca un rendimiento bajo, mientras que una concentración elevada de Mg_{2+} hace que se acumulen productos inespecíficos. Es importante evitar que en la solución de ADN molde haya una concentración elevada de agentes quelantes, como el EDTA, o de grupos iónicos con carga negativa, como el fosfato (Somma M y Querci M).

- **Desoxirribonucleósido-trifosfatos (dNTP's)**

La enzima necesita de Mg para poder incorporar a los dNTP's. Para la síntesis de ADN hacen falta dNTP's libres. La concentración de cada uno de los dNTP's para la PCR debe estar entre 20 y 200 μM (Sambrook J. y Russell D, 2001).

1.5.1.1.4 Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema. En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN y los marcadores de peso molecular (Padilla *et al.*).

1.5.1.1.5 Ventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Una ventaja de éstas técnicas es que no importa el origen de la muestra a estudiar ya que la molécula de ADN se encuentra en todas las células del ser vivo, así como también,

que la molécula del ADN es relativamente termoestable, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos (Palomares, J.C y Cuenca M, 2007).

La PCR posee características especiales que la hacen útil en la identificación y diagnóstico debido a su especificidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad (Bolívar A. M, 2013).

1.5.1.1.6 Desventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Produce una alta tasa de errores en la incorporación de dNTP's; la polimerasa *Taq*, carece de actividad exonucleasa 3' a 5' y por lo tanto, de la capacidad para la revisión del nucleótido incorporado y en su caso, para la degradación y sustitución por el correcto. Esto provoca la incorporación de errores con una frecuencia de alrededor de 1×10^{-4} por ciclo (Perera J, *et al.*, 2002).

Su aplicación no es todavía de rutina en los grandes laboratorios de diagnóstico. Las precauciones son importantes en el desarrollo de esta técnica. Debido a su elevada sensibilidad, es esencial evitar contaminaciones por ADN extraño que pudieran interpretarse en resultados falsos positivos (Bolívar A. M., 2013).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1. JUSTIFICACIÓN

La cebada, el trigo y el maíz son cereales básicos e importantes tanto en la alimentación humana como en la alimentación animal debido a su gran aporte energético y nutrientes que contienen; por ello son los principales cereales en la industria alimentaria. Estos cereales pueden ser invadidos por hongos causando diferentes problemas en la producción agropecuaria, siendo de gran importancia desde el punto de vista de salud pública.

Fusarium verticillioides es un especie fúngica muy importante en los cereales a nivel mundial. Aun cuando *Fusarium* es más comúnmente encontrado en maíz, es un patógeno que también puede estar presente en trigo y cebada y ser capaz de producir sustancias tóxicas (fumonisinas) que pueden causar diversas enfermedades severas, agudas y crónicas en animales y humanos, así como también es capaz de producir la podredumbre del grano y de la espiga, causando pérdidas económicas muy importantes.

Fusarium verticillioides es el responsable prácticamente de todos los casos de infecciones invasivas en animales y humanos, así mismo produce lesiones diseminadas como queratomicosis, úlceras y onicomycosis, además de ser uno de los principales patógenos de plantas.

Por ello es importante realizar métodos que identifiquen la presencia de éstos hongos; la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica actualmente utilizada para la identificación de hongos, resaltando que entre ellos, las especies de *Fusarium*, de una forma rápida, específica y sensible.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de *Fusarium verticillioides* en granos de cebada, trigo y maíz mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

2.3.1. OBJETIVO PARTICULAR 1

Extraer el ADN presente en muestras de granos de cebada, trigo y maíz por el método de extracción orgánica con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico descrito por Sambrook con la finalidad de obtener soluciones de ADN de cada una de las muestras a analizar.

Actividades:

- 1.- Investigación bibliográfica de los protocolos a seguir para la experimentación mediante artículos científicos.
- 2.- Leer la pureza y concentración del ADN en el nanoespectrofotómetro NANODROP-1000.

2.3.2. OBJETIVO PARTICULAR 2

Comprobar la especificidad de los cebadores dirigidos al gen *gaoB*, utilizando una cepa de referencia de *Fusarium verticillioides*₍₁₎ reproduciendo las condiciones de PCR reportadas bibliográficamente.

Actividades:

- 1.- Seleccionar un programa de amplificación basado en artículos científicos.
- 2.- Búsqueda bibliográfica de cebadores que delimiten la zona de amplificación
- 3.- Aplicar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el ADN de referencia para comprobar la especificidad de los cebadores seleccionados.

(1). ADN de referencia previamente extraído en trabajo reportado (García B. K, 2014).

2.3.3. OBJETIVO PARTICULAR 3

Identificar la presencia de *Fusarium verticillioides* en los granos de cebada, trigo y maíz utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y electroforesis.

Actividades:

- 1.- Aplicar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores seleccionados a partir del gen *gaoB* de la galactosa oxidasa.
- 2.- Evaluar por electroforesis los productos de PCR para identificar la presencia de *Fusarium verticillioides* en granos de cebada, trigo y maíz.

2.4. HIPÓTESIS

Si al aplicar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a los granos de cebada, trigo y maíz, amplifica para una secuencia del gen *gaoB* de la galactosa oxidasa, se puede decir entonces que el hongo *Fusarium verticillioides* está presente en éstos cereales.

2.5. CUADRO METODOLÓGICO

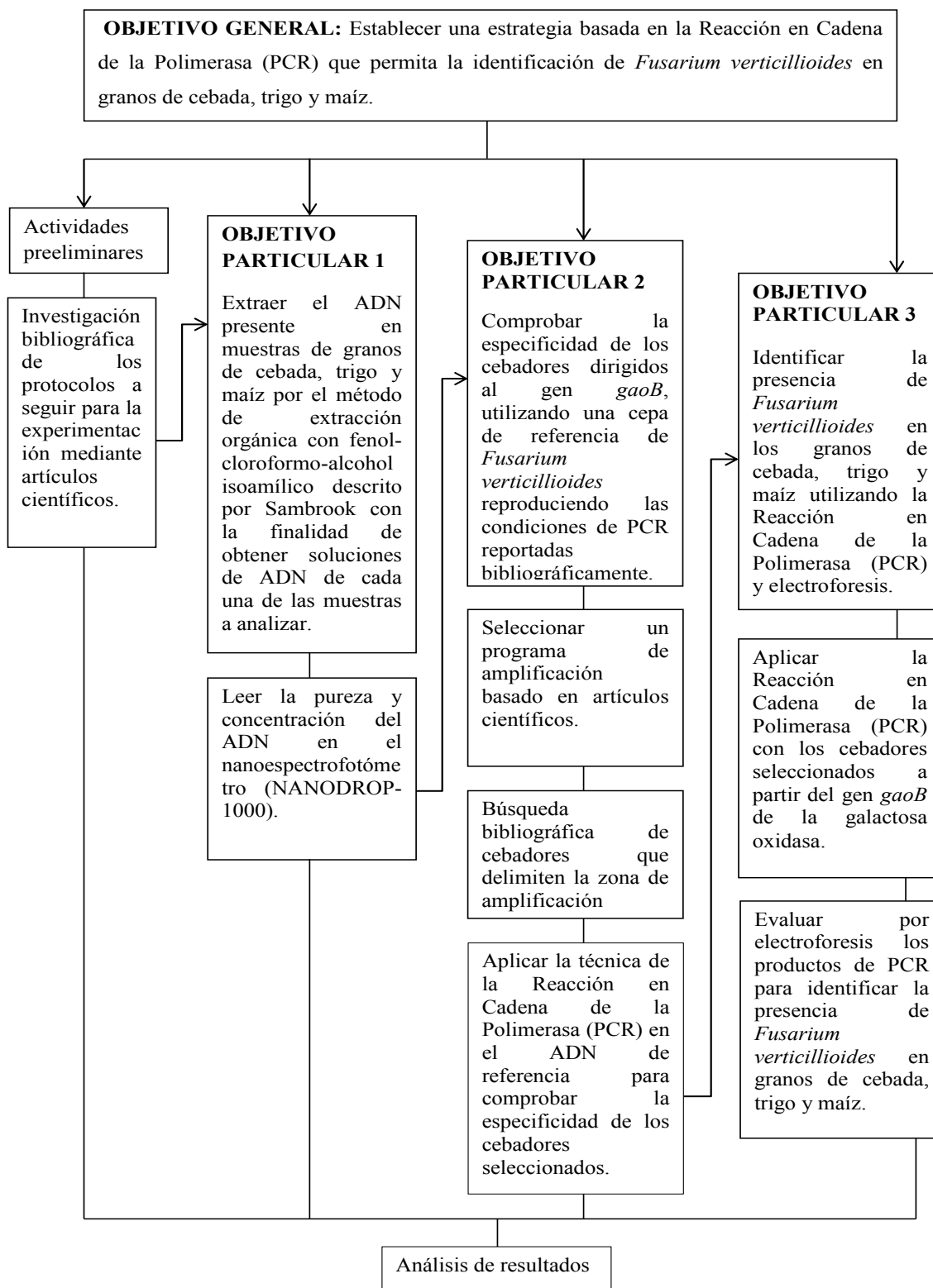


Figura 2.1. Cuadro metodológico

2.6. MATERIALES

2.6.1. Material biológico

- Granos de cebada (*Hordeum vulgare*)
- Granos de trigo (*Triticum* spp.)
- Granos de maíz (*Zea mays* L.)
- ADN extraído de la cepa de *Fusarium verticillioides*
- Cebadores específicos del gen de la galactosa oxidasa (*gaoB*) para *Fusarium verticillioides*

2.6.2. Reactivos

- Solución de Lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- Enzima Proteinasa K
- Mezcla Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
- Etanol
- Agua libre de Nucleasas
- Kit para PCR, *Promega*®:
 - Master mix (50 unidades de Taq ADN polimerasa, 400μM de cada dNTP y 3 mM de MgCl₂)
- Agarosa, *Gibco ERL*®
- Tris acetato y EDTA (TAE) 1x como solución buffer, pH=8
- Bromuro de etidio (Bret) en concentración de 10mg/ml
- Marcador de peso molecular, *Promega*®
- Tinte cargador azul/naranja 6x, *Promega*®

2.6.3. Material de laboratorio

- Tubos Eppendorff
- Gradilla
- Mortero con pistilo
- Matraz Erlenmeyer
- Probeta
- Parafilm

2.6.4. Equipo de laboratorio

- Agitador Vortex, *Genie*® K-55-G 120 VOLTS
- Balanza analítica electrónica, *Startorius*® 162g
- Juego de micropipetas, *Rainin*®
- Microcentrifuga, *Force mini*®
- Incubadora eppendorf, *Thermomixer compact*®
- Espectrofotómetro, Abccesolab NanoDrop ND-1000 A113
- Termociclador, *Apollo*® ATC401 CLP
- Fuente de poder, Bio-Rad *PowerPac*® 1000
- Cámara y cassette de electroforesis, *Apollo*® 75.710
- Transluminador Clavel Scientific LTD
- Cámara fotográfica Kodak digital Science®

2.7. MÉTODOS

2.7.1. Extracción de ADN

Se llevó a cabo el protocolo propuesto por Sambrook (2001) para realizar la extracción de ADN de las muestras de interés (granos de cebada, trigo y maíz).

Para la disgregación del tejido:

- ❖ Se molió la muestra y se colocaron 125mg en un tubo Eppendorff.
- ❖ Se agregaron 1250µL de Lisis para el rompimiento de la membrana celular, agitando en el vortex.
- ❖ Se adicionaron 7µL de proteinasa K.
- ❖ Se incubó el tubo a 50°C en Thermomixer por 2 horas, pasando las dos horas se inactivó la enzima dejando el tubo a 60°C por 1 hora.

Para la extracción de proteínas y polisacáridos:

- ❖ Se agregaron 250µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico mezclándolo varias veces.
- ❖ Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos recuperando la fase acuosa superior (donde se encuentra el ADN) trasladando esta fase a 2 tubos Eppendorff nuevos.

Para la precipitación del ADN:

- ❖ Se adicionaron 1000 μ L de etanol frío a cada uno de los tubos mezclándolos suavemente. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos y se decantó el etanol dejándolos secar en la incubadora a 37°C hasta que se observó el ADN pegado a la pared del tubo.
- ❖ Para re suspender el ADN se agregaron 50 μ L de agua libre de nucleasas mezclando suavemente hasta una completa disolución. Cuando la solución presentó partículas insolubles se intentó nuevamente la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se volvió a lavar con etanol (Sambrook J, Russell D, 2001).

2.7.2 Cuantificación de ADN

La relación 260/280 nm se utilizó como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteínas ya que los aminoácidos aromáticos absorben la luz a 280nm. Por ello, para cuantificar el ADN se tomaron las lecturas de la relación 260/280.

Se cuantificó el ADN extraído de los granos de cebada, trigo y maíz; así como también el ADN de referencia de *Fusarium verticillioides* previamente extraído en trabajos anteriores (García B. K., 2014).

- ❖ Se calibró el equipo con 2 μ L de agua libre de nucleasas colocándolos en el brazo del equipo.
- ❖ Se abrió el programa de NANODROP, desde un computador seleccionando ácidos nucleicos.
- ❖ Para la cuantificación del ADN, se colocaron 2 μ L de la muestra en el equipo y se siguió el mismo método registrando la concentración dada en ng/ μ L de ADN y la pureza dada por la relación 260/280.

2.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se llevó a cabo en 25µL siguiendo la metodología que reporta García B. K. (2014), conteniendo los reactivos en las cantidades que se indican en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Componentes de la PCR

COMPONENTE	VOLUMEN (µL)
Master Mix	12.5
Cebador frontal	0.5
Cebador reverso	0.5
ADN molde	1.5
Agua libre de Nucleasas	10

Para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa se programó el termociclador utilizando los cebadores específicos reportados bibliográficamente (anexo) y las condiciones reportadas por Bertechini F. C., (2012) para *Fusarium verticillioides* como se observan en el Cuadro 2.2 y Figura 2.2 respectivamente.

Cuadro 2.2. Cebadores específicos para *Fusarium verticillioides*

ESPECIE	GEN	CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>GaoB</i> (galactosa oxidasa)	Frontal	CACTGGTGGTAACGATG CG	370 pb
		Reverso	CACCCTGAGTGCCCTTG GTG	

35
CICLOS

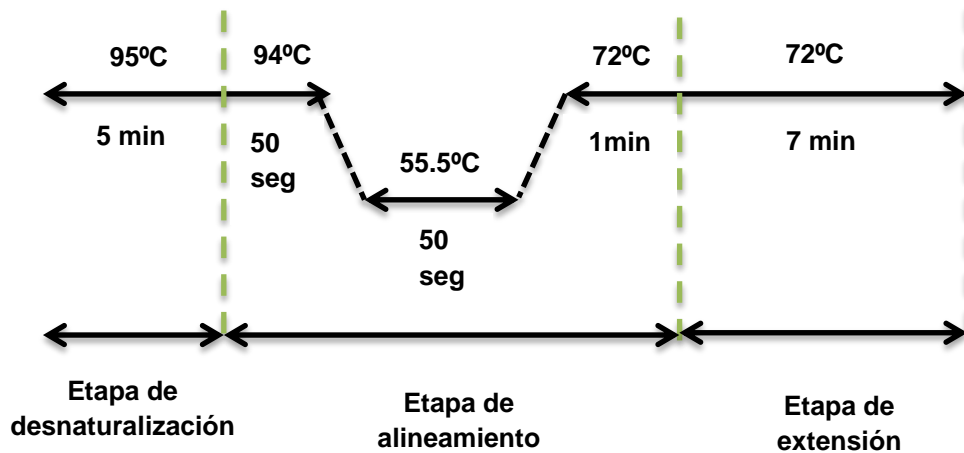


Figura 2.2. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *Fusarium verticillioides*

2.7.4. Electroforesis

Es una técnica para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos mediante el movimiento de éstas en un campo eléctrico; en la cual se realizó un análisis para los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante electroforesis en gel de agarosa. Para preparar un gel al 1% se realizó el siguiente procedimiento:

- Se pesaron 0.5g de agarosa y se agregaron 50 ml de TAE 50x.
- Se sometió a calor hasta que se logró disolver la agarosa sin que llegó a la ebullición.
- Se enfrió a temperatura ambiente.
- Se agregaron aproximadamente 0.05 ml (una gota) de bromuro de Etidio.
- En la charola de la cámara de electroforesis se colocó el peine para la formación de pozos y posteriormente se agregó la solución.
- Se esperó hasta que solidificó y una vez formado el gel, se retiró el peine con cuidado.
- Se colocó la charola en la caja de electroforesis.
- Se agregó TAE 1X a la cámara de electroforesis, cubriendo por completo el gel.

En la cámara de electroforesis se colocaron los productos de PCR y un marcador de peso molecular, el cual ayudó a identificar el tamaño de los productos de PCR. Para ello se realizó lo siguiente:

- En un parafilm se colocaron 5 μL del producto de PCR, 3 μL de tinte cargador azul/naranja 6x y 3 μL de BRET.
- Con una micropipeta se homogenizó la muestra y se transfirió a uno de los pozos del gel de agarosa (las muestras siempre fueron a partir del pozo 2, ya que en el primero se colocó el marcador de peso molecular).
- Se realizó el punto anterior para cada una de las muestras.
- Se cerró la cámara de electroforesis y se corrió la fuente de poder a 70V aproximadamente.
- Cuando el tinte cargador azul/naranja 6x pasó más de la mitad del gel se apagó la fuente de poder y se retiró el gel con unas espátulas para no romperlo.

Se colocó el gel en el transluminador de luz UV Clavel Scientific LTD para el análisis del gel de agarosa, obteniendo una fotografía de éste con la cámara fotográfica Kodak digital Science®.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CUANTIFICACIÓN DE ADN DE *Fusarium verticillioides*

El ADN de referencia de *Fusarium verticillioides* se cuantificó para verificar que se encontrara en cantidad y calidad adecuada para su posterior utilización en la PCR mediante espectrofotometría en el NANODROP-1000, los resultados obtenidos se muestran a continuación en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Concentración de ADN de *Fusarium verticillioides*.

Muestra	260/280	ng/mL
<i>Fusarium verticillioides</i>	1.89	390.6

En el Cuadro 3.1. se observa un valor de 1.89 en la relación 260/280, lo cual nos indicó que el ADN estaba ligeramente contaminado con restos de ARN, ya que en ésta relación cuando el valor está por arriba de 1.8 quiere decir que la reacción se encuentra contaminada con ARN y cuando el valor está por debajo de 1.8 está contaminada con proteína; sin embargo, este valor aún se considera apto para que el ADN sea utilizado para estudios posteriores al no estar tan lejano del valor óptimo; por otro lado, la concentración del ADN de *Fusarium verticillioides* fue de 390.6 ng/mL, siendo un valor apto para ser utilizado posteriormente para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ya que la cantidad mínima que se necesita es 60 ng/mL.

3.2. ESPECIFICIDAD DE CEBADORES

3.2.1. Especificidad de cebadores con otras especies.

La especificidad de los cebadores fue evaluada utilizando las secuencias reportadas por Bertechini F. C., (2012), para *Fusarium verticillioides* utilizando especies filogenéticamente cercanas (*Fusarium graminearum*) y lejanas (papa, carne de caballo, pollo, chile, papaya y tomate). Una vez obtenidos los cebadores, se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para comprobar que no amplificara para ninguna otra especie de origen vegetal y animal y ni para algún otro hongo del género *Fusarium*

como se muestra en la Figura 3.1. Para comprobar el tamaño de amplificado, se colocó en el gel de agarosa un marcador de peso molecular de 100pb. Debido a la sensibilidad que muestra la Reacción en Cadena de la Polimerasa es importante tener controles internos en la reacción para evitar “falsos positivos”, para ello se adicionó un tubo que no contiene ADN, este tubo es denominado “blanco”, el cual no amplificó en ninguno de los casos con lo que se comprobó que la reacción no fue contaminada y se realizó correctamente.

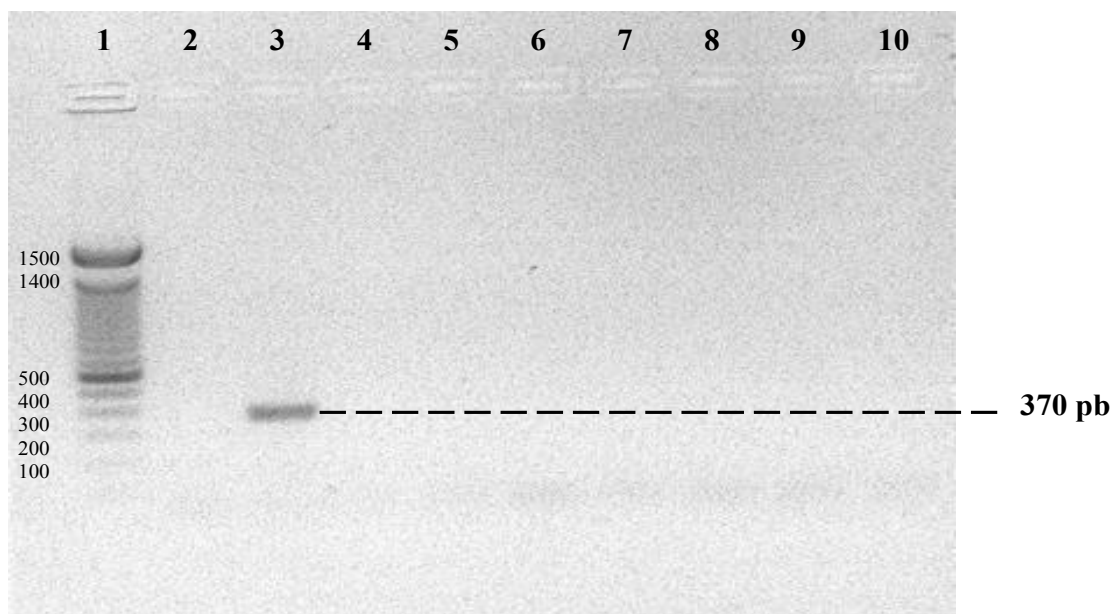


Figura 3.1. Especificidad de cebadores de *Fusarium verticillioides* con especies filogenéticamente cercanas y lejanas. Gel de agarosa al 1%, corrido a 60V. 1) Marcador de peso molecular de 100pb; 2) Blanco; 3) *Fusarium verticillioides* (cepa de referencia); 4) Papa; 5) Caballo; 6) Pollo; 7) Chile verde; 8) Papaya; 9) Tomate; 10) *Fusarium graminearum*.

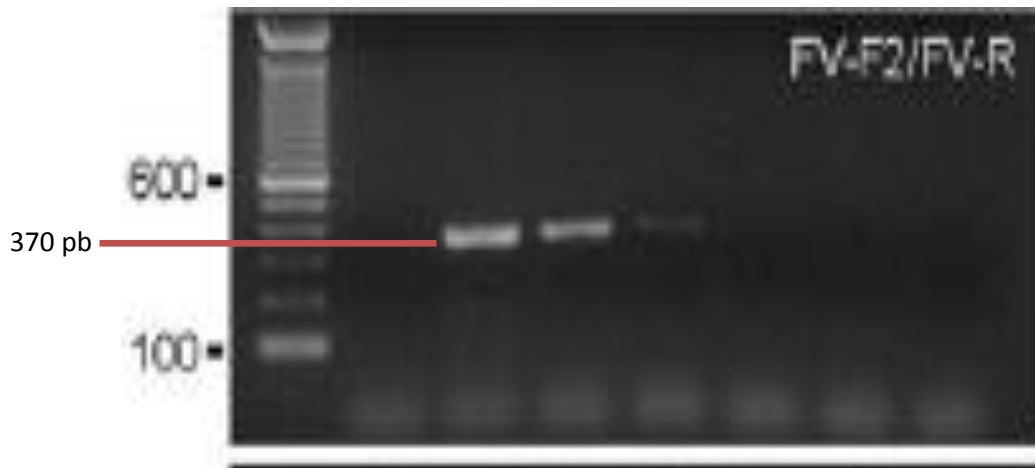


Figura 3.2. Especificidad de cebadores para *Fusarium verticillioides* reportado por Bertechini F. C, *et al.*, 2012.

Realizando un análisis de la Figura 3.1., se comprobó que los cebadores fueron específicos para *Fusarium verticillioides*, ya que con un amplificado de 370 pares de bases (pb) como lo reporta (Bertechini F. C, *et al.*, 2012), solamente aparece la banda donde se esperaba amplificara, en el pozo 3, que es donde se encuentra el ADN de referencia de *Fusarium verticillioides* (control positivo) y no en ninguna otra especie vegetal ni animal. Por otra parte, tampoco hubo un amplificado para *Fusarium graminearum*, lo cual quiere decir que los cebadores si fueron específicos para *Fusarium verticillioides* dentro de su género *Fusarium*.

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN

Se obtuvieron 30 muestras de granos (10 muestras de cada cereal), de diferentes lugares de origen elegidas al azar como se describe en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2 Obtención de muestras

No. De muestra	Cebada	Trigo	Maíz
1	Mercado La Merced (México D.F)	Mercado La Merced (México D.F)	San Martín (Hidalgo)
2	Tianguis (Ecatepec Edo. Morelos)	Mercado Coacalco (Edo. De México)	Ahualulco (Jalisco)
3	Central de Abastos (México D.F)	Tianguis (Ecatepec Edo. Morelos)	Poblado de Huitzatarito (Gto)
4	Tianguis (Coyoacán)	Michoacán, Morelia	Chiapas
5	Mercado Coacalco (Edo. De México)	Puebla, Puebla	Jaral del Progreso (Guanajuato)
6	Puebla, Puebla	Michoacán, Morelia	Campeche
7	Campo 4 (Cuautitlán Edo. De México)	Mercado Martínez de la Torre (D.F)	Pachuca
8	Michoacán, Morelia	Tianguis temporal semillas Col. Roma (D.F)	Guadalajara
9	Toluca, Edo. De México	Tienda “El molino” (Edo. De México)	Hidalgo
10	Cuernavaca, Morelos	Tienda “Ángel” (Edo. De México)	Guanajuato

De acuerdo a la metodología establecida, se extrajo el ADN de todas las muestras de cebada, trigo y maíz, a las cuales se leyó su concentración de ADN en el espectrofotómetro, mostrándose los resultados en los Cuadros 3.3., 3.4. y 3.5. respectivamente.

Los valores dados en ng/ μ L determinan la concentración de ADN de las muestras, así mismo se muestra la relación 260/280, la cual nos permite conocer la pureza del ADN extraído, siendo un valor de 1.8 el que denota que el ADN es puro, valores por arriba de 1.8 indican que el ADN está contaminado con ARN; valores por debajo de 1.8 indican contaminación con proteínas.

En el Cuadro 3.3. se presentan los valores obtenidos del ADN extraído de los granos de cebada, observándose que no todas las muestras contienen la misma concentración de ADN (ng/ μ L), ya que mostraron diferencia entre ellas; en promedio se puede decir que son concentraciones con alto contenido de ADN, las cuales se diluyeron para tener una concentración de 60 ng/ μ L y así poder tener más cantidad de ADN para más pruebas. De las diez muestras solo tres se encontraron contaminadas con proteínas al presentar valores abajo de 1.8 (muestras 2, 4 y 7), mientras que el resto estuvieron contaminadas con ARN; siendo las muestras número 9 y 10 las que presentaron un ADN más puro mostrando valores de 1.81 y de 1.83 en la relación 260/280.

Las extracciones de ADN de los granos de cebada se leyeron en un gel de agarosa al 1% (Figura 3.3.), donde se observa que las muestras 9 y 10 presentaron un ADN más puro coincidiendo con la relación 260/280 que presenta el Cuadro 3.3. En las muestras 2 y 8 también se observa un ADN limpio, mostrándose unas bandas más tenues, mientras que el resto de las muestras se observan contaminadas con ARN y proteínas (Figura 3.3). Aún contaminadas, el valor de la relación 260/280 y la concentración en ng/ μ L fueron aceptables para realizar posteriormente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que los valores de la relación 260/280 no se encuentran tan lejanos del valor óptimo (1.8) y la concentración de todas las muestras es mayor de 60 ng/ μ L que es el valor mínimo para su utilización posterior.

Cuadro 3.3. Concentración de ADN para los granos de cebada

MUESTRA	260/280	ng/ μ L
Cebada 1	1.85	1912.0
Cebada 2	1.78	442.6
Cebada 3	1.86	957.4
Cebada 4	1.66	1272.6
Cebada 5	1.93	736.2
Cebada 6	1.93	738.2
Cebada 7	1.70	1192.4
Cebada 8	1.90	764.4
Cebada 9	1.81	838.8
Cebada 10	1.83	482.7

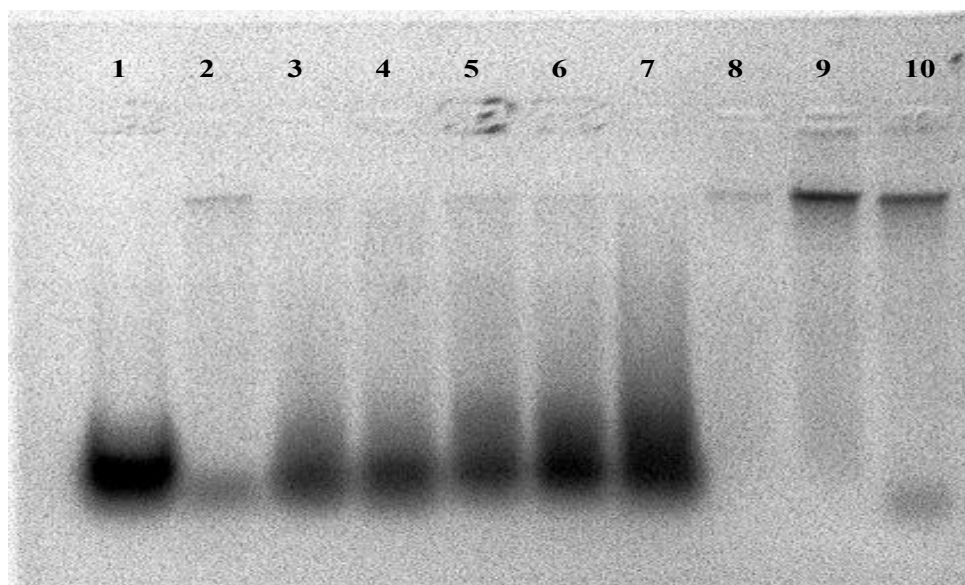


Figura 3.3. Extracción de ADN de granos de cebada. Gel de agarosa al 1%, corrido a 60V. 1)Muestra 1; 2)Muestra 2; 3)Muestra 3; 4)Muestra 4; 5)Muestra 5; 6)Muestra 6; 7)Muestra 7; 8)Muestra 8; 9)Muestra 9; 10)Muestra 10.

Las concentraciones de ADN de los granos de trigo que se muestran en el Cuadro 3.4 dadas en ng/ μ L, en comparación con las concentraciones de cebada, tienen mayor cantidad de ADN, aunque esto no quiere decir que el ADN contenido en las muestras es

más puro. En el Cuadro 3.4. se observa que la muestra 9 fue la de menor concentración de ADN en comparación con las demás, sin embargo la cantidad contenida es apta para su uso posterior; por otra parte, se puede observar que ninguna muestra de trigo fue contaminada con proteínas ya que todas las muestras tienen en la relación 260/280 un valor arriba de 1.8, lo cual indica que están contaminadas con ARN, la muestra 7 la que presentó un ADN más puro al presentar un valor de 1.81, mientras que las muestras 2, 3 y 4, fueron las más contaminadas con ARN ya que presentaron un valor de 2.09, 2.06 y 2.04 respectivamente, en las cuales probablemente sea mayor cantidad de ARN que de ADN, lo cual pudo afectar en la PCR al no tener probablemente la cantidad requerida de ADN.

En la Figura 3.4. se muestran los ADN extraídos de los granos de trigo; en general, en todas las muestras se observa claramente el ADN presente en los granos de trigo. La muestra 1 fue la que presentó una banda más clara debido a que fue la muestra con mayor cantidad de ADN con una concentración de 3899.5 ng/ μ l y con un ADN más puro que la mayoría de las muestras teniendo un valor más cercano al óptimo en la relación 260/280. Sin embargo, por otra parte, en la muestra 2 se observa una banda muy tenue en comparación con el resto de las muestras. Comparando con el Cuadro 3.4, se puede ver que la muestra 2 es la que presentó una relación 260/280 más elevada, por lo que se comprueba que sí es la muestra más contaminada con ARN y por lo tanto, la que presentó un ADN menos puro. Por lo tanto se puede mencionar que el ADN extraído de los granos de trigo están en condiciones adecuadas para ser sometidos a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Cuadro 3.4. Concentración de ADN para los granos de Trigo

MUESTRA	260/280	ng/ μ L
Trigo 1	1.88	3899.5
Trigo 2	2.09	1474.3
Trigo 3	2.06	3891.6
Trigo 4	2.04	2106.4
Trigo 5	1.90	919.6
Trigo 6	1.86	2007.1
Trigo 7	1.81	1039.3
Trigo 8	1.96	1018.5
Trigo 9	1.96	586.7
Trigo 10	1.97	1073.5

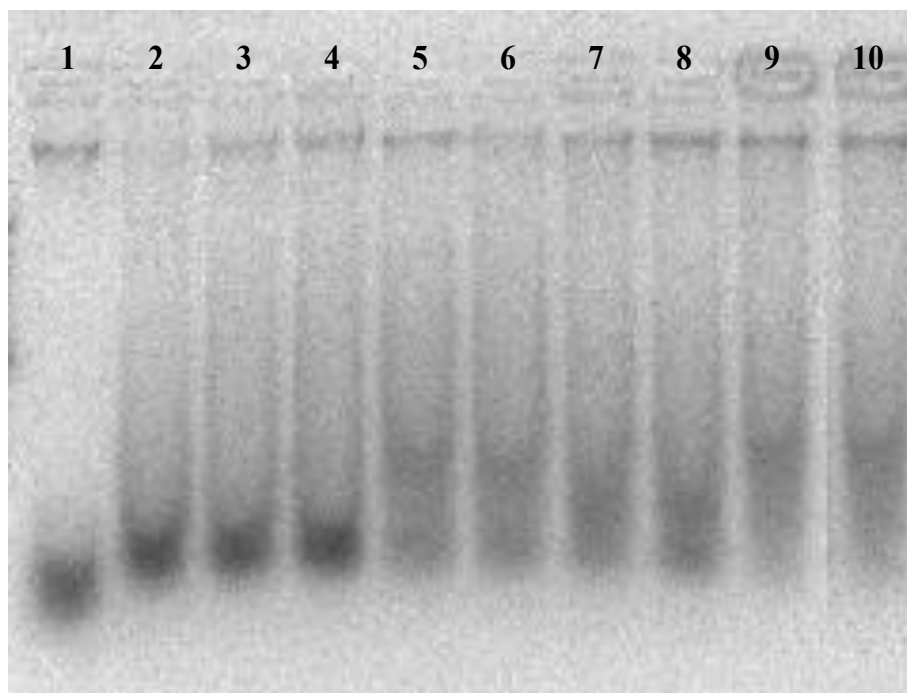


Figura 3.4. Extracción de ADN de granos de trigo. Gel de agarosa al 1%, corrido a 60V. 1)Muestra 1; 2)Muestra 2; 3)Muestra 3; 4)Muestra 4; 5)Muestra 5; 6)Muestra 6; 7)Muestra 7; 8)Muestra 8; 9)Muestra 9; 10)Muestra 10.

En las concentraciones de ADN que se muestran en el Cuadro 3.5. correspondientes a los granos de maíz, muestran una gran diferencia entre ellas en un rango de 300 a 1300 ng/ μ L, al igual que en la pureza del ADN que lo muestra la relación 260/280 existe diferencia entre los valores, siendo la mayoría de las muestras contaminadas con proteínas al tener un valor por debajo de 1.8 y siendo la muestra 10 la única que presentó un valor de 1.84, por lo que se encontró contaminada con ARN. Al ser las muestras 1, 7 y 10 las más cercanas al valor de 1.8, se puede creer que fueron las muestras con ADN extraído más puro que el resto, sin embargo dos de éstas muestras (7 y 10) son las que presentaron un valor más bajo que el resto en la concentración de ADN.

En un gel de agarosa al 1% se cargó el ADN extraído de cada una de las 10 muestras de los granos de maíz como se muestra en la Figura 3.5., donde se observa que en las muestras 1 y 2 no se encontró gran cantidad de ADN al presentarse unas bandas muy tenues en comparación con las demás, sin embargo, el cuadro 3.5. muestra lo contrario en la muestra 1, por lo que probablemente debido a que la muestra se encontró contaminada con proteínas, la mayor cantidad de ADN eran proteínas y no ADN puro. Por otro lado, la muestra 6 también presentó una banda muy tenue en el gel de agarosa, debido a que como se muestra en el Cuadro 3.5. fue una de las muestras que a pesar de presentar mayor concentración de ADN, es una de las muestras con mayor contaminación de proteínas al mostrar un valor de 1.65 en la relación 260/280., sin embargo en el resto de las muestras se observa más ADN y más limpio en comparación con el ADN de los granos de cebada y trigo; por lo que la extracción resultó excelente para continuar con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Cuadro 3.5. Concentración de ADN para los granos de maíz.

MUESTRA	260/280	ng/ μ L
Maíz 1	1.78	1150.9
Maíz 2	1.66	907.6
Maíz 3	1.63	751.7
Maíz 4	1.74	1485.1
Maíz 5	1.67	979.5
Maíz 6	1.65	1260.1
Maíz 7	1.76	397.2
Maíz 8	1.70	948.6
Maíz 9	1.61	905.7
Maíz 10	1.84	484.2

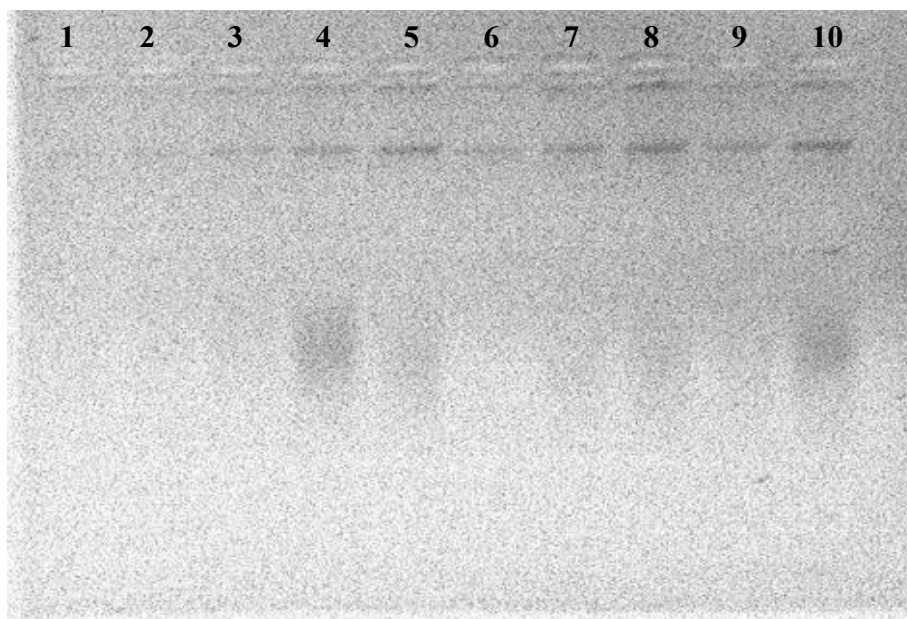


Figura 3.5. Extracción de ADN de granos de maíz. Gel de agarosa al 1%, corrido a 60V. 1)Muestra 1; 2)Muestra 2; 3)Muestra 3; 4)Muestra 4; 5)Muestra 5; 6)Muestra 6; 7)Muestra 7; 8)Muestra 8; 9)Muestra 9; 10)Muestra 10.

3.4. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tuvo como objetivo identificar la presencia de *Fusarium verticillioides* en granos de cebada, trigo y maíz, mediante el ADN previamente extraído de estos granos, evaluándolos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, debido al tamaño del amplificado (370 pb).

3.4.1. Evaluación de *Fusarium verticillioides* en cebada

Se evaluaron las diez muestras de cebada mediante PCR, colocando un marcador de peso molecular de 100 pb para comprobar que el tamaño del amplificado (370 pb) se encuentre entre las bandas de 300 y 400 pb; también se colocó un blanco para corroborar que la reacción no haya estado contaminada con algún otro componente.

En la Figura 3.6., podemos observar que la reacción no fue contaminada ya que no se tuvo un amplificado en el blanco, mientras que para el control positivo si se muestra un amplificado como se esperaba al encontrarse ahí el ADN de referencia. Sin embargo, en la mayoría de los pozos se pueden observar unas bandas tenues a la altura de los 100 pb, esto probablemente nos indica que son restos de cebadores únicamente. Por otro lado, en ninguno de los pozos donde se colocaron las muestras de cebada tampoco se muestra ningún amplificado; por lo que el resultado fue que ninguna de las muestras analizadas estuvo contaminada por *Fusarium verticillioides*. Los resultados obtenidos se pueden deber a que las muestras analizadas fueron muy pocas para el porcentaje que se ha hallado en otros artículos, como es el trabajo realizado por Chavarri M, (2009) en el cual coinciden éstos resultados; donde identifican hongos en granos de cebada, al identificar a *Fusarium verticillioides* pero en un porcentaje despreciable englobándolo en mohos totales, ya que se detectaron hongos de mayor importancia como se muestra en la Figura 3.7.

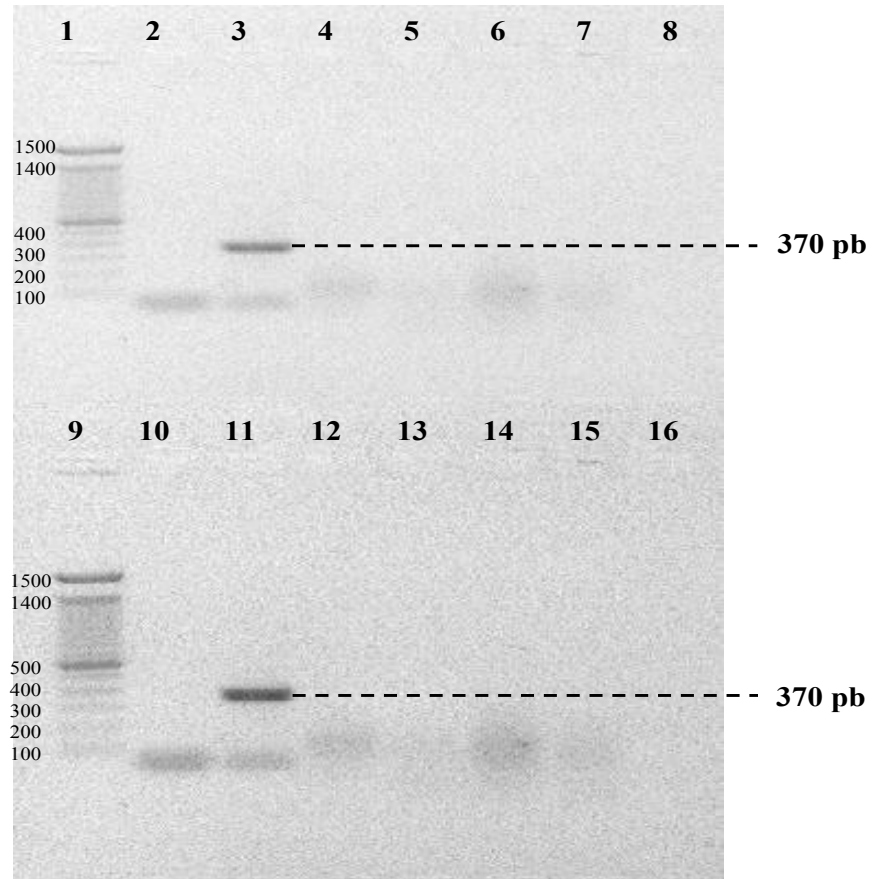


Figura 3.6. PCR para granos de cebada. Gel de agarosa al 1.5%, corrido a 60V. 1 y 9) Marcador de peso molecular de 100 pb (100-1500 pb); 2 y 10) Blanco; 3 y 11) *Fusarium verticillioides* (cepa de referencia); 4) Muestra 1; 5) Muestra 2; 6) Muestra 3; 7) Muestra 4; 8) Muestra 5; 12) Muestra 6; 13) Muestra 17; 14) Muestra 8; 15) Muestra 9; 16) Muestra 10.

Mohos	Granos sin desinfectar	Granos desinfectados
<i>Aspergillus spp.</i>	3,04 A*	0,25 B
<i>Aspergillus flavus</i>	3,71 A	0,00 B
<i>Eurotium chevalieri</i>	2,29 A	0,04 B
<i>Cladosporium spp.</i>	1,04 A	0,04 B
<i>Aspergillus niger</i>	1,08 A	0,13 B
Mohos totales	27,88 A	2,83 B

Figura 3.7. Incidencia de mohos en granos de cebada sin desinfectar y desinfectados. Chavarri M, (2009).

3.4.2. Evaluación de *Fusarium verticillioides* en trigo

Se aplicó la PCR a las diez muestras de trigo y se evaluaron mediante electroforesis, colocando en un gel de agarosa al 1.5% un marcador de peso molecular que nos permite identificar el tamaño de amplificado y un blanco que al tener un amplificado en él, nos indicará que la reacción está contaminada con algún otro componente.

La Figura 3.8. muestra la ausencia de *Fusarium verticillioides* en todos los granos de trigo al igual que en los granos de cebada al no tener ningún amplificado en los pozos donde se colocaron las diez muestras de trigo; observando la Figura 3.9, se puede decir que en el caso del trigo se puede deber a que el hongo que predomina en los granos de trigo es *Fusarium graminearum*, justificando de esta manera la ausencia de *Fusarium verticillioides* junto con la poca probabilidad de encontrar algún amplificado por la cantidad baja de muestras analizadas. En el pozo 2 en donde se colocó el blanco, se observa que tampoco hubo un amplificado el cual descarta cualquier error en la reacción, siendo entonces los pozos 3 y 11 los únicos amplificados, donde se encuentran los ADN de *Fusarium verticillioides* (control positivo/cepa de referencia).

Aunque *Fusarium graminearum* sea el hongo mayormente encontrado en el trigo, los resultados esperados eran encontrar al menos una muestra de trigo infectada por *Fusarium verticillioides*; sin embargo Sandoval M. E, (2012) nos comprueba que este hongo también es frecuentemente hallado en estos granos y no siendo un porcentaje despreciable, así como también nos comprueba que existen otros hongos dentro del género de *Fusarium* que se encuentran presentes en los granos de trigo como lo reporta en su trabajo realizado en la identificación de diversos hongos en el trigo como se muestra en la Figura 3.9.

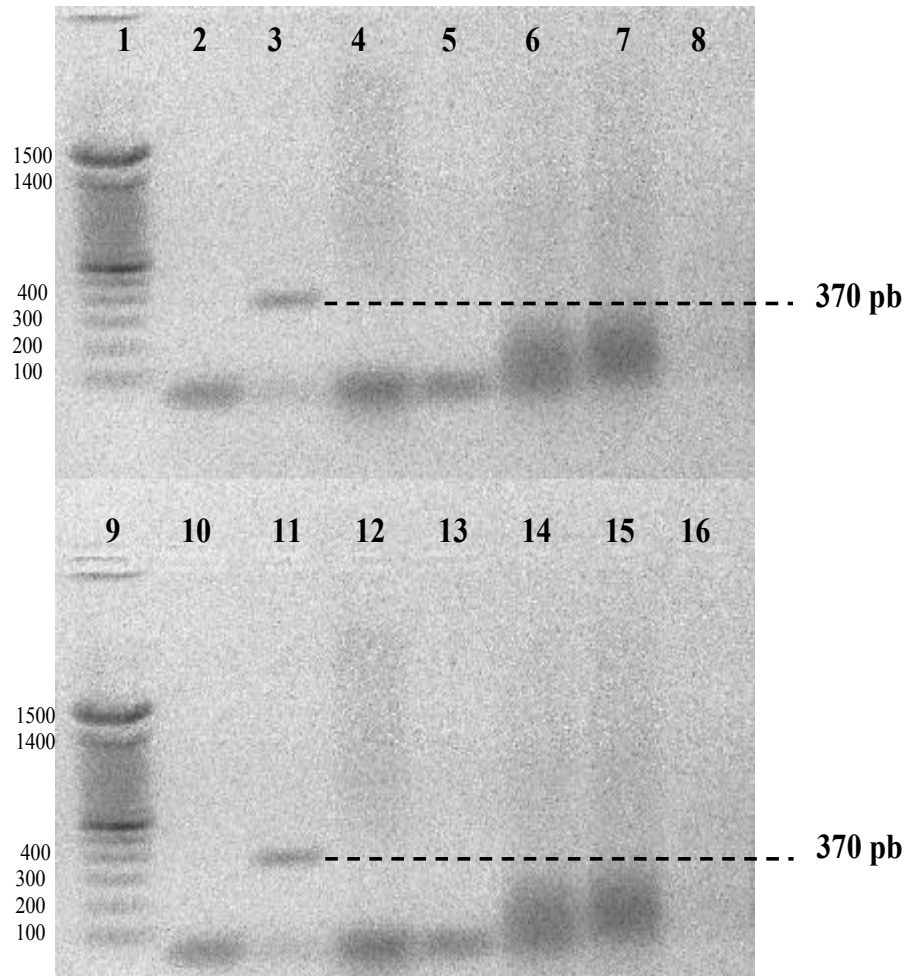


Figura 3.8. PCR para granos de trigo. Gel de agarosa al 1.5%, corrido a 60V. 1 y 9) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2 y 10) Blanco; 3 y 11) *Fusarium verticillioides* (cepa de referencia); 4) Muestra 1; 5) Muestra 2; 6) Muestra 3; 7) Muestra 4; 8) Muestra 5; 12) Muestra 6; 13) Muestra 17; 14) Muestra 8; 15) Muestra 9; 16) Muestra 10.

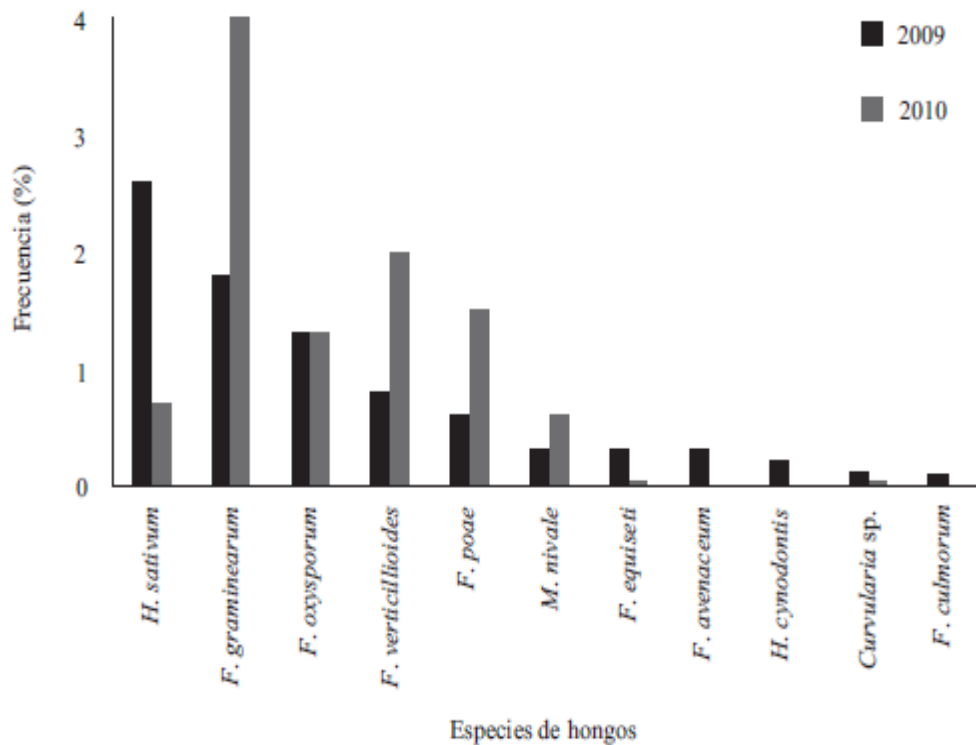


Figura 3.9. Frecuencia de hongos identificados en granos de trigo producidos en 2 ciclos (2009 y 2010). Sandoval M. E, (2012).

3.4.3. Evaluación de *Fusarium verticillioides* en maíz

Las diez muestras de maíz sometidas a PCR, se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y espectrofotometría que permitió observar los resultados de la PCR aplicada.

En la Figura 3.10. se observa que el blanco ubicado en los pozos 2 y 10 no amplificó, lo cual indica que la reacción se llevó a cabo correctamente al no estar contaminada con ningún reactivo. Por otra parte los pozos 3 y 11 donde se colocaron las cepas de referencia o bien los ADN del hongo *Fusarium verticillioides*, se observa el amplificado como se esperaba. En las muestras 6 y 9 ubicadas en los pozos 12 y 15 se puede observar claramente que amplificaron, por lo que éstas dos muestras fueron atacadas por el hongo de esta especie mostrándose las bandas; sin embargo en la muestra 8 ubicada en el pozo 14 se observa una banda muy tenue, casi no se aprecia pero se puede decir

que también está infectada por el hongo pero siendo menor la infección en comparación con las otras dos muestras.

Cabe mencionar, que el amplificado de los pozos 12, 14, 15 y del control positivo ubicado en los pozos 3 y 11, si coincide con el número de pares de bases esperados (370 pb). Por lo que, de las diez muestras de maíz sometidas a la PCR, sólo en tres de ellas se encontró presente el hongo *Fusarium verticillioides*. En comparación con los granos de cebada y trigo, los granos de maíz si se encontraron infectados por este hongo al tener al menos amplificado en tres muestras; al igual que el trabajo realizado por Gallardo R. E, (2006), se demuestra que éste hongo se encuentra con mayor frecuencia en los granos de maíz (Figura 3.11), al ser el hongo que produce la pudrición de mazorca, tallo y raíz.

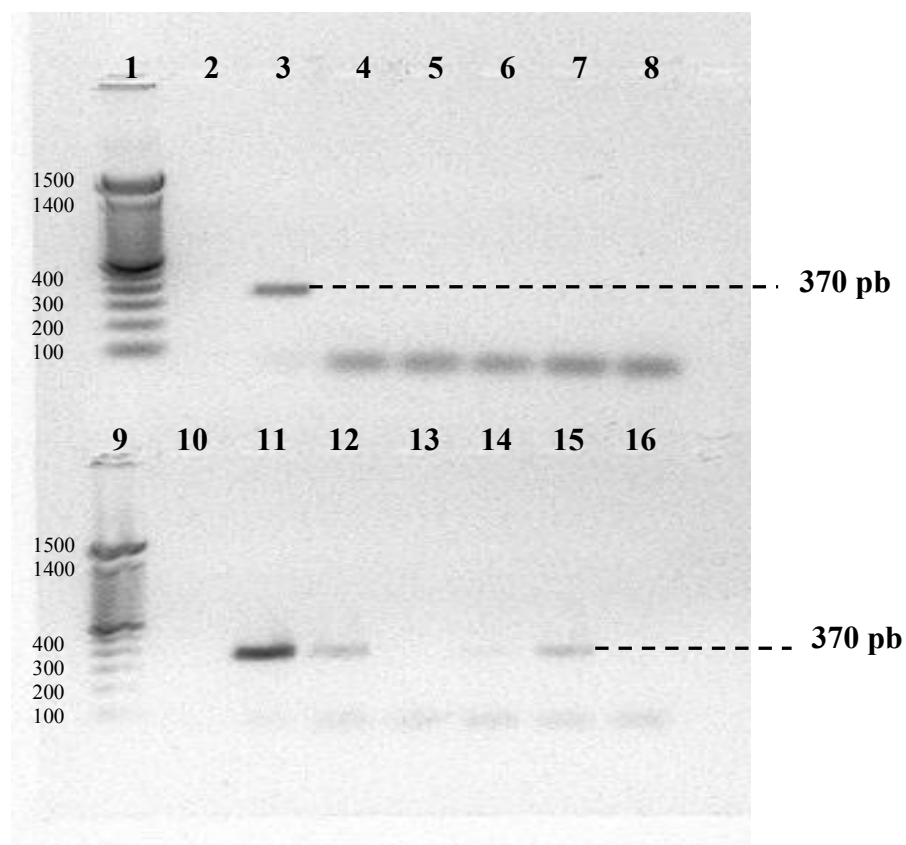


Figura 3.10. PCR para granos de maíz. Gel de agarosa al 1.5%, corrido a 60V. 1 y 9) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2 y 10) Blanco; 3 y 11) *Fusarium verticillioides* (cepa de referencia); 4) Muestra 1; 5) Muestra 2; 6) Muestra 3; 7) Muestra 4; 8) Muestra 5; 12) Muestra 6; 13) Muestra 17; 14) Muestra 8; 15) Muestra 9; 16) Muestra 10.

Cuadro 2. Porcentaje de grano de maíz (*Zea mays*) invadido y número de especies de *Fusarium* identificadas en el estado de Sonora, México durante el ciclo agrícola 2002-2003.

	Río Sonora	Valle Hermosillo	Valle del Mayo	Valle del Yaqui
	Porcentaje de invasión			
<i>Fusarium</i> spp.	63	42	67	37
	Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i>			
<i>F. verticillioides</i>	7	10	36	15
<i>F. oxysporum</i>	5	14	27	4
<i>F. solani</i>	3	6	35	14
<i>F. tricinctum</i>	Nd*	Nd	1	Nd
<i>F. graminearum</i>	Nd	Nd	1	Nd
<i>F. proliferatum</i>	Nd	Nd	1	Nd
<i>F. subglutinans</i>	Nd	Nd	Nd	1

*Nd: No detectado.

Figura 3.11. Especies de *Fusarium* identificadas en granos de maíz. Gallardo R. E, (2006).

CONCLUSIONES

- El apoyo de artículos científicos permitieron conocer los protocolos a seguir y las condiciones establecidas durante la experimentación, así como también los cebadores que se utilizaron.
- El ADN de referencia de *Fusarium verticillioides* obtenido de trabajos anteriores, aceleró el proceso de identificación ya que se evitó la extracción de ADN a la cepa de referencia.
- El método establecido de fenol-cloroformo permitió de forma rápida y eficaz la extracción de ADN de los granos para su posterior uso en la PCR en gran cantidad y concentración de ADN.
- Los cebadores específicos permitieron la fácil y rápida detección de *Fusarium verticillioides* entre varias especies de origen vegetal y animal, así como también entre su mismo género *Fusarium*.
- La PCR con las condiciones previamente establecidas, permitió de forma rápida y precisa la identificación de *Fusarium verticillioides* presente únicamente en los granos de maíz.

RECOMENDACIONES

- Identificar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de otras especies de *Fusarium* utilizando los cebadores específicos para cada especie, en los granos analizados en este trabajo.
- Dados los resultados obtenidos en los granos de maíz, establecer una metodología para la identificación de *Fusarium verticillioides* a productos derivados de granos de maíz.
- Basándose en la metodología empleada en este trabajo, establecer condiciones adecuadas y cebadores específicos para la detección de otros hongos de campo como *Alternaria*, *Cladosporium*, y *Hemilthosporium*, también encontrados en los granos de cebada, trigo y maíz.

REFERENCIAS

1. Álvarez L. M., Vallejos R. H., (2001). Ciencia Hoy. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. 11:62:02.
2. Astiazarán I., Martínez J. A., (1999). Alimentos, composición y propiedades. Mc Graw-Hill, Interamericana. España, 137-138.
3. Balbás P., (2002). De la Biología Molecular a la Biotecnología. Editorial Trillas. México, 195.
4. Bartolo P. P., Peña J. L., Cruz O. A., Calderón A., (1999). Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX. Sociedad Mexicana de Ciencias de Superficies y de Vacío. México, 8:64-68.
5. Bedoya C. A., (2010). Teocintle: el ancestro del maíz. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. España, 201:32-42.
6. Benítez C. C., (2006). El maíz: origen, composición química y morfología. Materiales avanzados. 7:15-20.
7. Bertechini F. C., Lumi A. C., Novais S. C., Tessmann D., Parra B. I., (2012). New PCR Assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* and other species of the *Gibberella fujikuroi* Complex. International Journal of Molecular Sciences. Brazil, 13:115-132.
8. Bolivar A. M., (2013). Reacción en Cadena de la Polimerasa como alternativa diagnóstica para *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium paratuberculosis*. REDVET, Revista Electrónica de Veterinaria. España, 14(3):1-17.
9. Bonilla M. N., Generalidades del cultivo de maíz. Curso Producción de semilla de maíz. http://observatorioedsicta.info/pdf_files/cursoSemillasMaiz_INTACostaRica.pdf (Noviembre, 2014).
10. Callejo G. M., (2002). Industrias de cereales y derivados. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

11. Carmona M., Scandiani M., (2011). Importancia y control de *Fusarium verticillioides* en semillas de maíz, propuesta para su manejo. Laboratorio Agrícola Río Paraná.
12. Chavarri M., Luzón O., Mazzani C., Garrido M. J., Rumbos N., Figueroa R., (2009). Mohos asociados a granos de cebada (*Hordeum vulgare*) distribuida en dos estados de Venezuela. *Fitopatol. Venezuela*, 22:33-34.
13. CIMMYT . (2004). Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México: CIMMYT.
14. De Dios T., Ibarra C., Velasquillo C., (2013). Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2:2: 70-78.
15. De la Torre H. M. A., Sánchez R. D., Galeana S. E., Plasencia P. J., (2014). Fumonisinas-Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. México D.F, 17(1):77-91.
16. Evans L. T., Peacock W. J., (1981). *Wheat Science. Today and Tomorrow*, Cambridge University Press. 304.
17. Gallardo R. E., Ibarra M. G., Sánchez M. R., Cuamea C. G., Molina G. D., Parra V. N., Rosas B. E., Cortez R. M., (2006). Micobiota de Maíz (*Zea Mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología*. México. 24:1: 27-34.
18. García B. K. M., (2014). Identificación por PCR y caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium subglutinans* en granos de maíz (*Zea mays* L.) proveniente de diferentes regiones de la República Mexicana. México, D.F.
19. García R. J. J., Gámez F. R., (2008). Guía para producir semilla de cebada maltera en surcos en el Bajío. México, 8:2.
20. Gherbawy Y., Adler A., Prillinger H., (2001). Genotypic identification of *Fusarium subglutinans*, *F. proliferatum* and *F. verticillioides* strains isolated from maize in Austria, Egyptian. *Journal of Biology*. Egipto, 3:37-46.

21. Gil P. P. A., (2010). Exportemos, Instituto Boliviano del Comercio Exterior. 40:16-17.
22. Gupta M., Gallagher E., (2010). Barley for brewing: characteristics changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9:318-328.
23. Hernández G., (2012). CANIMOLT, Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo. <http://www.canimolt.org/trigo/el-trigo-en-mexico>
24. Leslie J. F., Summerell B. A., (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing.
25. Llorens V., Martín M. P., Hidalgo E., (1997). PCR: una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. *Revista Catalana Micol*. Barcelona, 20:187-198.
26. Martínez M., Palacios N., Ortiz R., (2009). Caracterización nutricional del grano de 50 accesiones de maíz cubano, cultivos tropicales. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*. 30(2): 80-88.
27. Matz S., (1999). *Bakery Technology and Engineering*, S. PanTech International, USA.
28. Morales L. M., (2001). Trigo, trojes, molinos y pan, el dorado de la oligarquía poblana. *Red Internacional de Estudios sobre Sociedad, Naturaleza y Desarrollo*. Argentina, 13.
29. Moreno I., Ramírez A., Plana R., Iglesias L., (2006). El cultivo del trigo, algunos resultados de su producción en Cuba. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*. Cuba. 22(4):55-67.
30. Moreno M., Martínez A., Raybaudi R., (2000). Determinación de deoxynivalenol (DON) en trigo, cebada y maíz y su relación con los niveles de mohos totales *Fusarium* spp., porcentaje de colonización y actividad del agua. *ALAN* 50:1-8.
31. Mulé G., Susca A., Stea G., Moretti A., (2004). A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology*. Netherlands, 110:495-502.

32. Ortas L., (2008). El cultivo del maíz: fisiología y aspectos generales. Comercial de Servicios Agrigan S.A., 7:1-4.
33. Padilla C. A., Diez J., Martínez E., Bárcena J. C., García C., Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Córdoba.
34. Palomares J. C., Cuenca M., (2007). Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular. Revista Iberoamericana de Micología.
35. Peña R. J., Pérez P., Villaseñor E., Gómez M. M., Mendoza M. A., Monter R., (2007). Calidad de la cosecha del trigo en México. CONASIST, México.
36. Perera J., Tormo A., García J. L., (2002). Ingeniería Genética. Editorial Síntesis. España, 223.
37. Rebuffel P. A., Desarrollo de hongos en los granos, I Seminario Postcosecha de Granos en la Zona Sur <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR06360.pdf> (abril, 2014).
38. Salvador R. J., (2001). Maíz. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. México, No. 15.
39. Sambrook J., Russell D., (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, E.U.A.
40. Sandoval M. E., Leyva M. S., Villaseñor M. H., Rodríguez G. M., Mariscal A. L., (2012). Diversidad de hongos en semilla de trigo de temporal. Revista Mexicana de Fitopatología. México. 30:2: 145-149.
41. Schulthess K. F., Cardwell K. F., Gounou S., (2002). The effect of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lipidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. *Phytopathology*. 92:2: 121-128.
42. Secretaría de Economía (SE), (2012). Análisis de cadena de valor de maíz-tortilla: situación actual y factores de competencia local.
43. Serratos H. J., (2009). El origen y la diversidad del maíz en el continente americano. GREENPEACE. México.
44. Shewry P. R., Halford N. G., (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 53:370.

45. Simsek S., Burgess K., Whitney K., Gu Y., Qian S., (2012). Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. Food Control. Elsevier. USA, 26:287-292.
46. Somma M., Querci M., Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. JRC, European Commission.
47. FAO Disponible en línea www.fao.org (Abril, 2014).
48. SAGARPA Disponible en línea www.sagarpa.gob.mx (Marzo, 2014).
49. SE Disponible en línea www.economia.gob.mx (Marzo, 2014).
50. SIAP Disponible en línea www.siap.gob.mx (Abril, 2014).
51. En línea www.cultek.com (Marzo, 2014).
52. En línea www.fenalce.org (Abril, 2014).
53. En línea www.rangaputhali.com (Abril, 2014).
54. En línea www.cervezadeargentina.com (Abril, 2014).
55. En línea www.ls9.it (Abril, 2014).
56. En línea www.infoagro.com (Agosto, 2014).
57. En línea www.imagui.com (Noviembre, 2014).
58. En línea <http://www.mejoravegetal.criba.edu.ar/semilla/Germina> (Noviembre, 2014).

ANEXOS

Para la comprobación de los cebadores seleccionados de artículos científicos, se ingresó a la página www.mitomap.org



Seleccionamos en la opción “complete mitochondrial genome sequences” en la parte inferior de la página principal.



Seleccionamos el link “NC_012920” que es el número Gen Bank

MITOWEB

MITOMAP MITOMASTER MITOWIKI

Search

MITOMAP

- Log In
- Register
- Reset Password

MITOMAP

MITOMASTER

MITOWIKI

Tools

- Help
- Search
- Feedback
- Index

Complete Mitochondrial DNA Sequences

The revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) is GenBank number [NC_012920](#).

Please use this new number when citing the rCRS in publications. The rCRS is a reference sequence, not a "consensus" sequence. It is a single reference individual from haplogroup I12a2 and has been used as a standard for reporting variants for over 30 years. See Bandelt's new 2013 rCRS review, link below.

View MITOMAP's fully annotated rCRS sequence [here](#).

The Cambridge Reference Sequence, revised & original:

Version	GenBank #	Fasta format	Article links
revised Cambridge	NC_012920	rCRS	NEW Bandelt's 2010

Se escribe el nombre de la especie de interés "*Fusarium verticillioides gaoB*"

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251831106

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide [Limits](#) [Advanced](#)

Display Settings: GenBank Send: [Change](#) [Custom](#)

Homo sapiens mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_012920.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NC_012920 16565 bp DNA circular F01-2014
 DEFINITION Homo sapiens mitochondrion, complete genome.
 ACCESSION NC_012920 AC 000021
 VERSION NC_012920.1 GI:251831106
 DBLINK SLPProject: [FRJNA30933](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Mitochondrion: Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontales; Primates; Haplorhina

Se selecciona una de las opciones

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=fusarium+verticillioides+gaoB

Esta página está escrita en [inglés](#) ¿Quiere... Traducir No No traducir nunca del inglés Configuración

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide [Search](#) [Save search](#) [Limits](#) [Advanced](#) [Help](#)

Display Settings: Summary, Sorted by Default order Send to: [Filter your results:](#)

Found 87136 nucleotide sequences. Nucleotide (2) EST (67134)

Results: 2

- [Gibberella moniliformis strain CML 767 galactose oxidase precursor \(gaoB\) gene, complete cds](#)
 1. 2,040 bp linear DNA
 Accession: HM069186.1 GI: 295414057
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)
- [TPA_inf Gibberella moniliformis 7600 galactose oxidase precursor \(gaoB\) gene, complete cds](#)
 2. 2,040 bp linear DNA
 Accession: BK007076.1 GI: 316658340
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

Filter your results:

- All (2)
- Bacteria (0)
- [INSDC \(GenBank\) \(1\)](#)
- mRNA (0)
- RefSeq (0)

[Manage Filters](#)

Top Organisms [Tree]

- Fusarium verticillioides (2)
- Fusarium verticillioides 7600 (1)

[Analyze these sequences](#)

Una vez seleccionado la especie de interés, aparecerá la secuencia completa, por lo que seleccionaremos la opción "find in this sequence" para encontrar el cebador reportado.

moniliformis strain CML 767 galactose oxidase precursor complete cds

2040 bp DNA linear PLN 21-DEC-2010 moniliformis strain CML 767 galactose oxidase precursor complete cds.

GI:295414057

Find sub-sequences or patterns in the sequence and highlights the matching regions. The tool works with standard single letter nucleotide or protein codes including ambiguities and can match Prosite patterns in protein sequences. More...

Articulos: [Fungi; Dikarya; Ascomycota; Hypocreomycetidae; Fusarium fujikuroi species complex.](#)

1 to 2040

javascript:Portal.\$send('SeqSearchClicked')

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

- Run BLAST
- Pick Primers
- Highlight Sequence Features
- Find in this Sequence

Related information

- Related Sequences
- Full text in PMC
- Protein

Aparecerá un recuadro en la parte inferior de la ventana, en donde se escribirá el cebador frontal para encontrarlo en la secuencia.

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM069186.1

```

1 atgaagtcctt tctactcctt ggccttgtgc cttgggtgect tcttcaatgc agccaactgce
61 atccaccacag aggagcaggg acaacagcct ggaaggtctg ctgctgctcc ccccggttggc
121 tcaaacccca ttgaccgcaa gggatggact gtaagtgctt ccagccaggg tcaaacctc
181 cctgtgggta gagccatcga ttgtgacaag aacacctctt ggcagactcc ctatggcaca
241 accaacacgc ctctctctca caccatcacc attgacatga agcagactca gtatgtcagt
301 ggtctccaga ttacaccacg ccaagacggc aacaccogta actggatctg tcgacatgaa
361 gctcaccctt gctctgacgg caccacctgg ggaagccctg ctgctcttgg aacatctgg
421 ggagacaagt accctggat cacaacctt gaggctcagc ctgctgctga tcttgcttt
481 gttgcccctt ctaagtgtaa ctccgactat cctggattg ctattgcga ctttcaagtc
541 tacaacgctc tcaagtacaa tcccctgtt aagggtcttg gaaaatgggg tcttacctt
601 gacttccccg tcattccccg cgtggtgccc gttgagcctg tctcaggaaa ggtcgtcatc
661 tggctcgtt accgatatga tgccttccaa ggcaccactc ctggggtggt ctctactctc
721 acttctatct gggaccocaa gcccacgctc atctccaac gcaatgttcc caaacacat
781 caccacatgt tctgcccctg tatttccatg gacggtgagd gacagatgt cgttaactgg
841 ggtaacgatg caagaagac taccattctc atgcctgatg gcaactgggt tccctggcct
901 gacatgcaga ttgctcgtgg ttaccaatca tctgctactt gctctgacgg ccgtgttttc
961 accatcggtg gctcatggag cggctcccgt ggcggcaaga acggtgaaat ctacagcccc
1021 aaggccaaga ctggactc cctcccag tgcctctgtg gacctatgct caacaaggac
1081 aaggagggtg tctacaagtc tgacaaccac gcttggctct ttggctggaa gaagaacagt
1141 gttttccagg ctggaccag cacagccatg aactggtact acaccaccaa gggcactcag
1201 ggtgacacca aggtgctggt tactcgacga aagaacggca gaattgatcc tgattccatg
1261 aacggcaatg ttgccatgct cgatgccctt aagggcaaga ttctcaacct tggcgggtgct
1321 accgctaac aacagctcc tgcactgct aagctcatg ttctcaaat tgacagccc
1381 ggtgcatcgg cccagactgc tctcgttggg aacaagggtg ctggatctca ggcctcgtc
1441 tccgtacct ctgctactc cctgacgga aacgtctca tcactggtg ccaactctac
1501 tccaaccctg taccgcacac caacgctcag ctgagcccg agatgttcat ttccctctcc
1561 aacacatctg ctaagcaaca atccaaccg atccccgca cgtatcacag tatgtctctg
1621 ctgctgccc agtctactgt ctccaaccgt ggcggtggct cctcgggtag ctgcaagagc

```

cactgggtgaacgatgcg Find 1 of 1 HM069186 : 834-852 Help