



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Identificación a nivel molecular de *Penicillium expansum* en manzana
(*Malus domestica* L.) por medio de la PCR**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA

CRUZ FLORES EFRAÍN VALERIANO

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

COASESORA: Dra. Martha Yolanda Quezada Viay

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO 2016



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.

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
RESUMEN.....	IV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES.....	3
1.1 GENERALIDADES DE LA MANZANA	3
1.1.1 Origen de la manzana (<i>Malus domestica</i> L.).....	3
1.1.2 Composición química de la manzana	3
1.1.3 Situación económica del cultivo de manzana en México.....	4
1.1.4 Morfología del fruto de manzana	9
1.1.5 Variedades de manzana más cultivadas	9
1.2 HONGOS QUE OCASIONAN DAÑOS EN MANZANA	11
1.2.1 Principales hongos que atacan a la manzana en poscosecha.....	11
1.2.2 <i>Penicillium</i>	12
1.2.3 Morfología de <i>Penicillium</i>	13
1.2.3.1 <i>Penicillium expansum</i>	13
1.2.4 Micotoxinas.....	15
1.2.5 Patulina (PAT)	15
1.2.6 Importancia económica de <i>Penicillium</i>	17
1.2.7 Métodos de identificación de hongos.....	17
1.3 EXTRACCIÓN DE ADN	18
1.3.1 Fundamento.....	18
1.3.2 Métodos de extracción de ADN	19
1.3.3 Calidad y cantidad de ADN extraído	20
1.4 GENERALIDADES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	21
1.4.1 Fundamento.....	21
1.4.2 Etapas	22

1.4.3 Cebadores específicos	24
1.4.4 Electroforesis.....	25
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
2.1 Descripción de cuadro metodológico	27
2.1.1 Cuadro Metodológico.....	28
2.2 Material	29
2.2.1 Material biológico	29
2.2.2 Reactivos	33
2.2.3 Equipos.....	34
2.3 Métodos.....	35
2.3.1 Elaboración de cultivos monospóricos.....	35
2.3.2 Extracción de ADN	36
2.3.3 Cuantificación de ADN.....	37
2.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	38
2.3.5 Electroforesis.....	40
CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 Obtención de cultivos monospóricos de especies de <i>Penicillium</i> aisladas de manzana.....	41
3.2 Extracción de ADN de las colonias monospóricas del género <i>Penicillium</i> , de manzanas aparentemente sanas y de manzanas inoculadas con <i>P. expansum</i> por medio del Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food.....	43
3.3 Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	46
CONCLUSIONES.....	54
RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Volumen de producción, rendimiento e importación de manzana en México.....	5
Figura 1.2 Volumen de producción y precios mensuales.....	6
Figura 1.3 Estados productores de manzana, 2009-2012	7
Figura 1.4 Producción de manzana en México del año 2000-2013	7
Figura 1.5 Volumen y valor de producción de manzanas en México en el 2012.....	8
Figura 1.6 Sección longitudinal de la flor (a) y del fruto (b) del manzano	9
Figura 1.7 Variedades de manzana.....	11
Figura 1.8 Nombres de las estructuras del conidióforo de <i>Penicillium</i> spp.	13
Figura 1.9 Manzana contaminada por <i>Penicillium expansum</i>	15
Figura 1.10 Estructura química de la Patulina.....	16
Figura 1.11 Amplificación exponencial del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	22
Figura 1.12 Etapa de desnaturalización en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
Figura 1.13 Etapa de alineamiento en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
Figura 1.14 Etapa de extensión en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	24
Figura 1.15 Cuadro metodológico.....	28
Figura 1.16 Secuencias de <i>primers</i> localizados en el GenBank, en el gen <i>pepg1</i> que codifica para la poligalacturonasa de <i>Penicillium expansum</i>	30
Figura 1.17 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de <i>P. expansum</i>	39

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.1 <i>Penicillium</i> spp.	12
Fotografía 1.2 Equipo para electroforesis en gel de agarosa.....	26
Fotografía 1.3 Cultivos monospóricos de las cepas de <i>Penicillium</i> aisladas de manzanas.	41
Fotografía 1.4 Fotografías en microscopio (40x) de cultivos monospóricos de <i>Penicillium expansum</i> aislados de manzanas.....	42
Fotografía 1.5 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con <i>primers</i> para amplificar el gen <i>pepg1</i> que codifica para la <i>poligalacturonasa</i> de <i>P. expansum</i> en la determinación del control positivo. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo de <i>P. expansum</i>	46
Fotografía 1.6 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con <i>primers</i> para amplificar el gen <i>pepg1</i> que codifica para la <i>poligalacturonasa</i> de <i>P. expansum</i> , para comprobar la especificidad de los <i>primers</i> . MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo (<i>P. expansum</i>), P. im: <i>P. implicatum</i> , P. oxa: <i>P. oxalicum</i> , Asp: <i>Aspergillus</i> , Pap: Papaya, U.v: Uva vinícola, Mza: Manzana.	47
Fotografía 1.7 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con <i>primers</i> para amplificar el gen <i>pepg1</i> que codifica para la <i>poligalacturonasa</i> de <i>P. expansum</i> , de las cepas C2 a la C6. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C2: Cepa 2, C3: Cepa 3, C4: Cepa 4, C5: Cepa 5, C6: Cepa 6.	49
Fotografía 1.8 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con <i>primers</i> para amplificar el gen <i>pepg1</i> que codifica para la <i>poligalacturonasa</i> de <i>P. expansum</i> , de las cepas C7 a la C10. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C7: Cepa 7, C8: Cepa 8, C9: Cepa 9, C10: Cepa 10.....	49
Fotografía 1.9 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con <i>primers</i> para amplificar el gen <i>pepg1</i> que codifica para la <i>poligalacturonasa</i> de <i>P.</i>	

expansum, de las cepas C11 a la C14. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C11: Cepa 11, C12: Cepa 12, C13: Cepa 13, C14: Cepa 14. 50

Fotografía 1.10 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P.*

expansum, de las cepas C15 a la C18. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C15: Cepa 15, C16: Cepa 16, C17: Cepa 17, C18: Cepa 18. 50

Fotografía 1.11 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P.*

expansum, en manzanas aparentemente sanas. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, M1: Muestra 1, M2: Muestra 2, M3: Muestra 3, M4: Muestra 4, M5: Muestra 5.. 52

Fotografía 1.12 Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P.*

expansum, en manzanas inoculadas con *P. expansum*. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, C+: Control positivo (*P. expansum*), M1: Muestra 1, M1.1: Muestra 1.1, M2: Muestra 2, M2.1: Muestra 2.1, M3: Muestra 3, M3.1: Muestra 3.1. 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de diferentes variedades de manzana por 100 gramos de porción comestible.....	4
Tabla 2. Variedades de manzana más importantes y características	10
Tabla 3. <i>Primers</i> específicos para <i>Penicillium expansum</i>	29
Tabla 4. Cepas de <i>Penicillium</i> aisladas de manzana.....	31
Tabla 5. Componentes para llevar a cabo una reacción de 25 μ L.....	38
Tabla 6. Concentración de ADN y relación 260/280 de las cepas monospóricas del género <i>Penicillium</i>	43
Tabla 7. Concentración de ADN y relación 260/280 de las muestras de manzanas aparentemente sanas	44
Tabla 8. Concentración de ADN y relación 260/280 de las muestras de manzanas inoculadas con <i>Penicillium expansum</i>	45

RESUMEN

El consumo de la manzana en nuestro país es principalmente en fresco. Se considera que del total de la producción, abarca entre el 70-75%, mientras que el restante 30-25% es para uso industrial. El consumo nacional por habitante es de 7.7 kg/año (2006), situando a la manzana en la cuarta fruta más consumida del país. Con respecto al uso industrial, encontramos un número importante de productos que se derivan de la manzana como jugos, refrescos y alimentos azucarados.

Varias especies de hongos del género *Penicillium* han sido reportadas como causantes de la podredumbre azul en manzana durante la postcosecha, más del 80% son atribuidas al hongo *Penicillium expansum*, cuyas manifestaciones externas típicas son lesiones ligeramente deprimidas cuyo tejido podrido tiene una textura aguanosa y de coloración clara. Además; cuando la fruta se deteriora, favorece a la producción de la micotoxina llamada patulina, la cual es capaz de ocasionar edemas cerebrales y pulmonares con procesos hemorrágicos y daños capilares en el hígado.

El objetivo de este trabajo fue identificar las especies del género *Penicillium* mediante la técnica de Biología Molecular llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa con ayuda de *primers* para *P. expansum*, para comprobar la presencia de los hongos causantes de pudrición en poscosecha de manzana (*Malus domestica* L.).

En la prueba de especificidad se obtuvo que los *primers* utilizados para la identificación molecular de *P. expansum* son específicos. Se obtuvieron amplificadores similares para todas las cepas analizadas, por lo tanto, todas corresponden a la especie *P. expansum*. Adicionalmente, el hongo se identificó directamente sobre las manzanas.

Por lo cual, la oportuna detección e identificación de *Penicillium expansum* es imprescindible para su posterior evaluación en cuanto a su potencial patogénico en poscosecha. Para esto existen técnicas moleculares utilizadas actualmente en las que se extraen ácidos nucleicos y después se amplifican mediante la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR), estas técnicas suelen tener ventajas sobre las técnicas morfológicas ya que ofrecen mayor rapidez y alta especificidad (Eguiarte *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista nutritivo, la manzana es una de las frutas más completas y enriquecedoras en la dieta y, su consumo habitual, en fresco, reporta grandes beneficios para la salud. Hoy se sabe con certeza de la existencia y la función de algunos de los componentes de esta fruta que le confieren su carácter antioxidante y la doble particularidad de actuar como alimento astringente o laxante según cómo sea consumida (Consumer, 2008).

Las principales variedades de manzana (*Malus domestica L.*) establecidas en México, maduran cuando el mercado nacional se encuentra saturado lo que provoca que se comercialicen a precios muy bajos. Una alternativa para el mejor aprovechamiento del producto es su almacenamiento en frío, pero puede sufrir daños causados por el hongo *Penicillium expansum*. Este patógeno infecta al fruto a través de heridas causadas durante la cosecha y el empaque (Soto y Martínez, 2009).

La presencia del moho azul en el fruto, se atribuye principalmente a la especie *Penicillium expansum*, debido a las condiciones no apropiadas de almacenamiento. Observándose áreas con pudriciones blandas, acuosas y de color marrón claro, provocando como consecuencia grandes pérdidas en la producción. Por otra parte, esta especie es capaz de producir patulina, resultado de su metabolismo secundario, poniendo en entredicho la inocuidad de los frutos y representando un riesgo para la salud de la población. El hongo *Penicillium expansum* contamina tanto en el exterior como en el interior del fruto, siendo en ocasiones difícil identificar que una manzana está contaminada, por lo que los derivados de la manzana, como son los jugos y papillas, también pueden contener patulina. La patulina se reconoce principalmente por inducir trastornos gastrointestinales con ulceración, distensión y sangrado, y a dosis más altas, alteraciones en la función renal (Puel *et al.*, 2010; Anguiano *et al.*, 2012).

Para facilitar la importación y exportación de manzana alrededor del mundo, y evitar un riesgo potencial a la salud, se han establecido a nivel mundial, regulaciones para la micotoxina patulina en manzana y sus derivados comerciales (Anguiano *et al.*, 2012).

La identificación molecular a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método rápido y eficaz, de gran ayuda para los productores de manzana, debido a que se puede identificar el hongo directamente en el fruto y así disminuir el tiempo para lograr su detección y evitar grandes pérdidas económicas ya que se sabe que México es uno de los países con mayor producción de manzana a nivel mundial. Así mismo se garantiza la inocuidad del fruto y evita enfermedades como la micotoxicosis.

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1.1 GENERALIDADES DE LA MANZANA

1.1.1 Origen de la manzana (*Malus domestica* L.).

El cultivo que dio origen a todas las variedades de manzana que se desarrollan por todo el mundo con una distribución en latitudes mayor que cualquier otra fruta surgió en la zona oriental de Europa en Kazajistán. Perteneció a la familia de las *Rosaceas*, de la subfamilia *Pomoideae*, y al género *Malus*. Dicho género comprende de 25 a 30 especies procedentes de Europa, América del Norte y Asia. No obstante, las variedades cultivadas para la comercialización pertenecen a la especie *Malus x domestica* Borkh (Itoiz, 2000; Zoppolo *et al.*, 2008).

La manzana al pertenecer a la subfamilia de las *Pomoideae*, es un pomo, un fruto carnoso complejo, resultado del desarrollo del ovario de la flor y de los tejidos soldados que lo envuelven. Tiene forma más o menos redondeada, y su zona central está dividida en cinco partes, una por carpelo. En esta zona central, se encuentran las semillas, casi siempre de color marrón oscuro, protegidas por paredes de consistencia coriácea. El color de la epidermis del fruto es variable (verde, amarilla, roja, atigrada, etc.) siendo casi siempre brillante y lisa (Domínguez, 2008).

1.1.2 Composición química de la manzana

Es la fruta por excelencia, ya que es bien tolerada por la mayoría de personas y combina sin problemas con cualquier otro alimento. Hoy se sabe con certeza de la existencia y la función de algunos de los componentes de esta fruta que le confieren su carácter antioxidante y la doble particularidad de actuar como alimento astringente o laxante según cómo sea consumida (Consumer, 2008).

Las propiedades antioxidantes se deben a elementos fitoquímicos como los polifenoles (quercitina, flavonoides) que contiene, sobretodo la piel. Está recomendada en dietas de prevención de riesgo cardiovascular, degenerativas y cáncer (Consumer, 2008).

Desde el punto de vista nutritivo, la manzana es una de las frutas más completas y enriquecedoras en la dieta y, su consumo habitual, en fresco, reporta grandes beneficios para la salud. El 84% de su composición es agua, el 14% está constituido por glúcidos, siendo la mayor parte fructosa (azúcar de la fruta) y en menor proporción, glucosa y sacarosa, de rápida asimilación en el organismo. Es fuente discreta de vitamina E o tocoferol, que posee acción antioxidante e interviene en la estabilidad de las células sanguíneas, y aporta una escasa cantidad de vitaminas A y C. Es rica en fibra y entre su contenido mineral sobresale el potasio, necesario para la transmisión, generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, e interviene en el equilibrio de agua fuera y dentro de la célula (Consumer, 2008) A continuación en la Tabla 1 se muestra la composición de dos variedades de manzana por cada 100 gramos de porción comestible.

Tabla 1. Composición de diferentes variedades de manzana por 100 gramos de porción comestible.

Composición por 100 gramos de porción comestible	Golden	Roja
Calorías	40.6	46
Hidratos de carbono (g)	10.5	11.7
Fibra (g)	2.3	1.7
Potasio (mg)	100	99
Magnesio (mg)	5.6	5
Provitamina A (µg)	4	4
Vitamina C (mg)	12.4	3
Vitamina E (mg)	0.4	0.5

(Consumer, 2008)

1.1.3 Situación económica del cultivo de manzana en México

La producción de manzana en México alcanza cerca de 3 mil mdp anuales y la superficie destinada a este cultivo es de 62 mil hectáreas, principalmente en el norte del país. Hasta 2011, el volumen de producción fue de cerca de 600 mil toneladas, sin embargo, en 2012 se observó una caída de 40% respecto al año anterior, llegando apenas a las 375 mil toneladas,

debido a la sequía que predominó en la zona norte y que se reflejó en una caída del rendimiento desde 10 ton/ha en los últimos diez años a 6 ton/ha (Fig. 1.5). En 2013, las mejores condiciones climáticas incentivaron una producción récord, que de acuerdo con estimaciones de SAGARPA, fue de 867 mil toneladas y un rendimiento de 14.7 ton/ha (Figura 1.1) (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

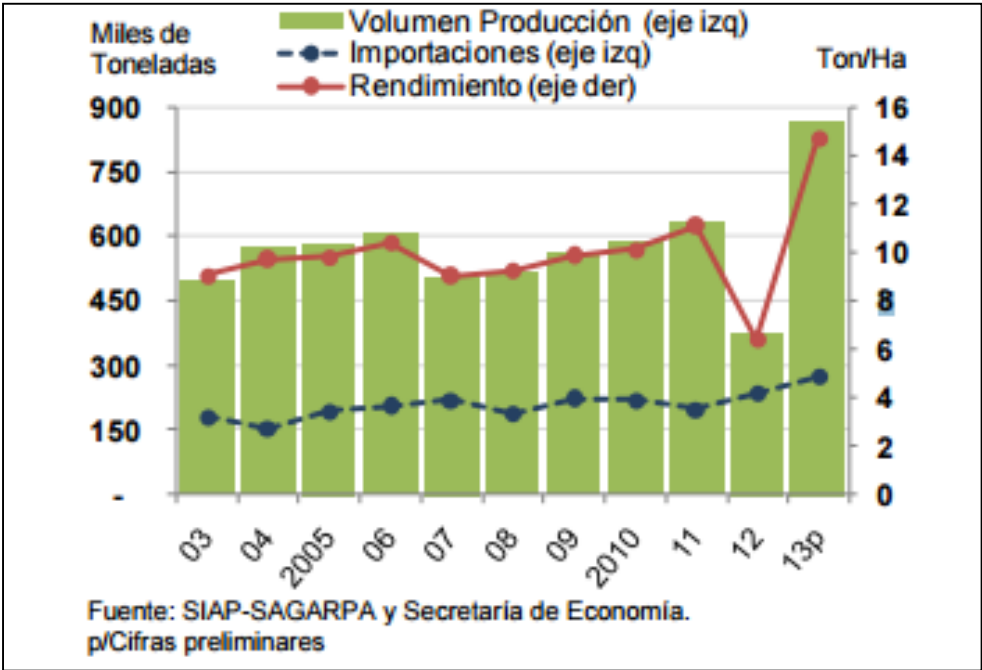


Figura 1.1 Volumen de producción, rendimiento e importación de manzana en México (FND, 2014).

En 2012, las importaciones se incrementaron un 19% respecto a 2011, pasando de 198 a 236 mil toneladas, como efecto del desabasto generado por la sequía, lo que se tradujo en un incremento en precios (Fig. 1.4) (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

Para 2013, dada la producción récord, se supondría un mejoramiento del abasto nacional, sin embargo, las importaciones no disminuyeron sino que se incrementaron un 17% respecto a 2012, alcanzándose 275 mil toneladas, lo cual ocasionó que en 2014 el mercado se encontrara saturado y los precios descendieran de forma importante. Los productores se vieron imposibilitados para colocar el volumen adicional de producción en vista de la

mayor importación y de la baja capacidad para refrigerar la fruta y evitar inundar el mercado (Fig. 1.2) (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

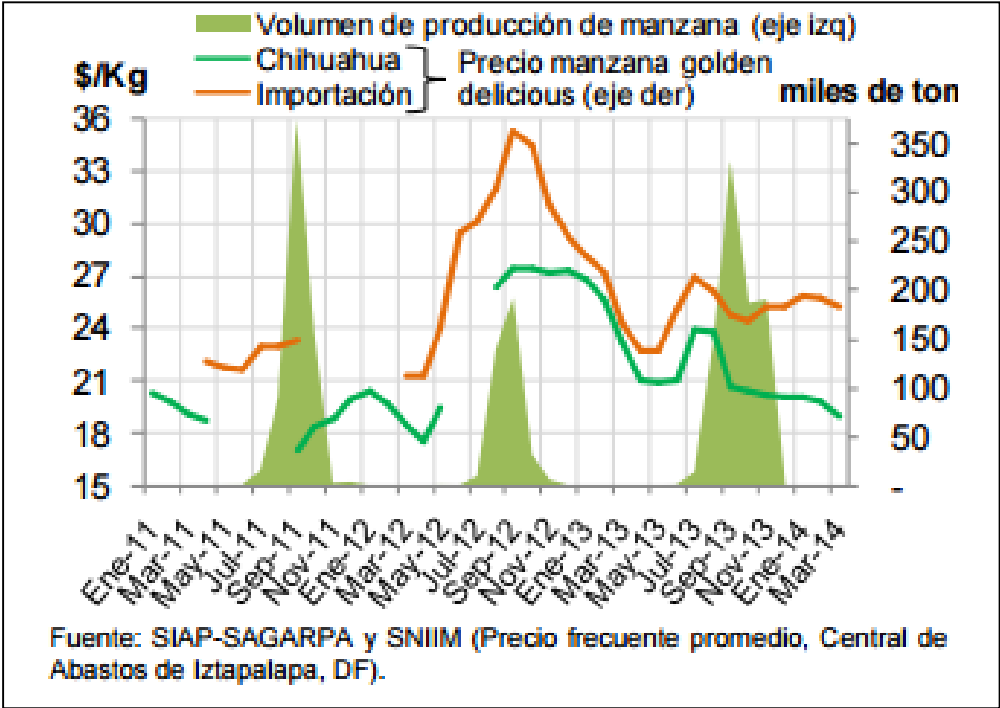


Figura 1.2 Volumen de producción y precios mensuales (FND, 2014).

Chihuahua es el mayor productor de manzana del país, entre los años 2009 y 2012 participó en promedio con el 67.4% del volumen y el 66.5% del valor generado. Durango, Coahuila y Puebla son también entidades importantes en el cultivo de esta fruta y en conjunto generaron el 25.4% del volumen y el 26.5% del valor (Fig. 1.3). La cosecha de manzana se realiza entre mayo y diciembre, sin embargo, el 96% del volumen producido se concentra en tres meses: agosto, septiembre y octubre (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

El consumo aparente en México es de cerca de 800 mil toneladas anuales y las importaciones en los últimos 10 años han sido en promedio de 210 mil toneladas, entre el 21% y 30% del consumo (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, 2014).

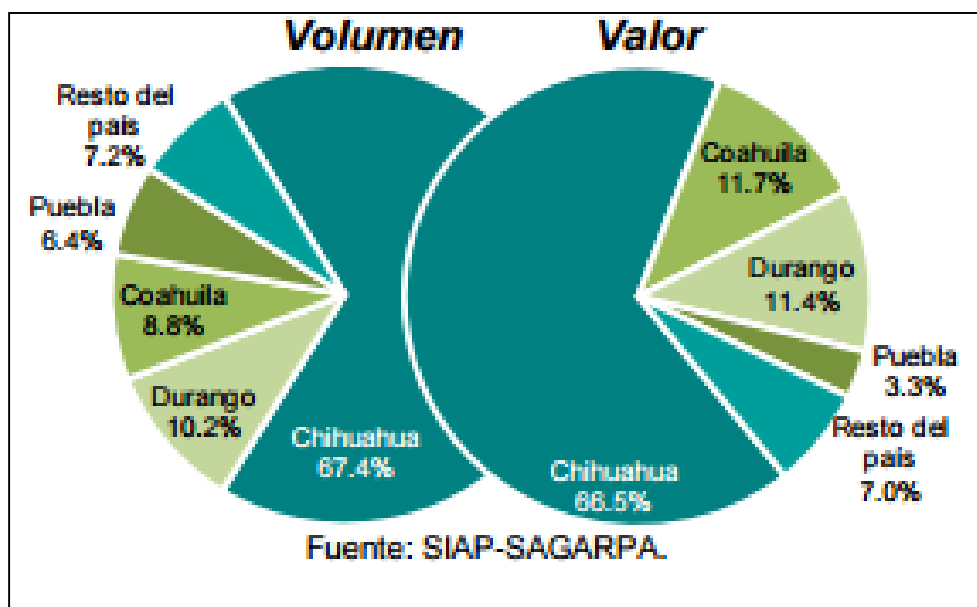


Figura 1.3 Estados productores de manzana, 2009-12 (FND, 2014).

Año	Superficie (miles ha)		Volumen de Producción (miles ton)	Rendimiento (ton/ha)	Precio Medio Rural (\$/Ton)	Valor de producción (mdp)
	Sembrada	Cosechada				
2000	64.4	54.7	338.0	6.2	3,520.0	1,189.7
2001	62.4	61.0	442.7	7.3	2,809.8	1,243.8
2002	61.5	60.9	479.6	7.9	3,087.0	1,480.6
2003	63.0	54.6	495.2	9.1	3,336.4	1,652.2
2004	62.7	59.1	572.9	9.7	3,553.1	2,035.6
2005	62.6	59.5	584.0	9.8	3,589.1	2,096.0
2006	59.8	57.8	601.9	10.4	4,721.8	2,842.1
2007	60.0	56.1	505.1	9.0	5,617.4	2,837.2
2008	61.0	55.3	512.0	9.3	5,321.2	2,724.4
2009	60.2	57.0	561.5	9.9	4,155.4	2,333.2
2010	61.2	57.7	584.7	10.1	5,564.1	3,253.1
2011	61.3	56.8	630.5	11.1	4,952.5	3,122.7
2012	61.6	58.5	375.0	6.4	8,022.7	3,008.9
2013p	62.6	58.8	866.6	14.7	N/D	N/D

Fuente: SIAP-SAGARPA. /p Cifras preliminares

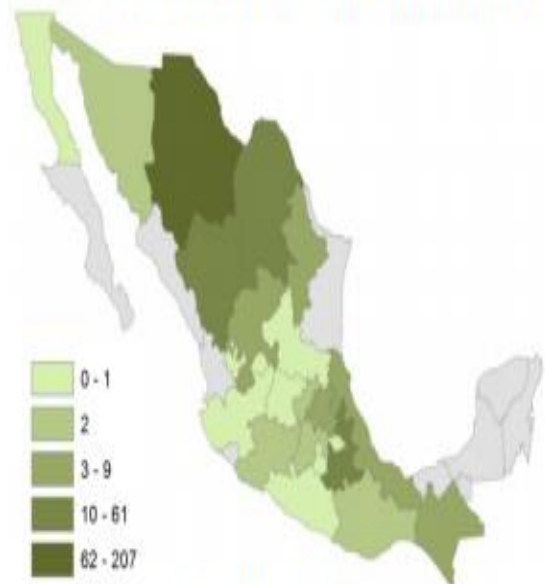
Figura 1.4 Producción de manzana en México del año 2000 al 2013 (FND, 2014).

Producción Nacional de Manzana por Entidad en 2012

Estados	Volumen		Valor	
	Miles de Toneladas	Participación	mdp	Participación
Chihuahua	207.1	55.2%	1,913.1	63.6%
Durango	61.1	16.3%	376.8	12.5%
Coahuila	36.8	9.8%	387.2	12.9%
Puebla	34.1	9.1%	112.2	3.7%
Resto del país	35.9	9.6%	219.5	7.3%
Total Nacional	375.0	100.0%	3,008.9	100.0%

Fuente: SIAP-SAGARPA.

Volumen de Producción en 2012 (miles de ton)



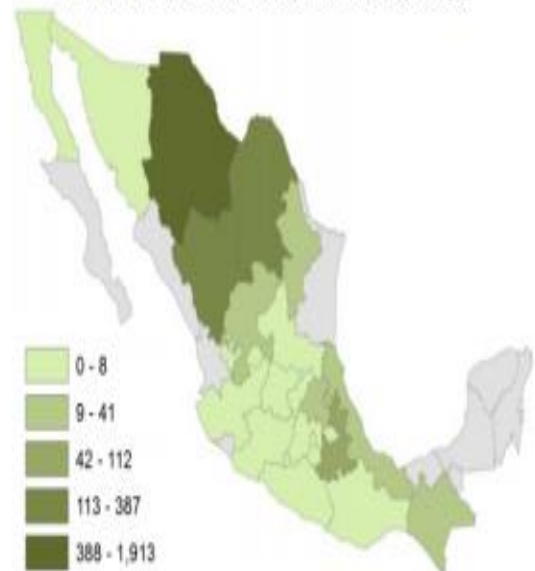
Fuente: SIAP - SAGARPA.

Precio al Mayoreo de la Manzana en México (\$/kg)

	Manzana Golden Delicious		Manzana Red Delicious	
	Chihuahua	Importación	Chihuahua	Importación
2011	19.0	22.3	18.4	21.6
2012	22.9	28.8	22.8	27.2
1T 2013	25.3	26.7	25.3	25.6
2T 2013	21.0	23.4	24.6	21.2
3T 2013	22.7	26.0	17.8	21.8
4T 2013	20.2	25.0	18.5	22.7
2013	22.2	25.2	22.0	22.8
1T 2014	19.6	25.6	17.2	23.6

Fuente: SNIIM (Precio frecuente promedio, Central de Abastos de Iztapalapa, DF).

Valor de Producción en 2012 (mdp)



Fuente: SIAP - SAGARPA.

Figura 1.5 Volumen y valor de producción de manzanas en México en el 2012 (FND, 2014).

1.1.4 Morfología del fruto de manzana

El pedúnculo del fruto del manzano es de longitud variable, adherente y a veces está inserto en una depresión. El cáliz es persistente y forma el ojo, colocado igualmente en una depresión más o menos regular y profunda. En la Figura 1.6 se observan las partes principales de la flor y del fruto del manzano.

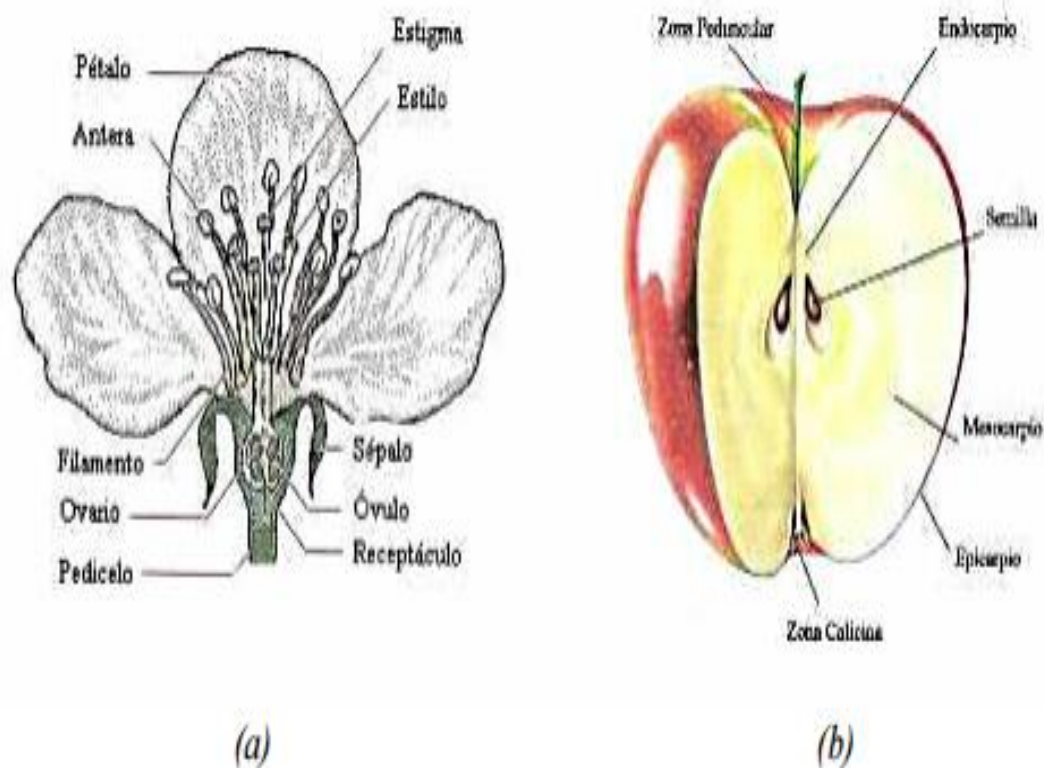


Figura 1.6 Sección longitudinal de la flor (a) y del fruto (b) del manzano (Domínguez, 2008).

1.1.5 Variedades de manzana más cultivadas

La manzana es una de las frutas más populares del mundo, con incontables apariciones en la cultura. Pero no solo hay manzanas amarillas, verdes y rojas; existe una gran cantidad de variedades de manzana, en la Tabla 2 y Figura 1.7 se muestran algunas de ellas (Cocina y vino, 2012).

Tabla 2. Variedades de manzana más importantes y características.

<p>*Red Delicious: Emblemática de Estados Unidos, roja oscuro, alargada y grande. Es dulce y crocante y su piel es gruesa y ligeramente amarga. Es ideal para comer al natural, sin embargo, no se recomienda horneada.</p>
<p>*Golden Delicious: Son distintas a las Red Delicious, aunque las nombró la misma compañía, Stark Brothers. Su piel es delgada, son más dulces, firmes y jugosas; además, son más redondeadas. Aunque también son buenas crudas, resisten mejor el horno y no se desmoronan.</p>
<p>Granny Smith: Fueron las primeras manzanas verdes americanas. Su sabor es un agradable balance entre dulzor y acidez y son notablemente duraderas (algunas siguen en buen estado hasta por seis meses después de cosechadas). Es ideal para hacer salsas y compotas.</p>
<p>Winesap: Poseen una agradable acidez y notas especiadas y avinadas. Tienen personalidad y son más pequeñas que otras variedades, pero su color es más intenso y su forma es muy atractiva. No son muy fáciles de conseguir, y suelen usarse para producir sidra.</p>
<p>*Gala: Son de hermosas proporciones, con piel delgada y amarillo dorado que muestra un delicado rubor rojizo. Son un cruce entre la Golden Delicious y la Kidd's Orange Red neozelandesa. De carne amarillenta y dulce, es buena como colación, pero su delicado sabor se desvanece con el horno.</p>
<p>McIntosh: Su historia se remonta al granjero John McIntosh, que las desarrolló en Ontario, Canadá, en 1870. Es la más vendida en estados Unidos. Es roja y redondeada, con algunas vetas verdosas y carne blanca, aromática y muy jugosa. Son buenas en pie, horneadas y naturales.</p>
<p>*Rome: Originarias de Rome, Ohio. Son redondas y ligeramente achatadas, de carne crocante y sabor delicadamente ácido. Su piel es muy gruesa por lo que no son ideales crudas, pero son óptimas para elaborar sidra o para hornear.</p>
<p>Gravenstein: Datan de 1700, en Estados Unidos. Su piel es fina y son muy jugosas. Su sabor es algo ácido y evoca algunos vinos blancos. Produce sidras interesantes y es excelente para hornear, aunque es poco frecuente hoy en día.</p>

(Cocina y vino, 2012)

*Variedades de manzana producidas en México (Pulso diario de San Luis, 2015).



Figura 1. 7 Variedades de manzana (Cocina y vino, 2012).

1.2 HONGOS QUE OCASIONAN DAÑOS EN MANZANA

1.2.1 Principales hongos que atacan a la manzana en poscosecha.

Cuando las manzanas son llevadas a los mercados y no reciben un almacenamiento correcto, pueden sufrir cambios en su estado físico, presentando magulladuras las cuales son propicias para iniciar un proceso infeccioso donde participan los hongos de almacén como *Penicillium*, *Aspergillus*, y *Rhizopus*; Sin embargo es de especial importancia la presencia del género *Penicillium*, el cual mediante la colonización de esporas en la manzana, origina la micotoxina patulina (Soriano *et al.*, 2002).

Para el género *Penicillium* según Frisvad *et al.* (2004), se determinaron 13 especies productoras de patulina: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladiolos*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* y *P. vulpinum*.

1.2.2 *Penicillium*

El género *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en 1809 (Fotografía 1.1). Thom, en el año de 1910, consideró a *P. expansum* como la especie tipo del género. Las especies que incluye el género *Penicillium* son ubicuas, de amplia distribución por todo el mundo y consideradas saprófitas. Muchas de ellas viven en el suelo o materia orgánica en descomposición (Pitt, 1979., Pitt y Hocking, 1997).

En muchas ocasiones los alimentos destinados al consumo humano o animal son el hábitat de *Penicillium* spp. Algunas especies son consideradas patógenas de frutas y algunas verduras frescas, sobre todo especies del subgénero *Penicillium* (Beuchart, 1987., Bringmann y Mader, 1995).

Los patógenos de frutas son *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos y *P. expansum* en manzana, pera, cereza y otras frutas (Beuchart, 1987., Filtenborg *et al.*, 1996).



Fotografía 1.1 *Penicillium* spp.

1.2.3 Morfología de *Penicillium*

La estructura que caracteriza a *Penicillium* es el conidióforo que presenta en forma de pincel. A la morfología de esta estructura es a la que debe el nombre del género (del latín *Penicillius*, “pincel pequeño”). Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada: la fiálide. El conidióforo está unido al micelio mediante el estípote. Entre éste y las fiálides pueden aparecer diferentes células. Estas células se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan. Aparte del de las fiálides, los puntos de ramificación son uno, dos o excepcionalmente, tres, a lo largo del conidióforo. La célula de soporte de la fiálide se denomina métula y la célula de soporte de la métula se denomina rama, en las especies que las presentan. Estas ramas parten del estípote, aunque pueden partir, a su vez, de otras ramas (Figura 1.8) (Martínez, 2003).

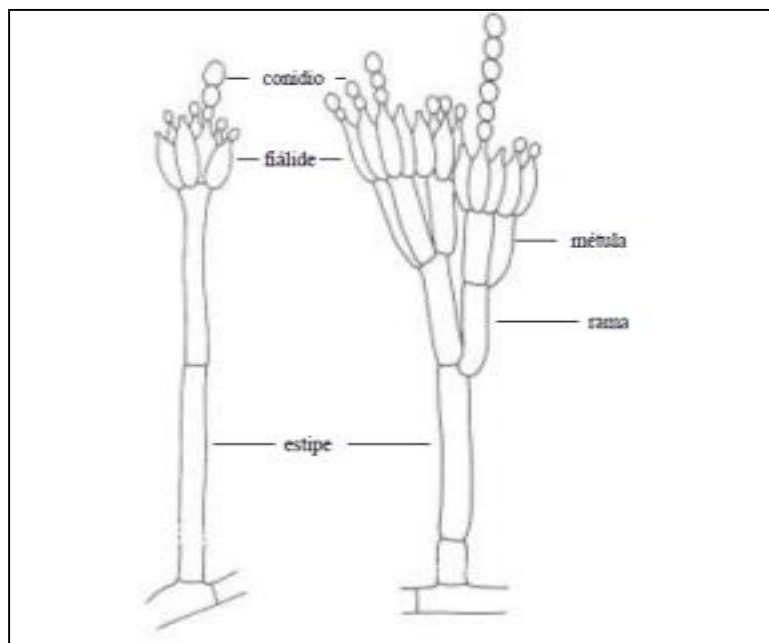


Figura 1.8 Nombres de las estructuras del conidióforo de *Penicillium* spp. (Martínez, 2003).

1.2.3.1 *Penicillium expansum*

La producción de la manzana involucra una serie de etapas, como son la cosecha, el transporte y el almacenamiento, en las que se debe tener ciertos parámetros y cuidados para evitar pérdidas o daños en el producto. Aunque en la etapa de cosecha puede haber problemas por la inadecuada manipulación de la fruta, la mayoría de los problemas se

tienen en la postcosecha. La humedad y la temperatura son importantes factores que contribuyen con la aparición de enfermedades en las manzanas. Uno de los microorganismos más frecuentes en la manzana y que disminuye su vida útil, es *Penicillium expansum* (Anguiano *et al.*, 2012).

P. expansum es responsable del deterioro en las frutas como (manzanas y peras), caracterizado por una rápida pudrición blanda y, finalmente, por pústulas azules (Figura 1.9). Esta especie es considerada como la principal fuente de patulina en estas frutas y consecuentemente en productos derivados de la manzana (Puel *et al.*, 2010).

Las colonias en medio de cultivo con extracto de levadura (CYA) miden de 30-40 mm de diámetro, de aspecto radialmente sulcado, moderadamente profundo a muy profundo, con la superficie típicamente coremial con una o más bandas anulares, con áreas adyacentes velutinosas a flocosas; micelio blanco; conidios producidos en cantidades moderadas, de color verde mate; exudado claro a naranja pálido similar a caramelo; reverso pálido a marrón oscuro, a menudo con áreas de color naranja amarronado. Las colonias en medio de cultivo con extracto de malta (MEA) son variables en un rango de 20-40 mm de diámetro, planas, algunos aislados persistentemente velutinosos, otros al menos parcialmente coremiales; producción conidial abundante, su color en CYA ligeramente gris, algunas veces produce pigmentos solubles; el reverso es pálido y en presencia de pigmentos solubles, naranja amarronado. Las colonias en medio de cultivo con glicerol (G25N) tienen un diámetro de entre 17-22 mm, radialmente sulcado, denso, textura de la superficie velutinoso a granular; algunas veces produce pigmento soluble café rojizo; reverso pálido, café claro o café rojizo. A 5 °C, solamente se desarrollan microcolonias típicamente de 2-4 mm de diámetro. No crece a 37 °C (Pitt y Hocking, 2009). Hifas individuales, en fascículos o coremios definidos, algunas veces visibles a simple vista, estípites entre 200-500 µm de longitud, con paredes lisas, terminalmente terverticiladas, algunas veces biverticiladas; ramas separadas, 15-25 µm de longitud; métulas 12-15 (-18) µm de longitud; fiálides estrechamente empaquetadas, ampuliformes casi cilindroidales 8-11 µm de longitud, con colula corta; conidios elipsoidales, de 3-3.5 µm de longitud, lisos, densamente empaquetados, cadenas irregulares (Pitt y Hocking, 2009).



Figura 1.9 Manzana contaminada por *Penicillium expansum* (Puel *et al.*, 2010).

1.2.4 Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias producidas como resultado del metabolismo secundario de microorganismos como los hongos fitopatógenos, las cuales se distribuyen con facilidad en el fruto y pueden llegar a ser perjudiciales, aun cuando se encuentren en concentraciones muy bajas, poniendo en entredicho la inocuidad de los alimentos. Un 25% de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxina, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud de la población (Trigos *et al.*, 2008).

Las principales micotoxinas naturales producidas en las manzanas podridas son la patulina y las aflatoxinas (Hasan, 2000).

1.2.5 Patulina (PAT)

La patulina PAT es producida principalmente por *Penicillium expansum*, sin embargo, también la pueden producir especies de *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Byssochlamys*, y en menor concentración especies de *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Mucor* y *Phialophora* todos ellos con capacidad de producir enfermedades de postcosecha en frutas, vegetales y cereales. Sus efectos tóxicos agudos en los mamíferos se deben principalmente a un deterioro en la función renal. También se ha documentado que PAT provoca daño oxidativo teniendo un impacto negativo en la reproducción del hombre a

través de la interacción con la producción de hormonas, además de afectar también al sistema inmunológico (Fuchs *et al.*, 2008).

Los pocos estudios de toxicidad a largo plazo sobre la patulina han mostrado una ausencia de tumores en ratas expuestos oralmente a 0,1 a 2,5 mg patulina / kg de peso corporal / día durante 74 a 104 semanas. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), la patulina se clasifica en el grupo 3 como "no clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos" (Puel *et al.*, 2010).

Esta micotoxina se encuentra mayormente en manzanas ya que contiene azúcares: fructosa, glucosa, sacarosa constituyentes principales de la fuente de carbono necesaria para el desenvolvimiento del hongo así como ácido málico importante para el aumento y estabilidad química de la patulina (Soriano *et al.*, 2002).

Desde el 2003, el reglamento europeo 1425/3003 establece un nivel máximo de 50 mg / L para los zumos de frutas y productos derivados, 25 mg / L para productos de la manzana sólidos y 10 mg / L para los zumos y alimentos destinados a bebés y niños de corta edad. Hoy en día, la Food and Drug Administration (FDA) limita la patulina a 50 mg / L (Puel *et al.*, 2010). En la Figura 1.10 se observa la estructura química de la micotoxina Patulina.

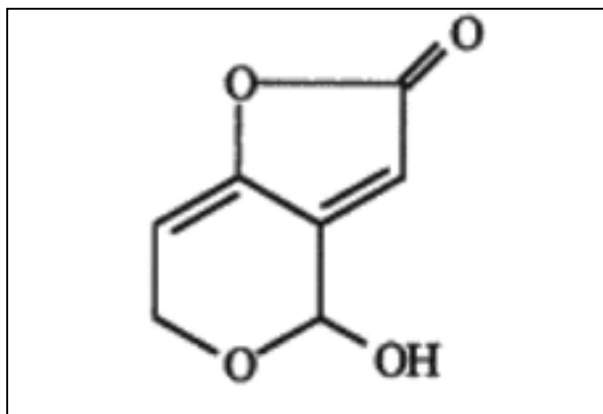


Figura 1.10 Estructura química de la Patulina (Nunes *et al.*, 2007).

Durante el almacenamiento de la manzana, se presentan pérdidas que se estiman en más de 25% debidas a daños producidos por hongos, principalmente *Penicillium expansum* Link, causante de la pudrición azul (Sánchez *et al.*, 2008).

El principal método utilizado para controlar ésta y otras pudriciones es el uso de fungicidas de síntesis química, alternativa no del todo aceptada, debido a los daños al medio ambiente, los riesgos en la salud humana y a la formación de cepas resistentes al fungicida. Por ello, el control biológico constituye una alternativa eficaz ya que utiliza microorganismos antagónicos no patógenos para el ser humano y que pueden ser más persistentes durante el almacenamiento que los productos químicos. En el caso de la manzana, se utilizan principalmente levaduras que tienen la capacidad de desarrollarse a temperaturas bajas y tiempos prolongados. Sin embargo, el éxito de estos productos sigue siendo limitado, y sólo unos pocos microorganismos están comercialmente disponibles para controlar el deterioro poscosecha de la fruta (Aular, 2008).

1.2.6 Importancia económica de *Penicillium*

Desde el punto de vista económico, las especies del género *Penicillium* causan importantes pérdidas al deteriorar cereales, frutas y otros alimentos durante su almacenamiento. Muchas especies de género son psicrótrofas y pueden producir el deterioro de diferentes alimentos a bajas temperaturas, suponiendo un posible problema para alimentos que se conservan en refrigeración (Beuchart, 1987; Bringmann y Mader, 1995).

El almacenamiento de frutas, al tratarse de productos frescos, puede presentar importantes pérdidas debido al crecimiento de *Penicillium* spp. El control de estos posibles problemas se lleva a cabo mediante prevención de daños físicos en la fruta, tratamientos diversos y un almacenamiento a bajas temperaturas lo más corto posible (Fan y Tian, 2001).

1.2.7 Métodos de identificación de hongos

La identificación de género y especie se puede llevar a cabo con claves taxonómicas basadas en la morfología de las estructuras macro- y microscópicas fúngicas. Se utilizan colonias desarrolladas durante 7 días en condiciones específicas tales como temperaturas y medios de cultivo especializados, de preferencia de cultivos monospóricos, con homogeneidad genética desarrollados a partir de una espora simple (Koneman, 2001). Otro método utilizado para facilitar la identificación taxonómica con claves son los microcultivos, que permiten observar las estructuras fúngicas *in situ* sobre el microscopio en aumento (Arenas, 2003). Además, la prueba de producción de indol, empleándose un

disco de papel de filtro impregnado con el reactivo de Ehrlich, evidencia la presencia de la enzima Triptofanasa y la formación de ácidos (quetoglobicina, ciclopiazónico) como metabolitos del indol, produciendo anillos de color violeta; lo cual ayuda a complementar los estudios morfológicos (Graü *et al.*, 2011).

Las prácticas tradicionales del estudio de hongos incluyen el cultivo convencional y la identificación microscópica (Hocking *et al.*, 2006). La identificación de especies de hongos está basada en los micelios (color, tamaño y aspecto) y características morfológicas (tamaño, aspecto, morfología de conidios y conidióforos) (Pitt y Hocking, 2009; Al-Hindi *et al.*, 2011). Estas técnicas requieren taxonomistas calificados; además de que los más mínimos cambios en temperaturas de incubación, y la composición y pH del medio pueden afectar la comparación de los caracteres de los micelios (Suaad, 2013).

Actualmente ha adquirido mayor importancia el uso de métodos basados en biología molecular donde, a través de procedimientos y reactivos, se pueden detectar determinadas secuencias de ADN que son propias de un agente microbiano. El método que se está utilizando ampliamente en los laboratorios de diagnóstico es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que se aplica generalmente para la identificación de microorganismos (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2008).

A través de este método, puede aumentarse la cantidad de ADN hasta niveles detectables mediante electroforesis (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2008). Se ha demostrado que esta técnica molecular presenta virtudes como simplicidad, rapidez, sensibilidad y especificidad al identificar hongos (Suaad, 2013), aunque tiene ciertas desventajas como que es una técnica costosa y requiere de personal capacitado.

1.3 EXTRACCIÓN DE ADN

1.3.1 Fundamento

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina,

timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Cornejo *et al.*, 2014).

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na⁺ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Sambrook *et al.*, 1989). Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Cornejo *et al.*, 2014).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Cornejo *et al.*, 2014).

1.3.2 Métodos de extracción de ADN

A partir de los años 90 se introdujeron al mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores. Los combos se venden en presentación de membranas de

sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina (Dundass *et al.*, 2008).

La membrana está insertada dentro de un microtubo de polipropileno y las microesferas se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora. Durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta durante la remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, posteriormente la molécula se libera de la matriz. Los combos también incluyen soluciones de lisis, unión y lavado que no contienen fenol ni cloroformo para extraer proteínas, tampoco requieren etanol para precipitar al ADN (Qiagen, 2005; Invitrogen, 2005).

Los kits comerciales disminuyen la extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y, utilizados bajo las recomendaciones de cada proveedor, garantizan una extracción de alta pureza ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son muy eficientes (Qiagen, 2005; Invitrogen, 2005).

1.3.3 Calidad y cantidad de ADN extraído

Es importante determinar el rendimiento del ADN mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 µg/mL (Leninger, 1975).

Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/µL). En el caso de algunos equipos como el espectrofotómetro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra y el equipo nos proporciona directamente la concentración en ng/µL. Considerando que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 ng/µL de ADN en cada muestra, si se recuperaron 50 µL, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 µg. Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas. Para estimar la pureza del ADN se

considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Desjardins y Conklin, 2010).

1.4 GENERALIDADES DE LA PCR

1.4.1 Fundamento

PCR son las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa. Es una técnica la cual fue descubierta por K. B. Mullis en 1983, y se ha convertido en una de las técnicas básicas de Biología Molecular, ampliamente utilizada debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad.

La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa. Cuando se hace una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que se quiere estudiar –donde se encuentra el fragmento que se quiere sintetizar–, los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTP’s), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (Eguiarte *et al.*, 2007).

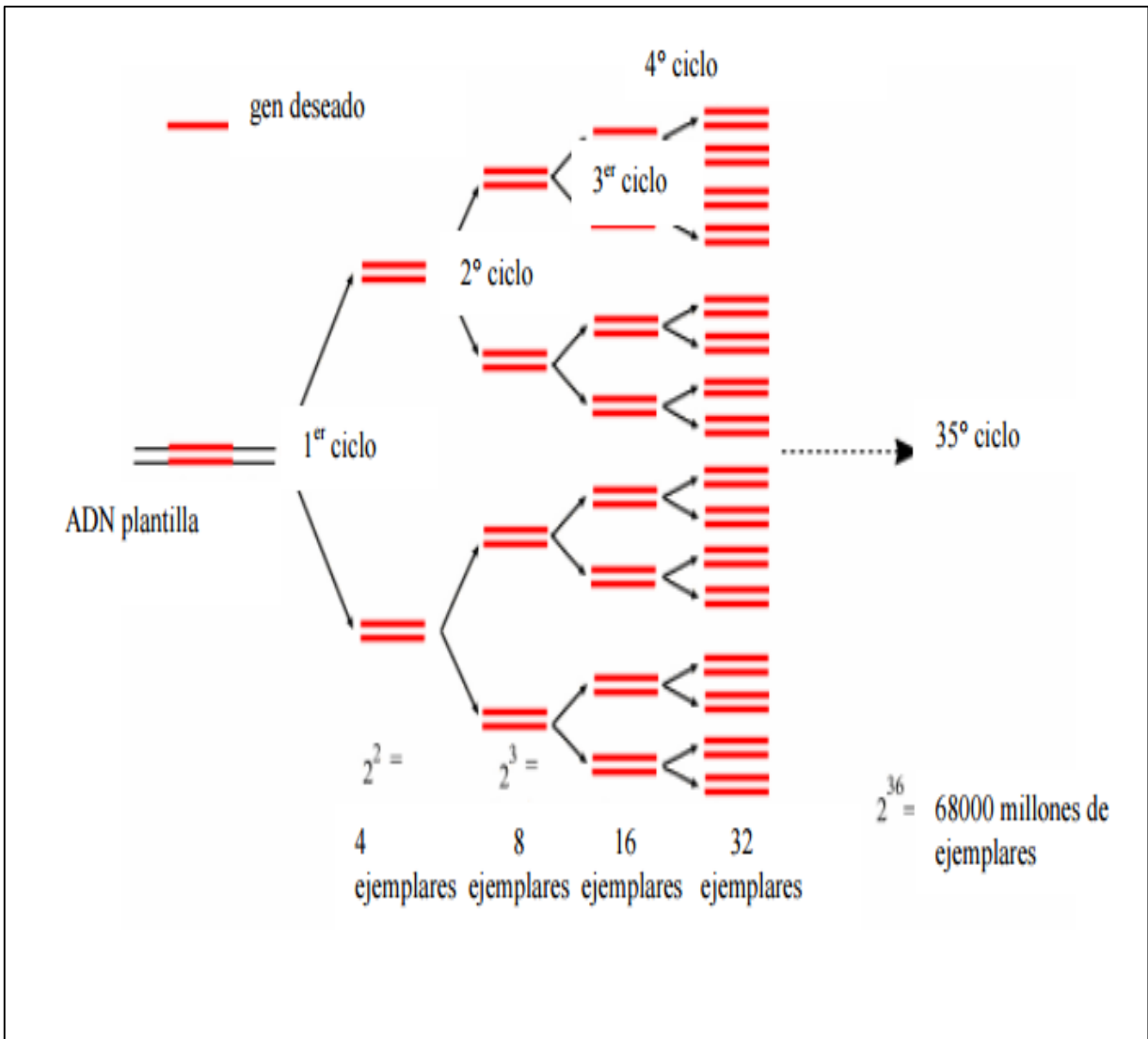


Figura 1.11 Amplificación exponencial del ADN mediante la PCR.

1.4.2 Etapas

La PCR es un proceso que consta de tres pasos.

a) Desnaturalización:

La primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. La desnaturalización

incompleta permite el apareamiento de las hebras de ADN y por lo tanto se reduce el rendimiento del producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima (Fig. 1.12) (Cortazar y Silva, 2004).

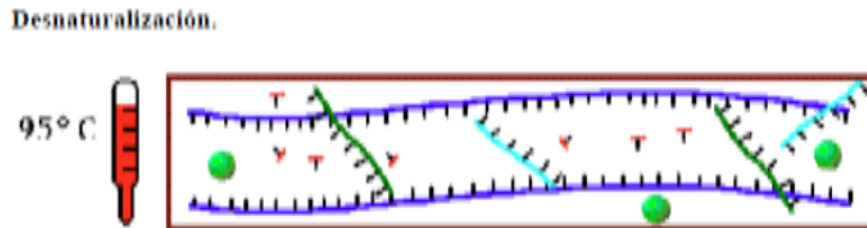


Figura 1.12 Etapa de desnaturalización en PCR (Cortazar y Silva, 2004).

b) Alineamiento:

La segunda reacción es el alineamiento, consiste en la hibridación de los *primers*. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los *primers* a las cadenas.

La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los *primers* dependen de la composición, tamaño y concentración de los *primers* amplificadores. Una temperatura de alineamiento (T_m) óptima es 5°C por debajo de la (Temperatura de alineación) T_m de los *primers*. Debido a que las ADN polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los *primers* puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C . Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados (Fig. 1.13) (Cortazar y Silva, 2004).

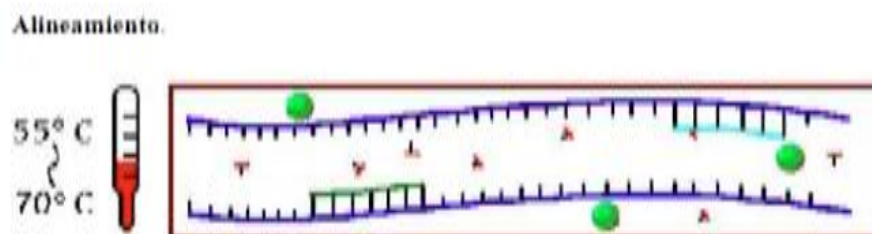


Figura 1.13 Etapa de alineamiento en PCR (Cortazar y Silva, 2004).

c) Extensión:

La tercera reacción es la extensión la cual se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde.

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del *primer* se realiza tradicionalmente a 72°C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado (Fig. 1.14) (Cortazar y Silva, 2004).

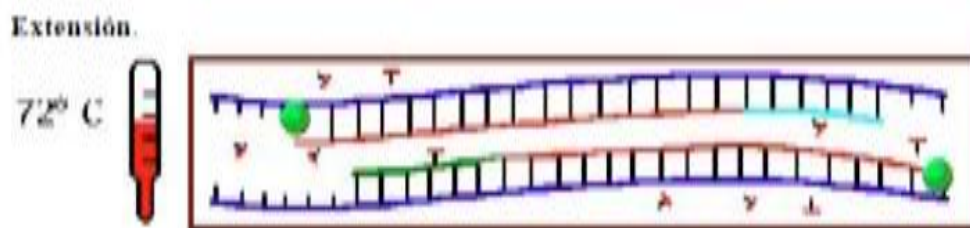


Figura 1.14 Etapa de extensión en PCR (Cortazar y Silva, 2004).

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés (Fig. 1.11). El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados (Cortazar y Silva, 2004).

1.4.3 Cebadores específicos

Generalmente se utilizan cebadores de 16 a 30 nucleótidos de longitud, lo que permite que la temperatura de anillamiento sea razonablemente elevada. Los cebadores no deben tener tramos de secuencias con una polibase ni motivos repetidos, ya que podrían hibridarse de forma inadecuada con el ADN molde. Deben evitarse las secuencias repetidas invertidas, a fin de prevenir la formación de estructuras secundarias del cebador, que impedirían su hibridación con el ADN molde. También deben evitarse las secuencias complementarias de otros cebadores utilizados en la PCR, para prevenir la hibridación entre cebadores o la formación de dímeros de cebadores (esto es especialmente importante en relación con el

extremo 3' del cebador). Siempre que sea posible, conviene que el extremo 3' del cebador tenga gran proporción de bases G y C para aumentar la hibridación del extremo que se quiere extender. La concentración usual de oligonucleótidos para la PCR es de 1 μ M. Esto resulta suficiente para al menos 30 ciclos de amplificación (Somma y Querci, 2007).

El diseño cuidadoso de primers es uno de los aspectos más importantes de la PCR. Primers mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica).

1.4.4 Electroforesis

Para poder analizar el o los fragmentos obtenidos en la PCR, se utiliza la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida, la cual permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno. Tanto la agarosa como la acrilamida forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual son obligados a pasar los fragmentos de ADN, “jalándolos” a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfato. Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de agujeros, mientras que los más grandes se irán retrasando y atorando en los hoyos; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migrarán a ritmos similares. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparan todos juntos, formando una banda en el gel (Fotografía 1.2) (Eguiarte *et al.*, 2007).

Para poder visualizar estas bandas se hace una tinción del gel. Lo más común es utilizar bromuro de etidio, que es una molécula con dos propiedades importantes: se intercala en las bases del ADN y brilla con luz UV a una longitud de onda determinada (264-366 nm) con lo cual se observan las bandas de ADN en el gel (Eguiarte *et al.*, 2007).



Fotografía 1.2 Equipo para electroforesis en gel de agarosa.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Descripción de cuadro metodológico

Objetivo general: Identificar *Penicillium expansum* mediante técnicas de Biología Molecular, para comprobar la presencia de este hongo causante de pudrición en poscosecha de manzana (*Malus domestica* L.).

Objetivo particular 1: Obtener cultivos monospóricos de las cepas de hongos de *Penicillium* aisladas de manzanas por medio de un sembrado de diluciones de suspensiones de esporas, para posteriormente llevar a cabo la extracción de ADN.

Objetivo particular 2: Extraer ADN de las colonias monospóricas de las cepas de *Penicillium*, de manzanas aparentemente sanas y de manzanas inoculadas con *P. expansum*, aplicando la metodología del Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food para llevar a cabo la PCR.

Objetivo particular 3: Seleccionar primers con ayuda de literatura actualizada, para tener la secuencia de iniciación de la amplificación de fragmentos específicos de ADN de *Penicillium expansum*.

Objetivo particular 4: Aplicar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para llevar a cabo la amplificación de ADN y de esta manera lograr la identificación molecular de *Penicillium expansum* presente en manzanas (*Malus domestica* L.) en poscosecha.

2.1.1 Cuadro Metodológico

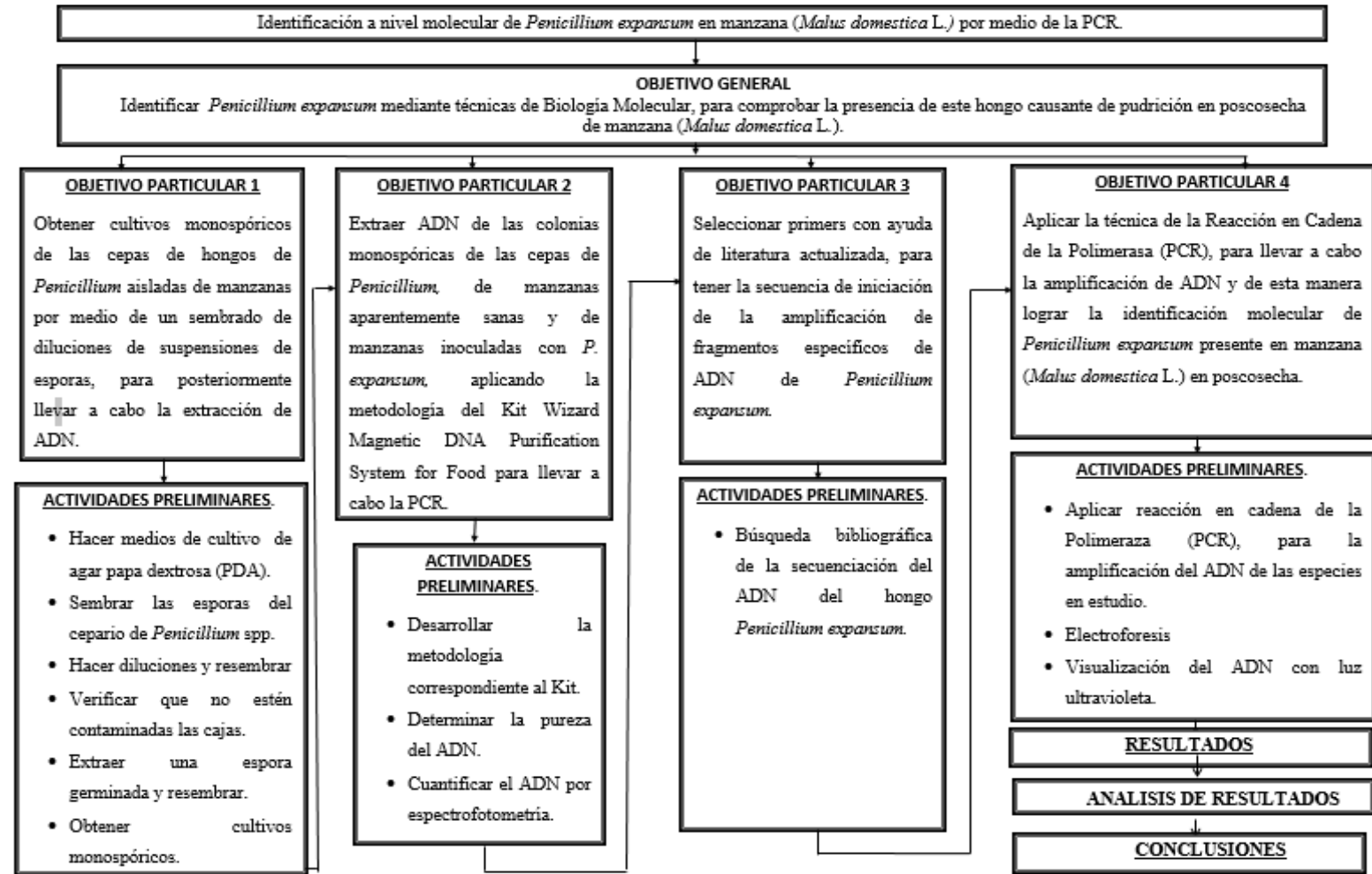


Figura 1.15 Cuadro metodológico.

2.2 Material

2.2.1 Material biológico

- Cepas de *Penicillium* spp. aisladas de manzanas obtenidas en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS)
- *Primers* frontal y reverso

Se seleccionaron los *primers* de acuerdo a Hesham *et al.* (2011), quienes lograron identificar específicamente a *P. expansum* a partir del gen de la *poligalacturonasa*. A continuación en la tabla 3 se muestran las especificaciones de dichos *primers*; además en la Figura 1.16 se observa su localización en el GenBank.

Tabla 3. *Primers* específicos para *Penicillium expansum*.

	Secuencia de (5' - 3')	Amplificado
Primer Frontal	ATCGGCTGCGGATTGAAAG	404 pb
Primer Reverso	AGTCACGGGTTTGGAGGGA	

Nucleotide

Display Settings: GenBank

Penicillium expansum polygalacturonase (pepg1) gene, complete cds

GenBank: AF047713.1

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

Go to:

LOCUS AF047713 3127 bp DNA linear PLN 12-MAR-1998
 DEFINITION Penicillium expansum polygalacturonase (pepg1) gene, complete cds.
 ACCESSION AF047713
 VERSION AF047713.1 GI:2935383
 KEYWORDS .
 SOURCE Penicillium expansum
 ORGANISM [Penicillium expansum](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
 Penicillium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3127)
 AUTHORS Yao,C., Conway,W.S., Ren,R. and Sams,C.E.
 TITLE Cloning and analysis of a gene encoding polygalacturonase in
 Penicillium expansum
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 3127)
 AUTHORS Yao,C., Conway,W.S., Ren,R. and Sams,C.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-FEB-1998) USDA-ARS, BARC-WEST, HCQL, BLDG 002, 10300
 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705, USA
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source
 1..3127
 /organism="Penicillium expansum"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:27334"
 gene
 <682..>2023
 /gene="pepg1"
 mRNA
 join(<682..930,999..1430,1508..1637,1698..>2023)
 /gene="pepg1"
 /product="polygalacturonase"
 CDS
 join(682..930,999..1430,1508..1637,1698..2023)
 /gene="pepg1"
 /codon_start=1
 /product="polygalacturonase"
 /protein_id="A8C05492.1"
 /db_xref="GI:2935384"
 /translation="MILTRSVVLGFLGSASLALASPVAELEAGSRLLTPRGSACSYSST
 SGAAAIAIAGEAGCSSITLNNVVVPAQTLLDLTGLASGTEVIFEGTTTTFYKQWAGPLI
 SLSGTNIQVSGASGHLIDGQSRWWDGEGSNKTHIKPFFFAHSLGSSSTITGLNIK
 DSPVQVFSISGSSGLTISGVTDNKNKGDNTSLGHNITDGFIDGSDSITITGATVYNQD
 DCLAINSGTHIVFSGGVCYSGGHLISGIVGGRSNNVETVHISSTQVWNSQNGVVRKA
 VSGATGTIKGVTFQDITLSGITSQGITIRQEYTNISGVTGSPPTTGVITGLTLNNVVGT
 VTSEGTDITIECGSSARCSGWTWTKVAVSGGEADVCKENAPSGTC"
 exon
 <682..930
 /gene="pepg1"
 /number=1
 exon
 999..1430
 /gene="pepg1"
 /number=2
 exon
 1508..1637
 /gene="pepg1"
 /number=3
 exon
 1698..>2023
 /gene="pepg1"
 /number=4
 ORIGIN
 1 agettetttc tatggccccg tggcgtgttg tggcgaggte aaccacaat gttgcgaate
 61 ccataccagc cctcaaccag tacgagttca taaaaagtgc acaaatatc ccagaatgga
 121 attagagcct ctttttcgct tcaaaagcct eggagaacta gaaagetgca attttacata
 181 gagtacggag tattgtagcc ttcttccct tctacggctc ctcccggcag attcggatag
 241 gaaataagcc tcgtattcct ttcataatc ctagcgtgct tcgtttcaaa ctcagactaa
 301 ttctttttaa acttccagcc cctggcgata attcggcage cttaagacat ttctcccag
 361 gaagtgtgce tacgctctgt gttctcagc aatctctcca ctcaactaac agcttttaag
 421 atattttaac tttagaagaa taagcacaaa ctcaaataga ttgcaatgce ttggttcaat



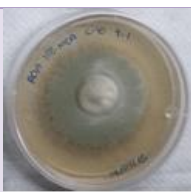



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF047713>

1/2

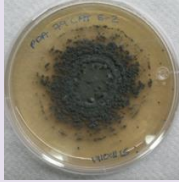

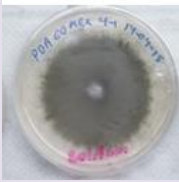

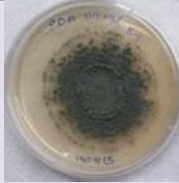

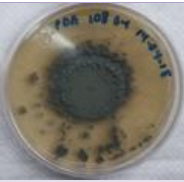
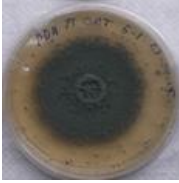
Figura 1.16 Secuencias de *primers* localizados en el GenBank, en el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *Penicillium expansum*.

- ADN extraído de las especies aisladas (Tabla 4).



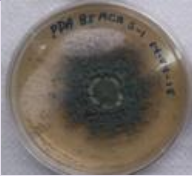

Tabla 4. Cepas de *Penicillium* aisladas de manzana.

No. Cepa	Colonia	Identificación morfológica
• 1		• <i>Penicillium expansum</i>
• 2		• <i>P. sp.</i>
• 3		• <i>P. expansum</i>
• 4		• <i>P. expansum</i>
• 5		• <i>P. sp.</i>
• 6		• <i>P. expansum</i>

... continuación de la Tabla 4. Cepas de *Penicillium* aisladas de manzana.

• 7		• <i>P. expansum</i>
• 8		• <i>P. sp.</i>
• 9		• <i>P. sp.</i>
• 10		• <i>P. sp.</i>
• 11		• <i>P. sp.</i>
• 12		• <i>P. expansum</i>
• 13		• <i>P. sp.</i>
• 14		• <i>P. sp.</i>

... continuación de la Tabla 4. Cepas de *Penicillium* aisladas de manzana.

• 15		• <i>P. expansum</i>
• 16		• <i>P. expansum</i>
• 17		• <i>P. expansum</i>
• 18		• <i>P. expansum</i>

2.2.2 Reactivos

*Elaboración de cultivos monospóricos

- Solución de Tween 20 al 0.05%
- Medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) marca DIBICO

*Extracción de ADN

- Agua libre de nucleasas
- Buffer de lisis A y B
- Solución de precipitación
- MagneSil™ PMPs
- Isopropanol
- Etanol frío 70%

*Cuantificación de ADN

- Agua libre de nucleasas

*PCR

- Master Mix (50 unidades de Taq ADN polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3 mM de $MgCl_2$)
- Agua libre de nucleasas
- DNA de las muestras de *Penicillium* spp

*Electroforesis

- Agarosa en polvo
- Tris acetato y EDTA (TAE) 1x como solución buffer, pH=8
- Bromuro de etidio en concentración 10 mg/ml
- Marcador de peso molecular de 1 kb, Promega
- Tinte cargador azul/naranja 6x, Promega

2.2.3 Equipos

*Elaboración de cultivos monospóricos

- Agitador vórtex
- Lámparas de alcohol
- Incubadora
- Autoclave

*Extracción de ADN

- Agitador vórtex
- Balanza analítica electrónica
- Termobloque con agitación para tubos Eppendorf Thermomixer
- Juego de micropipetas
- Microcentrífuga para tubos Eppendorf

*Cuantificación de ADN

- Espectrofotómetro, Accesolab NanoDrop ND-1000
- Computadora
- Juego de micropipetas

*PCR

- Juego de micropipetas
- Tubos Eppendorf
- Termociclador

*Electroforesis

- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Balanza analítica electrónica
- Transiluminador de luz UV
- Equipo de fotografía (cámara polaroid)
- Un filtro para luz UV

2.3 Métodos

2.3.1 Elaboración de cultivos monospóricos

A partir de las colonias del cepario de *Penicillium* spp. se obtuvieron suspensiones de esporas y se realizaron diluciones.

- 1.- Se agregó 1000 μL de solución de Tween 20 al 0.05% a un tubo eppendorf.
- 2.- Con ayuda de un sacabocados, se extrajo un explante de 0.5 cm de diámetro de una colonia del hongo y se colocó dentro del tubo eppendorf, agitando en vórtex por un minuto.
- 3.-Se tomó un tubo nuevo al cual se le agregó 900 μl de solución de tween 20 al 0.05% y 100 μl de la suspensión de esporas del primer tubo y se agitó en el vórtex aproximadamente 1 min. De esta manera se hicieron 4 diluciones.
- 4.-Al tener las disoluciones se tomaron 15 μL de la penúltima y última disolución y se sembraron dispersando la suspensión en cajas Petri con medio de cultivo PDA.

5.-Se incubaron por 24hrs a una temperatura de 25°C.

6.-De las cajas ya incubadas anteriormente se extrajo una espora germinada y se resembró en una caja Petri nueva con PDA.

7.-Se incubó por 7 días a una temperatura de 25°C y de esta manera se obtuvieron los cultivos monospóricos.

2.3.2 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de las especies aisladas de *Penicillium*, de manzanas aparentemente sanas y de las manzanas inoculadas con *P. expansum* se empleó el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. Está diseñado para la purificación de ADN de una gran variedad de alimentos tanto naturales como procesados. Este sistema de purificación utiliza perlas magnéticas que facilitan la unión de los ácidos nucleicos y la eliminación de contaminantes, aumentando la pureza del ADN (Promega, 2009). A continuación se describe la metodología utilizada:

1. Se pesaron 200mg de muestra en un tubo eppendorf de 2mL.
2. Se adicionaron 500 µL de Buffer de lisis A y perlas de vidrio. Se agitó en vórtex aproximadamente 10 minutos para homogeneizar y romper las paredes la muestra.
3. Se adicionaron 5 µL de RNAsa, se cerró el tubo y se agitó vigorosamente con el vórtex.
4. Se adicionaron 250 µL de Buffer de lisis B y se colocó el tubo en el vórtex por un tiempo de 10-15 segundos. Se incubó por 10 minutos a una temperatura ambiente (22-25 °C).
5. Se adicionaron 750 µL de solución de precipitación. Se agitó vigorosamente con el vórtex.
6. Se centrifugó por 10 minutos a una velocidad máxima de 13,000 rpm.
7. Se transfirió el sobrenadante (fase líquida) a un tubo nuevo de 2 mL.
8. Se mezcló la botella de Magnesil TM PMPs por un espacio de 15-30 segundos, el Magnesil TM PMPs debe de estar muy bien resuspendido antes de ser utilizado.
9. Se adicionaron 50 µL del reactivo Magnesil TM PMPs al sobrenadante y se agitó en vórtex.

10. Se adicionaron 0.8 de volumen de Isopropanol. Se invirtió el tubo de 10 a 15 veces. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente con mezclados ocasionales.
11. Se colocó el tubo dentro de la gradilla magnética por 1 minuto. Se desechó la fase líquida.
12. Se removió el tubo de la gradilla y se le adicionaron 250 μ L de Buffer de lisis B. Se invirtió el tubo de 2 a 3 veces y se regresó a la gradilla. Se dejó 1 minuto y se removió la fase líquida.
13. Se adicionó 1 mL de Etanol al 70%. Se colocó el tubo en la gradilla por 1 minuto. Se desechó el líquido remanente.
14. Se secaron las partículas de 14-30 minutos a temperatura ambiente ó 10 minutos a 65°C en el termomixer.
15. Se adicionaron 60 μ L de agua libre de nucleasas, se mezcló en el vortex y se incubó a 65°C por 5 minutos. Se colocó el tubo en la gradilla magnética y se removió el agua libre de nucleasas con el ADN.

2.3.3 Cuantificación de ADN

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta. Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol o agarosa, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencilla y exacta. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A260/A280 para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1.8 y 2.0 (Somma, 2007). A continuación se describe el procedimiento que se siguió para la cuantificación de ADN de las muestras:

1. Se calibró el equipo (Accesolab NanoDrop ND-1000 A113) colocando 2 μ L de agua libre de nucleasas en el orificio que se encuentra debajo del brazo.
2. Se abrió en la computadora el programa de NanoDrop, seleccionando la opción para ácidos nucleicos.

3. Se colocaron 2 μL de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
4. Se limpió y se adicionó 2 μL de la muestra de ADN a cuantificar y se ejecutó el programa.
5. Se registraron los datos proporcionados por el programa en cuanto a la concentración de ADN en una relación de 260nm/280nm.

2.3.4 PCR

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa se prepararon las muestras de acuerdo al protocolo que precisa el Kit Promega, con los *primers* frontal y reverso correspondientes a las muestras en estudio. A continuación se describe brevemente el procedimiento que se siguió para llevar a cabo la amplificación de ADN por medio de la PCR:

Tabla 5. Componentes para llevar a cabo una reacción de 25 μL .

Master Mix	12.5 μL
Primer R	0.5 μL
Primer F	0.5 μL
ADN	1 μL
H ₂ O	10.5 μL

1. Se hizo el cálculo correspondiente de cada reactivo (Tabla 5) de acuerdo al número de muestras que se amplificaron.
2. Se agregó a cada tubo la cantidad de ADN correspondiente, excepto al blanco.
3. Posteriormente se colocaron en el termociclador.
4. Se programó el termociclador de acuerdo a las condiciones establecidas para los *primers*.
5. Se realizó la PCR con el programa indicado en la Figura 1.17

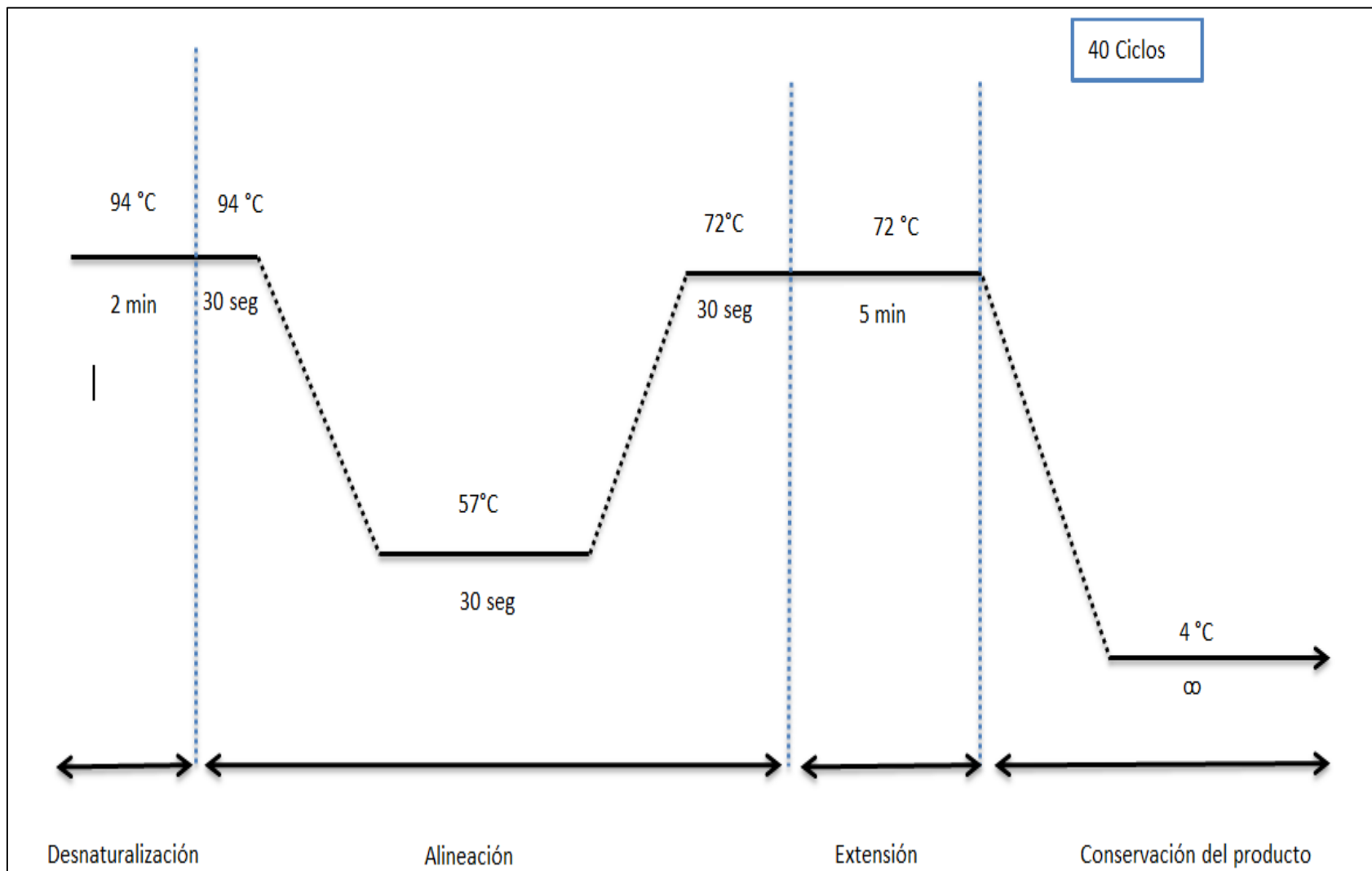


Figura 1.17 Condiciones de PCR para la identificación de *P. expansum*.

2.3.5 Electroforesis

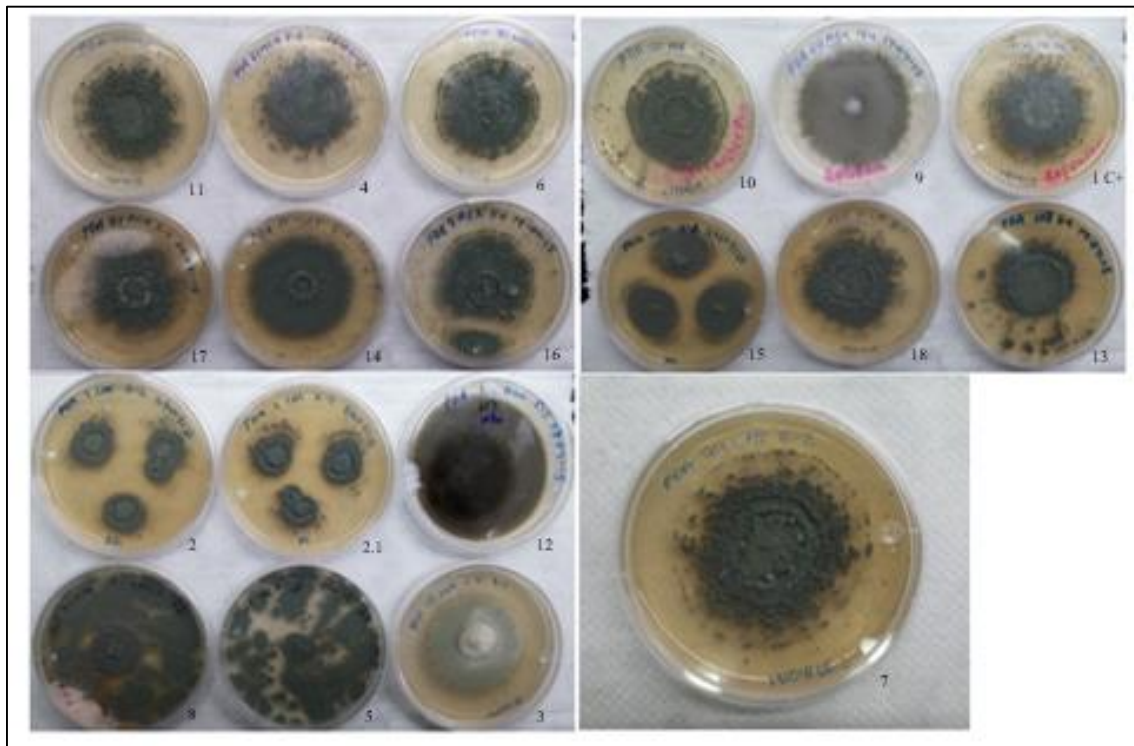
Para analizar los fragmentos obtenidos en la PCR, se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se separaron dichos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno. A continuación se describe brevemente el procedimiento de dicha técnica:

- 1.- Se disolvió en el buffer TAE 1X la agarosa al 1%, y se calentó en microondas hasta ebullición para disolver bien el polvo.
- 2.- La solución se agitó suavemente para evitar la formación de burbujas, y se le agregó bromuro de etidio a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
- 3.- Después se vertió en el contenedor de geles al que ya se le había colocado el peine para formar los pozos.
- 4.- En un parafilm se depositaron unas gotitas de colorante de aproximadamente 3 μL (para cada muestra) y después se agregó la gotita de la muestra de ADN de aproximadamente 4 μL sobre la gota de colorante.
- 5.- Cada muestra se colocó en un pozo.
- 6.- Se colocó el marcador de peso molecular en el gel.
- 7.- Se inició la electroforesis dejando fluir la corriente eléctrica a 90 V y se esperó aproximadamente de 1 a 2hrs.
- 8.- Al terminar se colocó el gel en el transiluminador para observar las bandas y se tomaron las fotos del gel.

CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

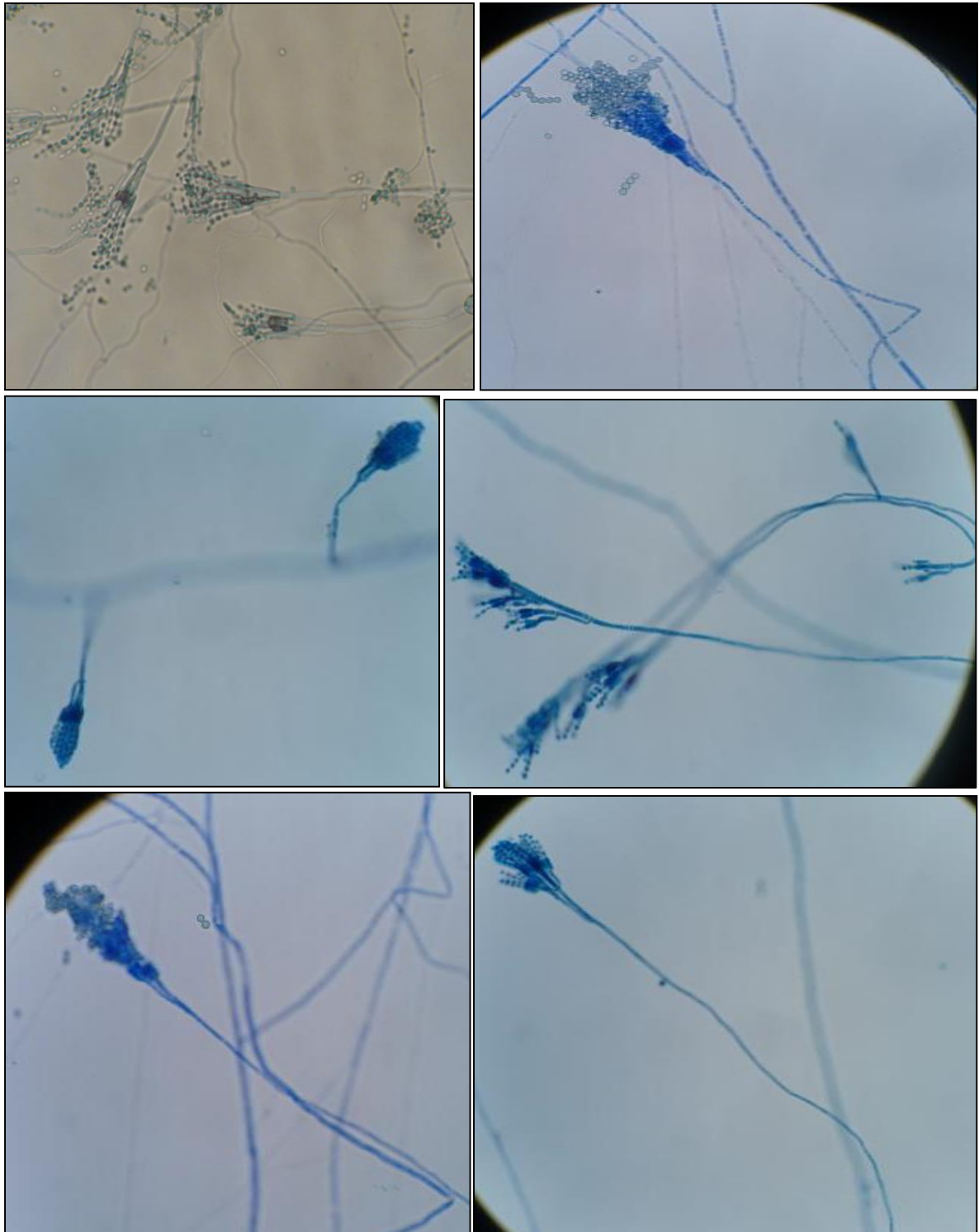
3.1 Obtención de cultivos monospóricos de especies de *Penicillium* aisladas de manzana

Se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de las cepas aisladas de frutos de manzana, los cuales fueron resembrados en medio de cultivo PDA. A simple vista se observaron colonias con características macromorfológicas similares entre sí; colonias de color verde mate, con los bordes de color blanco y textura pulverulenta, reverso marrón. A excepción de la cepa No. 3 (Veáse fotografía 1.3) la cual se observa como una colonia de micelio de color blanco con el centro ligeramente elevado, con profundidad media, hacia el exterior de color verde claro y textura pulverulenta, con bordes de color blanco y textura funiculosa.



Fotografía 1.3 Cultivos monospóricos de las cepas de *Penicillium* aisladas de manzanas.

La morfología y tamaño de los conidióforos de cepas aisladas de *Penicillium* se presenta en la fotografía 1.4. Se observan conidióforos en su mayoría terminalmente terverticilados y algunos biverticilados, con estípites entre 200 y 600 μm de longitud, de paredes lisas, con métulas irregulares y simétricas y conidios elipsoidales de paredes lisas.



Fotografía 1.4 Fotografías en microscopio (40x) de cultivos monospóricos de *Penicillium expansum* aisladas de manzanas.

3.2 Extracción de ADN de las colonias monospóricas del género *Penicillium*, de manzanas aparentemente sanas y de manzanas inoculadas con *P. expansum* por medio del Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food

- **Cuantificación de ADN del género *Penicillium***

La concentración obtenida del ADN extraído fue cuantificado con un espectrofotómetro, los valores de concentración y pureza se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de ADN y relación 260/280 de las cepas monospóricas del género *Penicillium*.

No. Cepa	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación 260/280	No. cepa	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación 260/280
1R1	58.2	6.94	1R2	60.6	7.02
2R1	57.4	3.62	2R2	36.6	4.17
3R1	34.9	4.61	3R2	49.2	7.59
4R1	57.4	4.91	4R2	92.6	2.82
5R1	33.3	6.52	5R2	46.3	3.55
6R1	69.5	5.46	6R2	63.6	4.21
7R1	78.5	2.43	7R2	52.7	4.13
8R1	63.2	3.40	8R2	78.6	4.99
9R1	52.2	6.40	9R2	142.9	2.82
10R1	101.2	4.02	10R2	78.6	4.70
11R1	47.3	5.24	11R2	39.8	6.30
12R1	49.0	4.14	12R2	22.4	8.31
131	52.4	7.32	13R2	70.6	3.07
14R1	60.2	6.99	14R2	39.6	5.36
15R1	30.1	8.12	15R2	42.9	6.90
16R1	31.0	6.86	16R2	73.6	5.17
17R1	24.8	6.11	17R2	43.5	4.82
18R1	38.9	4.89	18R2	68.2	4.74

Respecto a los valores obtenidos en cuanto a la relación 260/280 que es un índice de la pureza del ADN, se puede observar que están por arriba de lo ideal que es aproximadamente 1.8, lo cual muestra que el ADN extraído está contaminado con ARN (Desjardins y Conklin, 2010). Pero en cuanto a las concentraciones de ADN se observa que son altas pues se recomienda como mínimo una concentración de 60 ng/μL indicando que este ADN es apto para ser utilizado en la reacción de PCR.

- **Cuantificación de ADN de *Penicillium* en manzanas**

Para conocer si es posible identificar el hongo *P. expansum* directamente en manzanas aparentemente sanas se llevó a cabo la extracción de ADN de las muestras obtenidas de diferentes mercados empleando el KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. La concentración de ADN extraído en cada muestra fue cuantificada posteriormente con un espectrofotómetro, los valores de concentración y pureza se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración de ADN y relación 260/280 de las muestras de manzanas aparentemente sanas.

No. Muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación 260/280
1	118.9	1.45
2	69.9	1.8
3	61.1	1.5
4	70	1.55
5	62.9	1.69

Respecto a los valores obtenidos en cuanto a la relación 260/280 que es un índice de la pureza del ADN, se puede observar que están por abajo de lo ideal que es aproximadamente 1.8 a excepción de la muestra 2, lo cual muestra que el ADN extraído está contaminado con proteínas (Desjardins y Conklin, 2010). Pero en cuanto a las concentraciones de ADN se observa que son altas indicando que este ADN es apto para ser utilizado en la reacción de PCR.

- **Cuantificación de ADN de *Penicillium expansum* inoculado en manzanas**

Para conocer si es posible identificar el hongo *P. expansum* directamente en manzanas contaminadas se llevó a cabo la extracción de ADN de las muestras de manzanas inoculadas con *P. expansum* empleando el KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. La concentración de ADN extraído en cada muestra fue cuantificada posteriormente con un espectrofotómetro, los valores de concentración y pureza se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de ADN y relación 260/280 de las muestras de manzanas inoculadas con *Penicillium expansum*

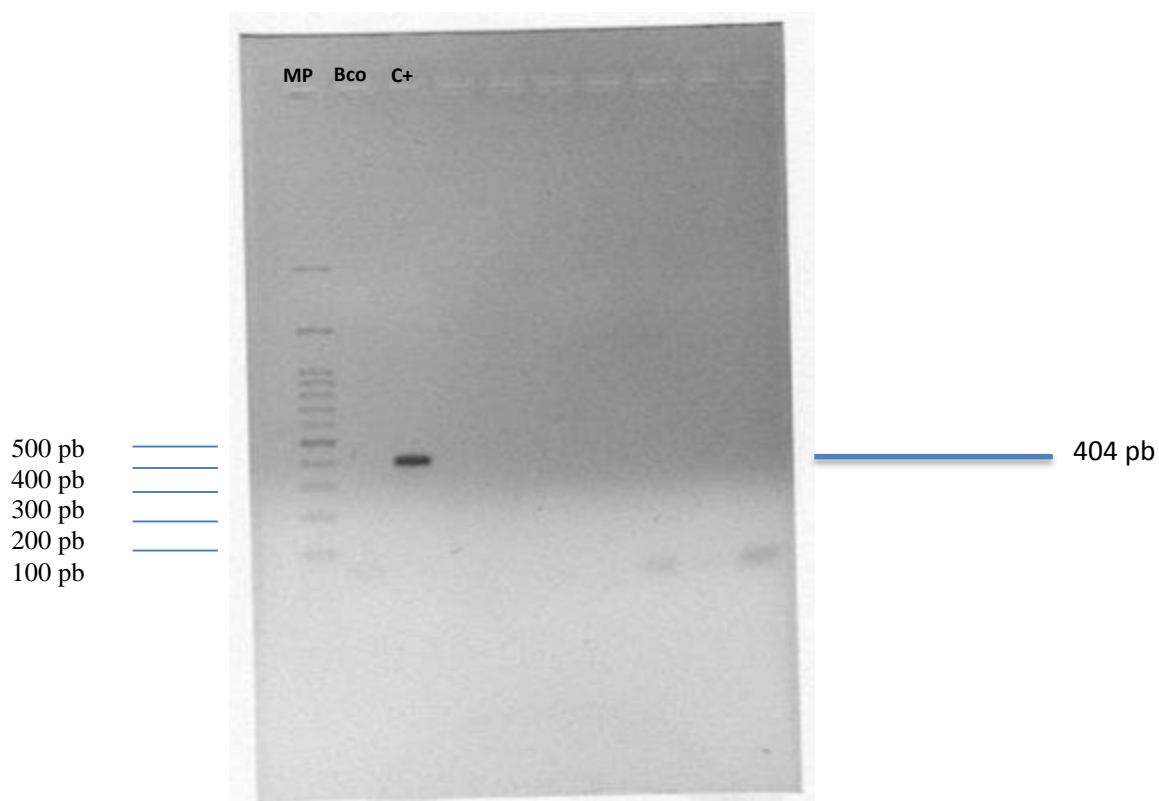
No. Muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación 260/280	No. Muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación 260/280
1	83.0	4.72	1.1	39.3	4.72
2	47.6	5.83	2.1	39.8	5.69
3	44.1	4.82	3.1	41.9	5.14

Se observa que los valores de la pureza del ADN resultan elevados posiblemente por una contaminación con ARN (Desjardins y Conklin, 2010). En cuanto a las concentraciones de ADN se observa que son menores a 60 ng/μL valor que resulta lo ideal para llevar a cabo una reacción de PCR a excepción de la muestra 1. Aun así al llevar a cabo la experimentación las muestras amplificaron correctamente.

3.3 PCR

Control positivo de *Penicillium expansum*

En la fotografía 1.5 se muestran el amplificado de 404 pb de los primers del gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*. Utilizando ADN perteneciente a *P. expansum* como control positivo. Las condiciones usadas para todas las pruebas fueron diseñadas conforme a las especificaciones de los primers. Se realizó la prueba a una T_m de 57 °C especificada por el proveedor Integrated DNA Technologies, con la cual se obtuvo un amplificado de 404 pb que fue nuestro control positivo para las siguientes pruebas.

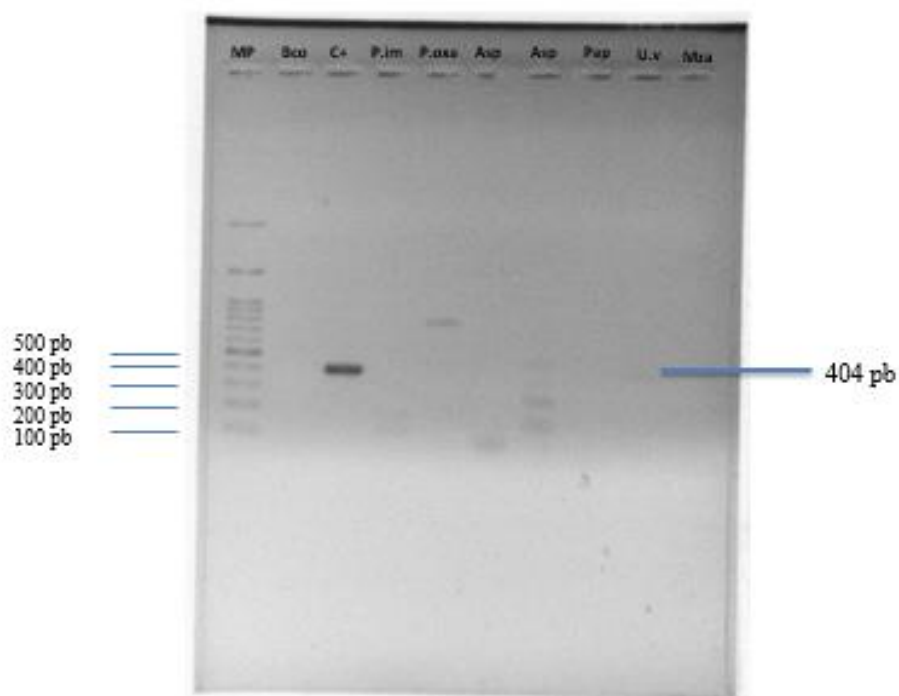


Fotografía 1.5. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con primers para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum* en la determinación del control positivo. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo de *P. expansum*.

Especificidad de los *primers* de *Penicillium expansum*

En la fotografía 1.6 se muestra el análisis electroforético de los productos de la PCR, utilizando los *primers* del gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturanasa* de *P. expansum*. En el gel se puede observar una banda amplificada de 404 pb en el carril 3 que corresponde al de la muestra de ADN de *P. expansum* y otra banda en el carril 9 de igual tamaño 404 pb que corresponde al ADN de uva vinícola. Se adjudica esta banda a la posibilidad de que la muestra estuviera contaminada con *P. expansum* ya que bibliográficamente se ha reportado la presencia de este hongo en frutos de uva (Donoso y Latorre, 2006). En los demás carriles se utilizaron muestras de ADN de distintas especies de *Penicillium* como son *P. implicatum*, *P. oxalicum*; de *Aspergillus*, papaya y de manzana, en donde se observan amplificadas pero de tamaños diferentes a los 404 pb que se esperaba para la especie de *P. expansum*.

Esto se realizó con el fin de comprobar que los *primers* obtenidos bibliográficamente para *P. expansum* no amplifican con otras especies con similitud morfológica y molecular.

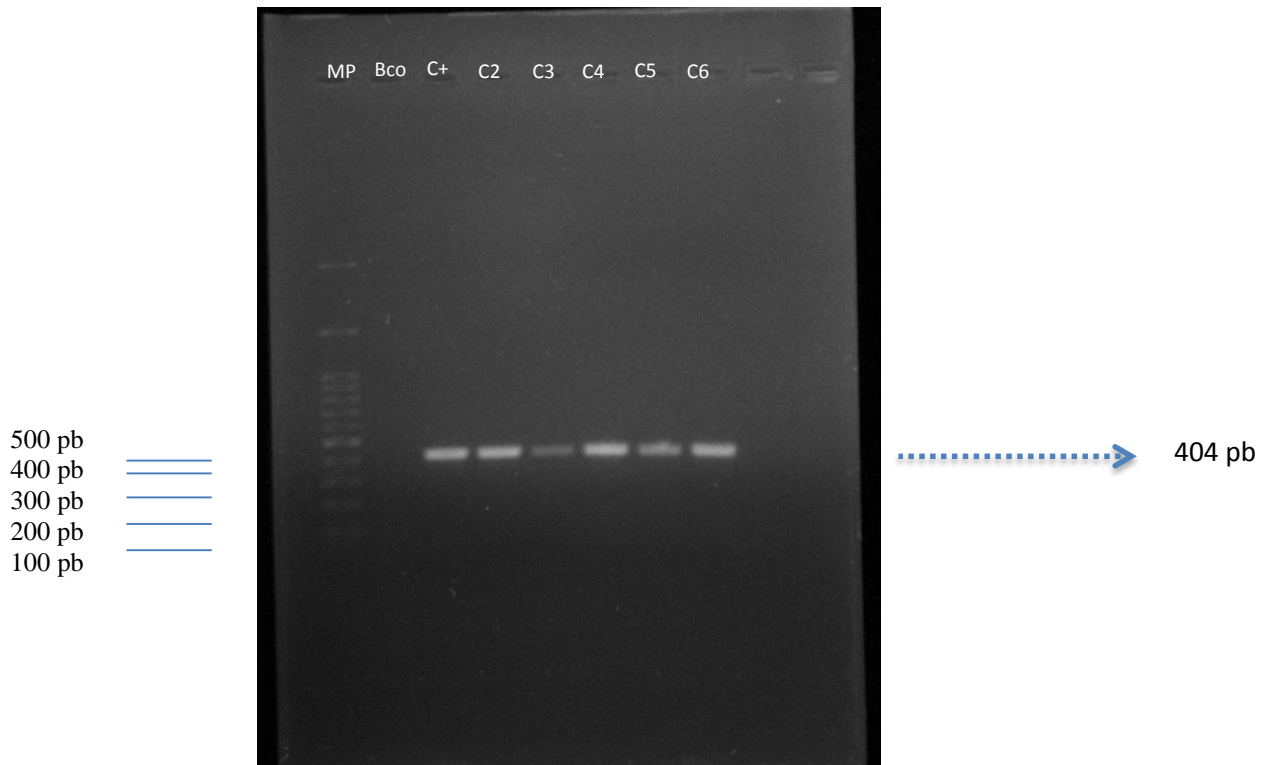


Fotografía 1.6. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, para comprobar la especificidad de los *primers*. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo (*P. expansum*), P. im: *P. implicatum*, P. oxa: *P. oxalicum*, Asp: *Aspergillus*, Asp: *Aspergillus*, Pap: Papaya, U.v: Uva vinícola, Mza: Manzana.

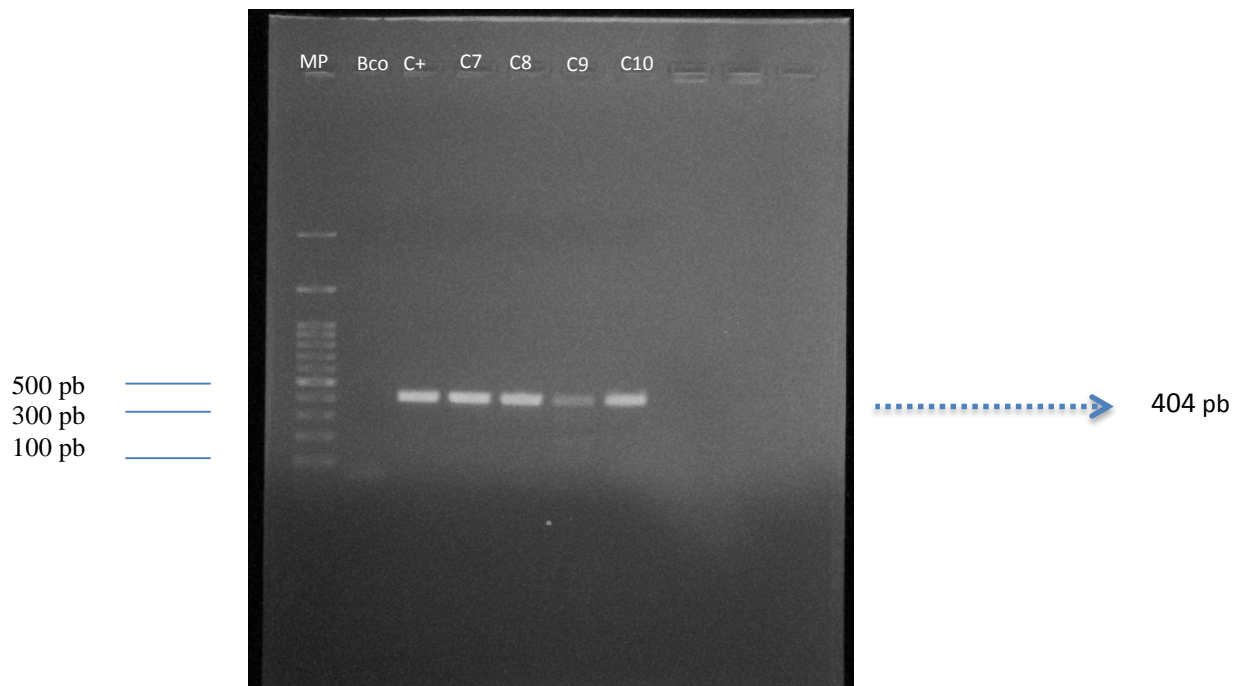
Identificación molecular de *Penicillium expansum*

En las siguientes fotografías se muestran los amplificadores de 404 pb de los primers del gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*; se colocó un marcador de peso molecular (MP), un blanco (Bco) y ADN perteneciente a *P. expansum* como control positivo, se evaluó el ADN de las cepas 2, 3, 4, 5 y 6 como se observa en la fotografía 1.7; el ADN de las cepas 7, 8, 9 y 10 como se observa en la fotografía 1.8; el ADN de las cepas 11, 12, 13 y 14 como se observa en la fotografía 1.9; y el ADN de las cepas 15, 16, 17 y 18 como se observa en la fotografía 1.10 de *Penicillium spp.* obtenidas en UNIGRAS. Las condiciones utilizadas para estas pruebas fueron diseñadas conforme a las especificaciones de los primers. Se realizaron las pruebas a una T_m de 57 °C especificada por el proveedor Integrated DNA Technologies. Los primers utilizados fueron obtenidos bibliográficamente (Hesham *et al.*, 2011).

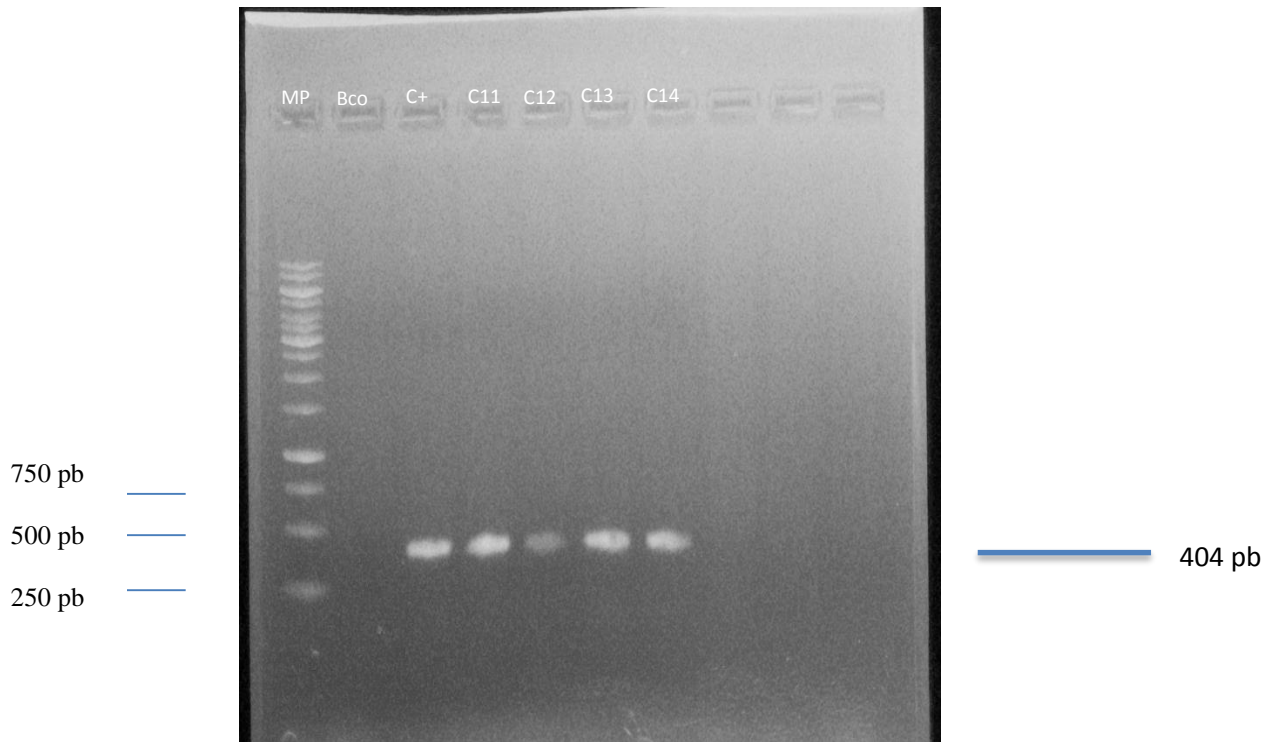
Con estas condiciones de PCR y los primers señalados se obtuvo para todas las muestras un amplificador de 404 pb demostrando que corresponden a la especie de *P. expansum*.



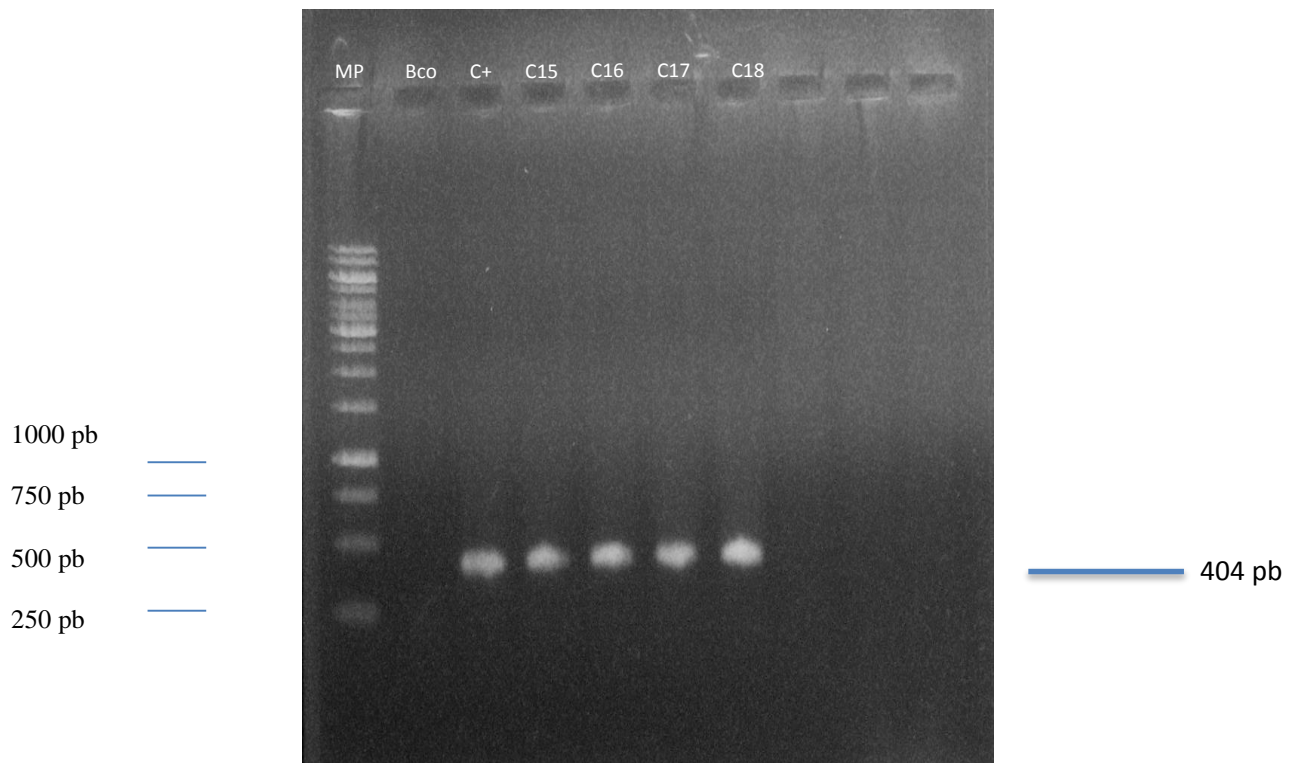
Fotografía 1.7. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, de las cepas C2 a la C6. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C2: Cepa 2, C3: Cepa 3, C4: Cepa 4, C5: Cepa 5, C6: Cepa 6.



Fotografía 1.8. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, de las cepas C7 a la C10. MP: Marcador de peso molecular 100 pb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C7: Cepa 7, C8: Cepa 8, C9: Cepa 9, C10: Cepa 10.



Fotografía 1.9. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, de las cepas C11 a la C14. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C11: Cepa 11, C12: Cepa 12, C13: Cepa 13, C14: Cepa 14.



Fotografía 1.10. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con *primers* para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, de las cepas C15 a la C18. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, C+: Control positivo, C15: Cepa 15, C16: Cepa 16, C17: Cepa 17, C18: Cepa 18.

Se corroboró la identificación de las cepas 1, 3, 4, 6, 7, 12, 15, 16, 17 y 18 como *P. expansum* con la técnica de PCR en esta tesis. Las cepas 2, 5, 8, 9, 10, 11, 13 y 14 también fueron identificadas en esta tesis por la técnica de PCR como *P. expansum*.

Los resultados obtenidos confirman la necesidad de una identificación de los hongos microscópicos a través de diversas técnicas, especialmente para llegar a una identificación certera a nivel de especie. Conjuntando las metodologías de identificación macro y micro morfológicas con la técnica bioquímica de Erlich y con las técnicas de PCR se puede confirmar la ubicación de una especie fúngica de morfología tan variable y dependiente de las propiedades químicas del sustrato, como la de *P. expansum*.

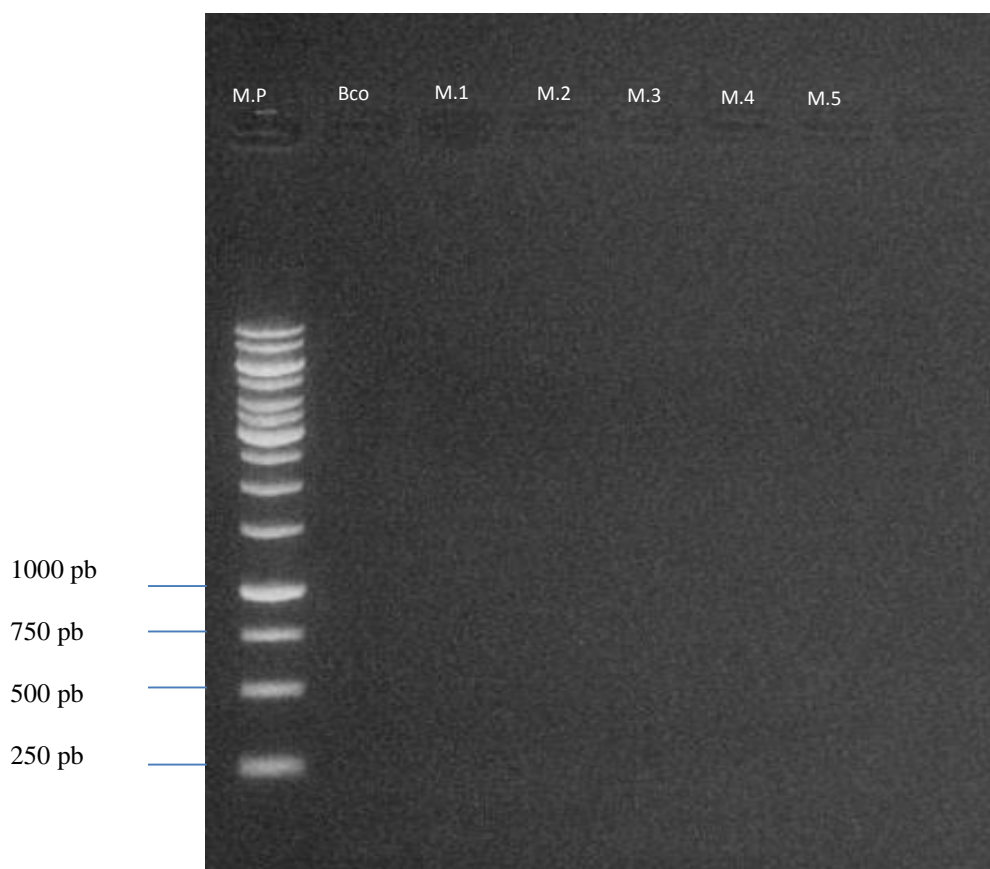
Visagie *et al* (2014) subrayan el hecho de que basar la identificación de *Penicillium* solamente en su morfología es muy arriesgado ya que ésta es la arquitectura física de adaptación de la especie a un ambiente. Como resultado de esto, una cepa puede lucir diferente de un laboratorio a otro y de unas condiciones específicas de crecimiento a otras. Por esta razón, las comparaciones entre diferentes estudios a veces han sido muy complicadas.

Un aspecto importante para la medición de estructuras fúngicas en el microscopio, necesarias para seguir las claves taxonómicas, es tomar las muestras del centro de la colonia donde los conidios y otras estructuras muestran formas y tamaños generalmente más uniformes.

La composición y calidad de los componentes de los medios de cultivo varían de una marca comercial a otra y pueden presentarse variaciones de pH en los medios resultantes. Por otro lado las variaciones de temperatura en las incubadoras no siempre son idénticas. Todos estos factores por un lado y la plasticidad genética de la especie *P. expansum* complican su identificación basada en características morfológicas, exclusivamente.

Identificación molecular de *Penicillium expansum* en manzanas aparentemente sanas

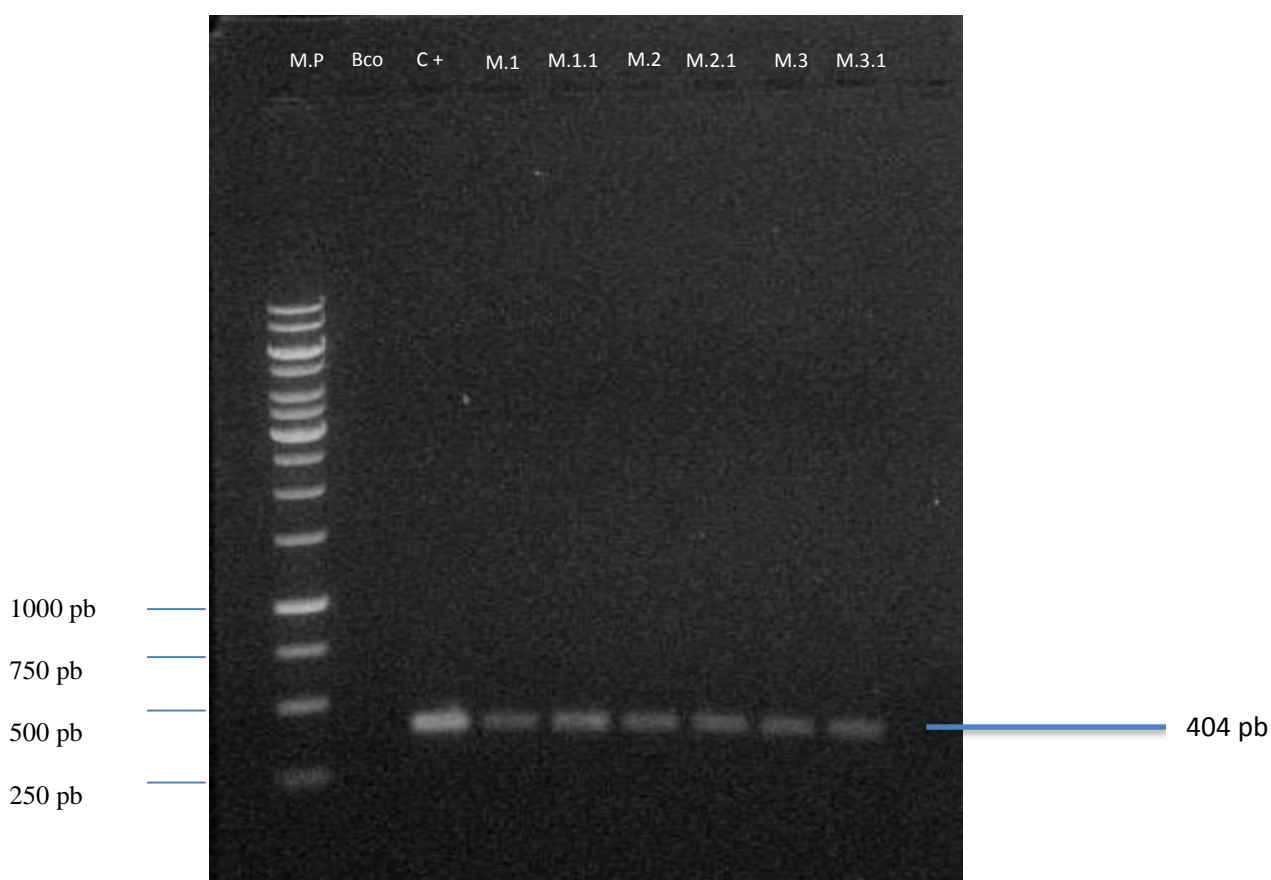
En la fotografía 1.11 se muestra el análisis electroforético donde se evalúan los productos de la PCR, utilizando los primers del gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturanasa* de *P. expansum*. Utilizando ADN de 5 diferentes muestras de manzanas aparentemente sanas, obtenidas de diferentes sitios comerciales. Se puede observar que en ninguna de las muestras se obtuvo un amplificado demostrando que las muestras estaban libres de *P. expansum*. Para prevenir la infección de manzanas por el hongo *P. expansum*, los productores se valen de procedimientos como el empleo de atmósferas controladas, o la incorporación de microorganismos como bacterias o levaduras al fruto (Anguiano *et al.*, 2012).



Fotografía 1.11. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con primers para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, en manzanas aparentemente sanas. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, M1: Muestra 1, M2: Muestra 2, M3: Muestra 3, M4: Muestra 4, M5: Muestra 5.

Identificación molecular de *Penicillium expansum* en manzanas inoculadas con *Penicillium expansum*

En la fotografía 1.12 se muestra el análisis electroforético donde se evalúan los productos de la PCR, utilizando los primers del gen *pepg1* que codifica para *poligalacturanasa* de *P. expansum*. Utilizando ADN perteneciente a *P. expansum* como control positivo y ADN de las muestras de manzanas inoculadas con *P. expansum*. Se puede observar que en todas las muestras se obtuvo un amplificado de 404 pb como lo indica Hesham *et al.*, (2011) demostrando que se puede detectar *P. expansum* directamente en el fruto.



Fotografía 1.12. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con primers para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*, en manzanas inoculadas con *P. expansum*. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, Bco: Blanco, C+: Control positivo (*P. expansum*), M1: Muestra 1, M1.1: Muestra 1.1, M2: Muestra 2, M2.1: Muestra 2.1, M3: Muestra 3, M3.1: Muestra 3.1.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los cultivos monospóricos a partir de cepas aisladas de manzana es un método con alto nivel de complejidad, debido a la facilidad con la que pueden contaminarse por otros individuos que se encuentran presentes en el ambiente.
- La extracción de ADN por medio del Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food arroja concentraciones altas y aunque la pureza no fue cercana a 1.8 considerada como óptima las extracciones funcionaron al llevar a cabo la PCR.
- Los *primers* seleccionados para la identificación molecular de *Penicillium* spp. fueron específicos para *Penicillium expansum*. Todas las cepas de *Penicillium* aisladas de manzana resultaron positivas en la prueba de PCR para *Penicillium expansum*, debido a esto ya no hubo necesidad de hacer pruebas con *primers* para otras especies de *Penicillium*.
- Se comprobó que la especie de *Penicillium expansum* se puede detectar por medio de la PCR directamente en frutos de manzana con síntomas de pudrición sin necesidad de aislar el hongo previamente.
- La identificación molecular de especies de *Penicillium* por medio de la PCR es una técnica rápida, sensible y específica con respecto a las técnicas de identificación morfológica, las cuales son muy tardadas y pueden ser erróneas debido a la similitud morfológica de algunas especies. Sin embargo, llevar a cabo esta metodología requiere de personal capacitado.

RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo esta metodología con otros frutos que reporte la literatura con presencia de *Penicillium expansum*.
- Crear una norma que regularice la concentración en alimentos de la micotoxina Patulina.
- Evaluar los riesgos para la salud provocados por el consumo de micotoxinas provenientes de hongos en manzana.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Hindi, R. R., Al-Najada, A.R., Mohamed, S.A. (2011). Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: screening of plant cell wall degrading enzymes. *African Journal of Microbiology*, Vol. 5, No. 4, pp. 443–448.

Anguiano Cabello, J., Cepeda Nieto, A.C., Morlett Chávez, J. y Zugasti Cruz, A. (2012). Contaminación por hongos filamentosos en manzana: amenaza para la salud y la economía. *Revista de divulgación científica, Ciencia Cierta*, No. 31.

Arenas, R. (2003) *Micología Médica Ilustrada*. México D.F.: 2da edición. McGraw Hill; pp. 1-352.

Aular, J.E. (2008). Consideraciones sobre el manejo poscosecha de frutas en Venezuela. Venezuela. UCLA- Postgrado de Horticultura; pp. 13-18.

Beuchart, L.R. (1987). *Food and beverage mycology*. Nueva York: 2da edición. Springer; pp. 1-662.

Bringmann G. y Mader T. (1995). In vivo formation of diazepam-like 1,4- benzodiazepines by *Penicillium verrucosum* var. *Verrucosum* after administration of 2-aminobenzophenones and glycine . *Journal of Neural Transmission*, Vol. 101: pp.169-181.

Cocina y Vino (2012). Tipos de manzanas más importantes. Consultado el 13 de mayo del 2015 de <http://cocinayvino.net/tips/tips-de-cocina/1508-tipos-de-manzana-mas-importantes.html>

Consumer, E. (2008). Las frutas una a una. Frutas frescas. Consultado el 17 de abril del 2015 de: <http://www.frutas.consumer.es/documentos/frecas/manzana/intro.php>

Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México: 1ra Edición. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) Instituto Nacional de Ecología y

Cambio Climático (INECC) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I); pp. 1-251.

Cortazar, A. y Silva, E.P. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. México. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México; pp. 1-40.

Desjardins, P. y Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*. No. 45, 2565.

Domínguez, M. (2008). Estudio de la variabilidad morfológica en el banco nacional de germoplasma de manzano. Zaragoza; Escuela Universitaria Politécnica La Almunia de Doña Godina; pp. 1-109.

Donoso, A. y Latorre, B. (2006). Caracterización del moho azul causado por *Penicillium* spp. en uva de mesa almacenada en frío. *Ciencia e investigación agraria*. Vol. 33, No. 2, pp. 143-155.

Dundass, N., Leos, N.K., Mitui, M., Revell, P. y Rogers, B.B. (2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics*. Vol. 10, pp. 311-316.

Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X. (2007). Ecología molecular. México, D.F.: 1ra edición. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.; pp. 1-573.

Fan Q. y Tian S. (2001). Postharvest biological control of grey mold and blue mold on Apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) skinner. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 21, No. 3, pp. 341-350.

Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero. (Abril de 2014). Obtenido de Panorama de la manzana: <http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Manzana%20%28abr%202014%29.pdf> Consultado el 16 de marzo del 2015.

Filtenborg, O., Frisvad, J.C. y Thrane, U. (1996). Moulds un food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 33, No. 1, pp.85-102.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. y Samson, R.A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. Vol. 49, pp. 201–242.

Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. y Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 46, No. 4, pp.1398–1407.

Graü de Marín, C., Muñoz, D., Márquez, E., Figueroa, G. y Maza, J. (2011). Identificación de hongos con potencial micotoxigénico en harinas de pescado destinadas para la elaboración de alimentos concentrados. *Revista Científica.*, Vol. XXI, No. 3, pp. 256-264.

Hasan, H. A. H. (2000). Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 16, No. 7, pp. 607-612.

Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A. y Thrane, U. (2006). *Advances in Food Mycology*. U.S.A. Vol. 571, Springer; pp. 1- 361.

Itoiz Avínzano, M. R. (2000). Caracterización de la colección de manzanos (*Malus x domestica*, Borkh) del banco de Germoplasma de la Universidad Pública de Navarra. Evaluación de su variabilidad. Pamplona; Universidad Pública de Navarra, pp. 1-395.

Knowmycotoxins (2008). Crecimiento de los hongos. Consultado el 15 de mayo del 2015 de: <http://www.knowmycotoxins.com/es/npoultry2.htm>

Koneman, E. (2001) Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color. Buenos Aires, Argentina: 6ta edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 1-1432.

Martínez, E. (2003). Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Barcelona; Universidad Autónoma de Barcelona, pp. 1- 288.

Moreno, E. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. México: 1ra edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria; pp. 7-107.

Nunes da Silva, S.J., Zilles, P., Ronise, C., Henning, M., Jablonski, A. y João, R. (2007). Patulina en alimentos: estado de arte y tendencias analíticas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Vol. 29, No. 2, pp. 406-413.

Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its telemorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London; New York, Academic Press, pp. 1-634.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997). Fungi and food spoilage. Londres: 2da edición. Springer, pp. 1- 577.

Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage. London; New York: 3ra edición. Springer, pp. 1-519.

Puel, O., Galtier, P. y Oswald, I.P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*. Vol. 2, No. 4, pp. 613-631.

Pulso diario de San Luis (2015). México logrará en 2015 cifra récord en producción de manzanas. Recuperado el 30 de octubre del 2016 de <http://pulsoslp.com.mx/2015/09/07/mexico-lograra-en-2015-cifra-record-en-produccion-de-manznas/>

Qiagen (2005). *BioSprint DNA Plant Handbook*. Recuperado el 20 de junio del 2016 de www.qiagen.com/hb/biosprintplantdnakit

Sánchez, S.E., Martínez, R.A., Castillo, J. y Fernández, E. (2008). Antagonismo de levaduras nativas contra la producción azul (*Penicillium expansum* Link) en frutos de manzana. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 31, pp. 359-366.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.

Sambrook, J., Russel, D., (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. E.U.A.: 3ra edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1-1 a 17-97.

Somma, M. (2007). Extracción y purificación de ADN. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos; Sección No. 4. Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa; pp. 3-18.

Somma, M. y Querci M. (2007). Reacción en Cadena de la Polimerasa. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos; Sección No. 6. Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa; pp. 3-32.

Soriano, M., Bejar, V. y Bonilla, P. (2002). Frecuencia de hongos anemófilos productores de micotoxinas en algunos mercados de Lima, detección de Patulina en manzanas en descomposición. *Ciencia e Investigación*. Vol. 5, No. 2, pp. 36-45.

Soto, L. y Martínez, R. A. (2009). Efecto de levaduras antagonicas y bicarbonato de sodio sobre *Penicillium expansum* Link en dos variedades de manzana. *Revista Chapingo, serie horticultura*. Vol. 15, No. 2, pp. 211-216.

Suaad, S. A. (2013). Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 20, No. 4, pp. 311-317.

Trigos, A., Ramírez, K. y Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*. Vol. 28, pp. 125-129.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T. and Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. Vol. 78, pp. 343-371.

Vizcarrondo, M. y Gutiérrez, S. (2008). Identificación microbiana. Consultado el 15 de mayo del 2015 de: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificaci%C3%B3n.pdf

Zoppolo, R., Faroppa, S., Bellenda, B. y García, M. (2008). Alimentos en la huerta. Guía para la producción y consumo saludable. Uruguay, Montevideo; INIA-OPS-UDELAR, pp. 1-208.