

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación morfológica y molecular de especies de *Penicillium* en granos de maíz (*Zea mays* L.) por medio de la PCR

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

## **INGENIERA EN ALIMENTOS**

## PRESENTA:

## **ROBLES POSADA ROSALBA**

ASESOR: Dr. José Francisco Montiel Sosa

(Co) ASESOR (a): M. en M. Josefina Moreno Lara

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional Autónoma de México



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

ÍNDICE DE CUADROS

## GLOSARIO

### RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	2
1.1 CARACTERÍSTICAS DEL MAÍZ	
1.1.1 Origen del maíz	
1.1.2 Morfología	
1.1.3 Clasificación	4
1.1.4 Composición química provimal del maíz	5
1.1.5 Situación económica en México	7
1.2 HONGOS	
1.2.1 Hongos de campo	
1.2.2 Hongos de almacén	
1.2.2.1 Penicillium spp.	
1.2.2.2 Características de <i>Penicillium</i>	
1.2.2.3 <i>Penicillium</i> spp. que atacan al maíz	15
1.2.2.3.1 Penicillium oxalicum	
1.2.2.3.2 Penicillium citrinum	
1.2.2.3.3 Penicillium madriti	
1.2.2.3.4 Penicillium rolfsii	
1.2.2.3.5 Penicillium miczynskii	
1.2.2.4 Micotoxinas	
1.2.2.5 Principales micotoxinas producidas por hongos del género Penicillium	
1.2.2.5.1 Ácido oxálico	
1.2.2.5.2 Ácido secalónico D	
1.2.2.5.3 Ocratoxinas	
1.2.2.5.4 Toxinas tremorgénicas	
1.2.2.5.5 Ácido penicílico	
1.2.2.5.6 Patulina	
1.2.2.5.7 Citrinina	
1.2.2.5.8 Penitrems	
1.2.2.5.9 Citreoviridina	
1.2.3 Hongos de deterioro avanzado	
1.2.4 Factores que influyen en el deterioro de alimentos por hongos	
1.2.5 Métodos de Identificación de Hongos	

1.3 GENERALIDADES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	24
1.3.1 Fundamento	24
1.3.2 Etapas de la PCR	25
1.3.3 Marcadores Moleculares         1.3.3.1 ADN nuclear (nADN)         1.3.3.2 ADN mitocondrial (mtADN)         1.3.3.3 ADN ribosomal (rADN)	27 27 27 28
1.3.4 Análisis del producto de PCR (Electroforesis en gel)	28
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
2.1 JUSTIFICACIÓN	30
2.2 CUADRO METODOLÓGICO	31
2.2.1 Descripción del Cuadro Metodológico	32
2.3 MATERIAL	33
2.3.1 Biológico	33
2.3.2 Reactivos	34
2.3.3 Equipo	35
2.4 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	37
<ul> <li>2.4.1 Obtención de aislamientos de <i>Penicillium</i> spp. en semillas de maíz desinfectadas superficialmente</li> <li>2.4.1.1 Desinfección de muestras de maíz.</li> <li>2.4.1.2 Siembra directa en placa-agar.</li> <li>2.4.1.3 Aislamiento de micobiota</li> <li>2.4.1.4 Cultivos monospóricos</li> </ul>	. 37 37 37 38 39
2.4.2 Macromorfología	40
2.4.2.1 Características macromorfológicas	40
2.4.2.2 Reacción de Enrich         2.4.3 Micromorfología	40
2.5 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	44
2.5.1 Selección de <i>primers</i>	44
2.5.2 Extracción de ADN por método de Sambrook	44
2.5.3 Extracción de ADN por KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food.	46
2.5.4 Cuantificación del ADN	47
2.5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	48
2.5.6 Electroforesis	50
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51

5.1 Identificación morfológica de la micobiota presente en granos de maíz en medio de cultivo PDA 51
5.2 Identificación morfológica de las especies de <i>Penicillium</i> aisladas de los granos de maíz en medio de cultivo CYA, MEA, G25N y CZAPEK
3.3 Extracción y cuantificación de ADN
93.4 Diseño de primers específicos para Penicillium oxalicum
94.5 PCR
CONCLUSIONES
RECOMENDACIONES101
BIBLIOGRAFÍA
ANEXOS

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Partes principales del grano de maíz	3
Figura 1.2 Principales estados productores de maíz en el 2012	7
Figura 1.3 Volumen de producción, importaciones y rendimiento correspondiente al maíz en	
México	8
Figura 1.4 Precio promedio del maíz en México 2009-2014	9
Figura 1.5 Volumen y valor de producción de maíz por entidad en el año 2012	10
Figura 1.6 Ciclo de la pudrición de mazorca por hongos	12
Figura 1.7 Nombre de las estructuras del conidióforo de <i>Penicillium</i> spp	14
Figura 1.8 Penicillium oxalicum en olote y granos de maíz	15
Figura 1.9 Estructura química de la ocratoxina A	20
Figura 1.10 Estructura química de Patulina	21
Figura 1.11 Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	26
Figura 1.12 Esquema de la técnica de electroforesis	29
Figura 2.1 Cuadro metodológico del desarrollo experimental	31
Figura 2.2 Desinfección de granos de maíz	37
<b>Figura 2.3</b> Siembra de semillas. a) Siembra de maíz en campana de flujo laminar con alto grado esterilización. b) Semillas sembradas en medio de cultivo PDA	) de 38
<b>Figura 2.4</b> Aislamiento de colonias de <i>Penicillium</i> spp. a) Aislamiento de especies de <i>Penicilliu</i> partir de las micobiotas desarrolladas. b) Inoculación de los hongos en medio de cultivo PDA	<i>ım</i> a 38
Figura 2.5 Reacción de Ehrlich.	41
Figura 2.6 Cuadro de MEA de 1 cm x 3 mm	41
Figura 2.7 MEA sobre varilla de vidrio y portaobjetos	42
Figura 2.8 Inoculación por picadura de <i>Penicillium</i> sobre MEA	42
Figura 2.9 Cubreobjetos sobre MEA inoculado con <i>Penicillium</i>	42
Figura 2.10 Adición de glicerol al 10% como nutriente	43

Figura 2.11 Preparaciones con azul de algodón de las especies de Penicillium
Figura 3.1 Micobiota desarrollada en distintas muestras.    51
Figura 3.2 Características morfológicas de <i>Penicillium</i> Subgénero Aspergilloides cepa 157
Figura 3.3 Características morfológicas de <i>Penicillium citrinum</i> cepa 259
Figura 3.4 Características morfológicas de Penicillium rolfsii cepa 361
Figura 3.5 Características morfológicas de Penicillium oxalicum cepa 4
Figura 3.6 Características morfológicas de <i>Penicillium</i> Ser. <i>Janthinella</i> cepa 565
Figura 3.7 Características morfológicas de Penicillium Ser. Oxalica cepa 6
Figura 3.8 Características morfológicas de Penicillium oxalicum cepa 7
Figura 3.9 Características morfológicas de Penicillium oxalicum cepa 8
Figura 3.10 Características morfológicas de Penicillium madriti cepa 9
Figura 3.11 Características morfológicas de Penicillium miczynskii cepa 10
Figura 3.12 Características morfológicas de <i>Penicillium oxalicum</i> cepa 11
Figura 3.13 Características morfológicas de Penicillium oxalicum cepa 12
Figura 3.14 Características morfológicas de <i>Penicillium</i> Ser. <i>Oxalica</i> cepa 1385
Figura 3.15 Características morfológicas de Penicillium oxalicum cepa 14
<b>Figura 3.16</b> Electroforesis del marcador Cct8 componente putativo del complejo de chaperoninas TCP-1 en <i>Penicillium oxalicum</i> , Tm de 56 °C. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M4R1) Muestra 4R1. M7R1) Muestra 7R1. M4R2) Muestra 4R2 ( <i>P. oxalicum</i> ). M7R2) Muestra 7R2.
<b>Figura 3.17</b> Electroforesis de los amplificados de las cepas M1 a la M7 con <i>primers</i> de Calmodulina. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M1) Muestra 1R1 ( <i>P</i> . Subgénero <i>Aspergilloides</i> ). M2) Muestra 2R2 ( <i>P. citrinum</i> ). M3) Muestra 3R2 ( <i>P. rolfsii</i> ). M4) Muestra 4R2 ( <i>P. oxalicum</i> ). M5) Muestra 5R2 ( <i>P. Ser. Janthinella</i> ). M6) Muestra 6R2 ( <i>P. Ser.</i> <i>Oxalica</i> ). M7) Muestra 7R2 ( <i>P. Ser. Oxalica</i> ).
<ul> <li>Figura 3.18 Electroforesis de los amplificados de las cepas M7 a la M14 con <i>primers</i> de</li> <li>Calmodulina. MP) Marcador de peso molecular 100 pb. Bco) Blanco. M7) Muestra 7R2 (P. Ser.</li> <li>Oxalica). M8) Muestra 8R2 (P. oxalicum). M9) Muestra 9R1 (P. madriti). M10) Muestra 10R1 (P. miczynskii). M11) Muestra 11R1 (P. oxalicum). M12) Muestra 12R1 (P. oxalicum). M13) Muestra 13R1 (P. Ser. Oxalica). M14) Muestra 14R1 (P. oxalicum)</li></ul>
<b>Figura 3.19</b> Electroforesis de los amplificados de las cepas M1 a la M8 con <i>primers</i> de β-tubulina. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M1) Muestra 1R1 ( <i>P</i> . Subgénero <i>Aspergilloides</i> ). M2) Muestra 2R2 ( <i>P. citrinum</i> ). M3) Muestra 3R2 ( <i>P. rolfsii</i> ). M4) Muestra 4R2

(P. oxalicum). M5) Muestra 5R2 (P. Ser. Janthinella). M6) Muestra 6R2 (P. Ser. Oxalica). M7)	
Muestra 7R2 (P. Ser. Oxalica). M8) Muestra 8R2 (P. oxalicum)	)7
<b>Figura 3.20</b> Electroforesis de los amplificados de las cepas M9 a la M14 con <i>primers</i> de $\beta$ -	
tubulina. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M9) Muestra 9R1 (P. madriti).	
M10) Muestra 10R1 (P. miczynskii). M11) Muestra 11R1 (P. oxalicum). M12) Muestra 12R1 (P.	
oxalicum). M13) Muestra 13R1 (P. Ser. Oxalica). M14) Muestra 14R1 (P. oxalicum)	)8
Figura 3.21 Medios de cultivo.    11	0

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Clasificación de los maíces con base en sus propiedades funcionales
<b>Cuadro 1.2</b> Composición química proximal de algunos tipos de maíces
Cuadro 1.3 Producción de maíz en México del año 2000 al 20149
Cuadro 1.4 Clasificación de P. oxalicum según Pitt (1980) Reino Fungi (Hongos verdaderos)
Cuadro 1.5 Principales géneros productores de micotoxinas y número de especies
micotoxígenicas
Cuadro 2.1 Componentes de la PCR, para un volumen de reacción de 25 $\mu L$
Cuadro 2.2 Condiciones de PCR para los primers de P. oxalicum
<b>Cuadro 2.3</b> Condiciones de PCR para los <i>primers</i> de Calmodulina y β-tubulina
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz 52
<ul><li>Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz</li></ul>
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz
Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz

## **GLOSARIO**

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

*Primers* es una cadena corta de nucleótidos relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN

**Bena** β-tubulina

CaM Calmodulina

ADN ácido desoxirribonucleico

**nADN** ADN nuclear

mtADN ADN mitocondrial

rADN ADN ribosomal

ARN ácido ribonucleico

dNTP desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

Bret bromuro de etidio

**CIT** citrinina

**PEN** penitrems

#### RESUMEN

La pudrición de la mazorca puede ser causada por especies de *Penicillium*. Esta enfermedad se desarrolla sobre las mazorcas dañadas mecánicamente o por insectos. El síntoma característico es un moho pulverulento de color verde o verde azulado que crece sobre y entre los granos, comenzando por la punta de la mazorca, y que puede encontrarse también sobre el olote. Algunas especies como P. oxalicum que causan la pudrición en el campo, también pueden dañar a los granos de maíz en el periodo de almacenamiento cuando su humedad es alta entre 14-18%. Además de las pérdidas productivas y económicas que esto representa, muchas de las especies de Penicillium son micotoxigénicas, lo cual representa un peligro para la salud humana y animal. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar las especies del género Penicillium en granos de maíz (Zea mays L.) por medio de su identificación morfológica a través de las características macro y micromorfológicas de cada especie y utilizando claves especializadas; y su identificación molecular a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con ayuda de primers de Calmodulina, β-tubulina y primers diseñados a partir del gen Cct8 para P. oxalicum. Las especies que fueron identificadas en el maíz tanto morfológica como molecularmente en este proyecto son: P. oxalicum, P. citrinum, P. rolfsii, P. madriti, P. miczynszii; Subgénero: P. Subgénero Aspergilloides y Serie: P. Ser. Oxalica, P. Ser. Janthinella. Predominando la incidencia de P. oxalicum en 5 de las 14 cepas identificadas. Se descartó como marcador confiable a los primers de β-tubulina ya que no arrojaron diferencias entre especies. Cabe mencionar que todas las especies reportadas en este trabajo son productoras de micotoxinas. La identificación morfológica es un método demasiado tardado y debido al alto grado de similitud entre especies resulta muy complicada la diferenciación e identificación de las mismas. Sin embargo en la identificación molecular por medio de la PCR, si se cuentan con las herramientas, primers y condiciones adecuadas resulta ser una técnica rápida, eficaz y confiable. Lo cual es satisfactorio para la industria alimentaria, pues reduce tiempo tanto para identificar el hongo si está presente y poder aplicar algún tratamiento al maíz que logre exterminarlo; tanto para reducir las pérdidas económicas y garantizar la inocuidad y calidad de los granos de maíz y sus derivados a sus consumidores.

Palabras clave: PCR, primers, Penicillium, micotoxinas, maíz.

## **INTRODUCCIÓN**

El cultivo del maíz (*Zea mays* L.) es importante para México, debido a que junto con el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye la base alimenticia de millones de mexicanos (Hernández *et al.*, 2007). El deterioro por mohos es una de las causas de reducción de la calidad de los granos de cereales; algunas especies de *Penicillium* producen podredumbres de espiga de maíz que se caracterizan por una proliferación de micelio sobre los granos y un aspecto pulverulento de color verdoso o verde azulado sobre la punta de la espiga. Al mismo tiempo, causa con ello una baja en la producción de carne y productos derivados para consumo humano, debido a que cuando los animales ingieren altas dosis de alimentos contaminados por hongos micotoxigénicos, disminuyen su salud e incluso llegan a la muerte, provocando así, severas pérdidas económicas (Santibáñez *et al.*, 2011; Presello *et al.*, 2004).

Durante el almacenamiento del maíz, *Penicillium* y *Aspergillus* contribuyen al deterioro de los granos y semillas; los cuales además son capaces de producir potentes micotoxinas que pueden afectar la salud humana y animal; siendo mutágenas, cancerígenas, teratógenas, inmunosupresoras, etc. (Méndez y Moreno, 2009).

La identificación tradicional de dichos hongos, basada en las características morfológicas, es laboriosa y requiere de conocimiento amplio para diferenciar las especies estrechamente relacionadas (Allende *et al.*, 2013). Por otro lado, el diagnóstico molecular es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para la detección fúngica con resultados confiables, el cual se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad y rapidez, ya que se logra identificar al patógeno sin necesidad de cultivarlo (Palomares *et al.*, 2007; Tamay *et al.*, 2013). En los últimos años se ha buscado estandarizar marcadores moleculares que faciliten la identificación de especies de importancia económica, por lo cual, se propone identificar molecularmente especies de *Penicillium*, lo cual ahorra tiempo y no necesita expertos en morfología de hongos, esto contribuirá en el conocimiento de otras especies de *Penicillium* que contaminan al maíz en México y que producen diversas micotoxinas como son el ácido oxálico, patulina, citrinina, etc.; que son altamente perjudiciales para los humanos y animales.

## **CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES**

## 1.1 CARACTERÍSTICAS DEL MAÍZ

#### 1.1.1 Origen del maíz

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida.» (FAO, 1993). El maíz constituye uno de los cereales de mayor importancia en la actualidad. Se trata de un cultivo de origen americano del que se tienen constancias arqueológicas que indican que ya era aprovechado por el hombre en el 2000-3000 a.C. Era conocido por los nativos desde Norteamérica a Sudamérica y también por los pueblos de islas del continente americano. Fue precisamente allí donde Colón lo encontró por primera vez y de donde se llevó a Europa a finales del siglo XV (Osca, 2001). El maíz es la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal. El origen y la evolución del maíz es un misterio, porque ha llegado a nosotros altamente evolucionado, sin que se conozcan formas intermedias (Asturias, 2004).

El ciclo de vida del maíz es semestral y la planta está dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada de la flor femenina (elote) y la masculina (espiguilla), que se encuentran en distintos lugares de la planta. Las panojas (mazorcas) son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), que producen de 300 a mil granos, que pesan entre 190 y 300 gramos cada mil granos. El peso depende de las distintas variaciones genéticas, ambientales y de cultivo; el grano constituye aproximadamente el 42 por ciento del peso seco de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado; el color depende de compuestos como carotenos y xantofilas, que se depositan o almacenan en diferentes estructuras del grano (Benítez *et al.*, 2006).

El maíz es una gramínea de producción mundial, cuya adaptabilidad permite su cultivo en más de 113 países. Entre sus principales usos se encuentran la alimentación humana, animal y producción de almidones; por otra parte, es un insumo para la elaboración de aceites, barnices, pinturas, caucho y jabones, entre otros. Principalmente, requiere desarrollarse en temperaturas medias de entre 25 y 30 grados centígrados; sin embargo,

puede resistir, por periodos cortos, temperaturas de hasta 8 grados centígrados. Se adapta a casi todos los tipos de suelo, siempre y cuando se pueda satisfacer su alta demanda de agua y horas de sol (Núñez, 2013).

### 1.1.2 Morfología

Los granos de maíz están constituidos principalmente de tres partes: la cascarilla, el endospermo y el germen (Fig. 1.1). La cascarilla o pericarpio es la piel externa o cubierta del grano, que sirve como elemento protector. El endospermo, es la reserva energética del grano y ocupa hasta el 80% del peso del grano. Contiene aproximadamente el 90% de almidón y el 9% de proteína, y pequeñas cantidades de aceites, minerales y elementos traza. El germen contiene una pequeña planta en miniatura, además de grandes cantidades de energía en forma de aceite, que tiene la función de nutrir a la planta cuando comienza el período de crecimiento, así como otras muchas sustancias necesarias durante el proceso de germinación y desarrollo de la planta (Asturias, 2004).



Figura 1.1 Partes principales del grano de maíz (García, 2013).

#### 1.1.3 Clasificación

El maíz pertenece al grupo de las gramíneas, que se caracterizan por producir un fruto recubierto o protegido, son plantas que pertenecen a la clase de las Angiospermas. El grano, llamada botánicamente cariópside, es monocotiledóneo. La cariópside está compuesta por el pericarpio (envoltura del fruto) y la semilla. Algunos cereales como la avena, el arroz y la cebada retienen a las glumas o envolturas florales después de la cosecha, razón por la cual se les denomina comúnmente granos recubiertos o revestidos. Al resto de los cereales se les denominan desnudos porque generalmente pierden las glumas (lema y palea) durante las operaciones comunes de recolección o cosecha (Serna-Saldívar, 2013). En el Cuadro 1.1 se muestra la clasificación de los principales tipos de maíces de acuerdo a sus propiedades funcionales.

Tipo de maíz	Características			
Amarillo	Maíces más producidos a nivel mundial que contienen alto contenido de pigmentos carotenoides en el endospermo. Son los maíces canalizados hacia la alimentación animal y preferidos por la industria refinadora de almidón.			
Blanco	Maíces con bajo contenido de carotenoides en el endospermo. La gran mayoría es canalizado hacia la industria alimentaria productora de harinas, botanas y pan.			
Maíz transgénico Bt	Maíz amarillo que contiene un gen sintético de <i>Bacillus thurigiensis</i> que expresa proteína con propiedades insecticidas especialmente contra lepidópteros. Más del 80% del maíz de los E.U.A. es transgénico Bt amarillo. Este maíz se utiliza para alimentación animal, obtención de almidón y para bioconvertirlo en etanol.			
Maíz transgénico con multivitaminas	Maíz recientemente desarrollado que contiene un paquete de genes que expresan cantidades importantes de vitamina A, C y ácido fólico. Aún no se siembra comercialmente.			
Azul y morado	Maíces con endospermo blanco y suave que posee alta pigmentación en la capa de aleurona que le da su apariencia azul/morada. Utilizado para la fabricación de botanas y otros platillos típicos.			
Dentado	La clase más abundante a nivel mundial debido a su alta productividad en el campo. Posee una hendidura en la corona de la cariópside y la característica forma dentada. La gran mayoría posee un endospermo amarillo y suave.			

Cuadro 1.1 Clasificación de los maíces con base en sus propiedades funcionales.

Cristalino	Maíces en forma esférica o lagrimal que no poseen una hendidura en la corona. Los granos son más pequeños y densos que los dentados. Son generalmente de textura vítrea y de color blanco o amarillo.			
Palomero	Maiz cristalino seleccionado por su poder de expansión. Son variedades que producen cariópsides pequeñas con una textura de endospermo casi totalmente cristalina o vítrea. Además, contienen un pericarpio grueso de color amarillo o blanco.			
Ceroso	Maíces generalmente dentados y amarillos, con bajo contenido de amilosa (0-5%), con una apariencia del endospermo cerosa utilizados por la industria refinadora de almidón. El almidón ceroso tiene propiedades funcionales contrastantes con el almidón procedente de endospermos normales.			
Alto en amilosa	Mutantes de maíces que poseen hasta 50% de amilosa. Todavía no se siembran comercialmente. Son altamente resistentes al cocimiento y podrían ser utilizados para la producción de algunos cereales de desayuno o botanas.			
Alto en lisina (opaco-2 o de alta calidad proteica)	Maíces desarrollados a partir del mutante opaco-2 que posee un endospermo suave con una menor proporción de prolaminas o zeínas. Contienen casi el doble de lisina y triptófano, primer y segundo aminoácido limitantes, que el maíz normal. Por consiguiente, poseen un mejor valor nutritivo para humanos y animales domésticos monogástricos. Existen variedades e híbridos que están siendo sembrados comercialmente en diferentes partes del mundo. Se prevee que se cultivaran cada día más debido al desarrollo de variedades e híbridos altamente productivos en endospermo de textura intermedia.			
Alto en aceite	Maíz desarrollado en Illinois, Estados Unidos para contener altas cantidades de aceite y mayor valor de energía digestible.			
Pozolero o cuzco	Maíces que producen cariópsides grandes y dentados, generalmente de color blanco, que poseen una textura de endospermo suave o harinosa. Son utilizados para la producción de botanas, pozole y otros platillos típicos.			

(Serna-Saldívar, 2013)

## 1.1.4 Composición química proximal del maíz

El principal constituyente de los cereales es el almidón. Está incluido en la fracción de extracto libre de nitrógeno (ELN) del análisis proximal. Otros carbohidratos como los mono, di y oligosacáridos también se incluyen dentro del ELN. Las proteínas son el segundo constituyente más abundante en el grano. El extracto etéreo está formado por aceite y otros compuestos liposolubles. Los lípidos en el grano se subdividen en polares y

no polares y se localizan principalmente en el germen. El maíz, el sorgo y el mijo perla son los cereales que contienen la mayor cantidad de estos compuestos. La avena es el único cereal que tiene cantidades significativas de lípidos en el endospermo (Serna-Saldívar, 2013).

La fracción denominada fibra cruda la constituyen aquellos carbohidratos estructurales que son insolubles. Las glumas, el pericarpio y paredes celulares del endospermo son ricos en fibra. Las cenizas son todo aquel material inorgánico conformado por minerales. La mayoría de los minerales están asociados con el pericarpio y la capa de aleurona (Serna-Saldívar, 2013).

El grano de maíz tradicional está compuesto por un 70 a 75% de almidón, 8 a 10% de proteína y 4 a 5% de aceite, contenidos en tres estructuras: el germen (embrión), el endospermo y el pericarpio. El germen constituye el 10 al 12% del peso seco y contiene el 83% de los lípidos y el 26% de la proteína del grano. El endospermo constituye el 80% del peso seco y contiene el 98% del almidón y el 74% de las proteínas del grano. El pericarpio constituye el 5 al 6% del peso seco e incluye todos los tejidos de cobertura exterior, con un 100% de fibras vegetales (Ustarroz *et al.*, 2010). En el cuadro 1.2 se observa la composición química proximal de algunas variedades de maíz, expresado en porcentaje.

Cereal	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN <sup>6</sup> (%)
Maíz					
Dentado	9.1	4.4	3.0	1.7	81.8
	8.1-11.5	3.9-5.8	2.4-3.5	1.4-2.0	77.2-84.2
Cristalino	11.1	4.9	2.2	1.7	80.1
	9.5-12.8	4.0-5.8	1.6-2.8	1.4-2.0	76.6-83.5
Palomero	12.1	5.2	2.3	1.8	78.6
	11.0-13.2	4.6-5.8	1.8-2.6	1.4-1.9	76.5-81.2
Dulce	13.2	4.6	2.7	2.3	77.0
	12.1-14.2	3.7-9.0	2.2-3.2	1.9-2.7	70.9-80.1

Cuadro 1.2 Composición química proximal de algunos tipos de maíces.

(Serna-Saldívar, 2013)

#### 1.1.5 Situación económica en México

El maíz es el principal cultivo en México, participa con el 18% del valor de producción del sector agrícola (88 mil mdp en 2012 y 78 mil en 2013) y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas). El volumen de producción de maíz en 2012 alcanzó 22.1 millones de toneladas y en 2013 se alcanzaron 22.7 millones. Mientras que la superficie de temporal ocupa el 74% de la superficie, aporta únicamente el 40% del valor generado. Todas las entidades del país presentan algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 64.5% del volumen de producción nacional. Sinaloa es el principal productor al concentrar el 16.5% del total. Le siguen en importancia Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero y Veracruz (Fig. 1.2 y Fig. 1.5) (FND, 2014).



Figura 1.2 Principales estados productores de Maíz en el 2012.

El 8% de la producción nacional corresponde a maíz amarillo, del cual México es deficitario e importa entre 7 y 10 millones de toneladas (Fig. 1.3). Nuestro país ocupa el 2° lugar con el mayor volumen de importaciones del grano internacionalmente, lo cual lo vuelve vulnerable ante cualquier alteración de la oferta mundial (FND, 2014).



Figura 1.3 Volumen de producción, importaciones y rendimiento correspondiente al maíz en México.

Las heladas y sequía en el año 2011 afectaron el volumen de producción de maíz en el país, lo que incrementó los precios a cerca del doble respecto al 2010. Sin embargo, las mejores condiciones climáticas durante el 2012 y 2013, han llevado a una recuperación en la producción nacional, lo que aunado al aumento en la producción mundial del cereal llevaron a un descenso en las cotizaciones durante 2013 (Cuadro 1.3 y Fig. 1.5). En el año 2014, se mantuvieron las buenas cosechas, por lo que no hubo ningún repunte significativo en los precios (Cuadro 1.3 y Fig. 1.4) (FND, 2014).

Producción de Maíz en México						
	Superficie	e (miles ha)	Volumen de	Rendi-	Precio medio	Valor de
Año	Sembrada	Cosechada	producción (miles ton)	miento (ton/ha)	rural (\$/ton)	producción (mdp)
2000	8,444.8	7,131.2	17,556.9	2.5	1,507.8	26,471.9
2001	8,396.9	7,810.8	20,134.3	2.6	1,451.1	29,216.4
2002	8,270.9	7,118.9	19,297.8	2.7	1,500.6	28,957.5
2003	8,126.8	7,520.9	20,701.4	2.8	1,618.0	33,495.1
2004	8,403.6	7,696.4	21,685.8	2.8	1,678.6	36,401.6
2005	7,978.6	6,605.6	19,338.7	2.9	1,577.9	30,515.1
2006	7,807.3	7,294.8	21,893.2	3.0	2,010.6	44,017.4
2007	8,117.4	7,333.3	23,512.8	3.2	2,442.0	57,417.9
2008	7,942.3	7,344.3	24,410.3	3.3	2,817.0	68,764.9
2009	7,726.1	6,223.0	20,142.8	3.2	2,802.1	56,441.2
2010	7,860.7	7,148.0	23,301.9	3.3	2,816.5	65,629.4
2011	7,750.3	6,069.1	17,635.4	2.9	4,077.8	71,913.9
2012	7,372.2	6,923.9	22,069.3	3.2	4,009.6	88,489.6
2013p	7,503.7	7,104.2	23,042.0	3.2	3,385.2	78,001.0
2014e	7,469.5	7,071.9	22,630.0	3.2	N/D	N/D
Fuente: SIAP - SAGARPA. /p Cifras preliminares /e Cifras estimadas						

Cuadro 1.3 Producción de maíz en México del año 2000 al 2014.

(FND, 2014)



Figura 1.4 Precio promedio del maíz en México 2009-2014.



Figura 1.5 Volumen y valor de producción de maíz por entidad en el año 2012.

#### **1.2 HONGOS**

Actualmente se considera que los hongos se encuentran repartidos en tres reinos: *Protozoa*, *Chromista (Straminipila) y Fungi*. De estos tres reinos solo *Fungi* está integrado exclusivamente por hongos, incluyendo cerca de 80,000 especies. Es en este reino donde se encuentran las especies que tienen importancia como productoras de micotoxinas (Soriano, 2007).

El reino *fungi* incluye cuatro divisiones: *Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota y Ascomycota.* Los hongos productores de micotoxinas se concentran en esta última división. Los tóxicos que producen pueden ser de distinta naturaleza química y generar diferentes síndromes (por ejemplo, psicotrópicos, hemolíticos, irritantes gástricos, etc.) pudiendo llegar a producir la muerte (Soriano, 2007).

La división *Ascomycota* incluye más de 30,000 especies y engloba a la gran mayoría de los hongos causantes de micotoxicosis. Un número reducido de estas especies se relaciona con intoxicaciones que se producen por la ingestión de alimentos o piensos contaminados por hongos microscópicos que sintetizan unas sustancias tóxicas que denominamos micotoxinas (Soriano, 2007).

Los ascomicetos requieren que el grano contenga un nivel de humedad demasiado alto (24 al 25%) para poder desarrollarse. Dichos hongos aparentemente mueren después de algunos meses durante el almacenamiento o se debilitan hasta un límite en que les es posible infectar a las semillas pero, al mismo tiempo, pueden manchar las semillas, matar a los óvulos, debilitar y destruir a los embriones, ocasionar arrugamiento de las semillas entre otros (Agrios, 1991). Además, pueden reproducirse asexual o sexualmente, pero la reproducción asexual es la más frecuente. Las esporas asexuales denominadas conidios se producen en las puntas de hifas modificadas, llamadas conidióforos.

#### 1.2.1 Hongos de campo

Los hongos de campo que predominan varían de acuerdo con la cosecha, localidad geográfica y el clima, pero en el trigo, maíz, arroz, cebada y avena, la mayoría corresponde a los géneros *Alternaria, Cladosporum, Hemilthosporum* y *Fusarium*. Los hongos de campo requieren para su desarrollo humedades relativas de 90 a 100% (Rebuffel, 1988). En la Figura 1.6 se muestra el ciclo de propagación de los hongos de campo a las mazorcas, los cuales sobreviven en la tierra y se propagan por medio del aire hasta infectar la espiga de maíz y los granos a través de lesiones.



Figura 1.6 Ciclo de la pudrición de mazorca por hongos (Araque y Venezuela, 2012).

#### 1.2.2 Hongos de almacén

Por lo general los granos y semillas una vez efectuada la cosecha son sometidos a secado para lograr un almacenaje en buenas condiciones y evitar la proliferación de los hongos de almacén que causan grave deterioro cuando éstos se guardan con altos contenidos de humedad. Los hongos de almacén son principalmente especies del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Los hongos de almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90%, condiciones de humedad muy frecuentes en el almacenamiento de granos (Rebuffel y Olavarría, 1989).

#### 1.2.2.1 Penicillium spp.

Hace ya más de 200 años Link (1809) introdujo el nombre genérico *Penicillium*, que significa 'cepillo', y se describieron las tres especies *P. candidum*, *P. glaucum* y el tipo genérico *P. expansum*. Desde entonces, se introdujeron más de 1.000 nombres en el género. Muchos de estos nombres no son reconocibles hoy porque contienen descripciones incompletas de acuerdo a los criterios modernos. El género actualmente contiene 354 especies aceptadas (Visagie *et al.*, 2014).

*Penicillium* es uno de los géneros de hongos más comunes que ocurre en una amplia gama de hábitats, desde el suelo, la vegetación, el aire y diversos productos alimenticios. Tiene una gran distribución mundial y un gran impacto económico en la vida humana. Su principal función en la naturaleza es la descomposición de materia orgánica, donde las diversas especies causan pudriciones devastadoras como patógenos en postcosecha de cultivos alimentarios (Frisvad y Samson 2004; Pitt y Hocking 2009; Samson *et al.*, 2010), así como la producción de una diversa gama de micotoxinas (Frisvad y Samson, 2004).

Algunas especies también tienen impactos positivos en la industria alimentaria para la producción de quesos como el Camembert o Roquefort. Su capacidad de degradación ha dado lugar a la revisión de otras especies para la producción de nuevas enzimas. Su mayor impacto y demanda es la producción de penicilina, que revolucionó enfoques médicos para el tratamiento de enfermedades bacterianas (Visagie *et al.*, 2014).

Las especies de *Penicillium* están tan extendidas y son tan cosmopolitas como las de *Aspergillus*. Son frecuentemente denominados mohos grises o azules, son capaces de producir esporas asexuales en cadenas que se originan a partir de una célula conidiogénica en forma de matraz, la fiálida (Wainwright, 1995).

La infección por *Penicillium* se produce en granos o leguminosas almacenadas a bajas temperaturas y con un contenido de humedad ligeramente por arriba del nivel normal, para el caso de granos de maíz un contenido de humedad superior al 13% (Agrios, 1991; FAO, 1993).

#### 1.2.2.2 Características de Penicillium

La mayoría de estas especies se les considera saprófitas, existiendo pocas que se aíslen rutinariamente como patógenas oportunistas. Estas especies forman colonias que crecen generalmente de manera rápida, están formadas por densas agrupaciones de conidióforos y la mayoría presentan coloraciones verdosas (Soriano del Castillo, 2007).

La textura de la colonia también es una característica importante (por ejemplo velutina o aterciopelada, lanosa, funiculosa, fasciculada o sinematosa) y depende de la posición de los conidióforos. La estructura de reproducción asexual característica de *Penicillium* es un conidióforo formado por una estípite diferenciada que finaliza en un penicilio o pincel. Este pincel puede estar formado por diversas estructuras que reciben nombres distintos según su localización y complejidad (métulas, ramas, etc.) y que sustentan en la parte más apical un conjunto de fiálides (Soriano del Castillo, 2007).

La forma de este penicilio determina la primera división taxonómica del género en cuatro subgéneros. Para determinar a qué subgénero pertenece un aislamiento, se debe contar el número de puntos de ramificación entre la fiálide (o cadena de conidios) y el estípite (Fig. 1.7) (Soriano del Castillo, 2007).



Figura 1.7 Nombres de las estructuras del conidióforo de *Penicillium* spp.

(Martínez, 2003).

#### 1.2.2.3 Penicillium spp.que atacan al maíz

El daño más frecuente es causado por *Penicillium oxalicum*, aunque en ocasiones puede haber otras especies asociadas. Muchas veces la infección está asociada con el daño causado por insectos en la mazorca (CIMMYT, 2004).

Un polvo de color azul-verdoso muy conspicuo crece entre los granos y sobre la superficie del olote (raquis) (Fig. 1.8). Los granos dañados por el hongo desarrollan un color amarillento y rayas visibles en el pericarpio (CIMMYT, 2004).



Figura 1.8 *Penicillium oxalicum* en olote y granos de maíz. (CIMMYT, 2004)

*Penicillium* spp. (*P. oxalicum*, *P. glaucum*) producen podredumbres de espiga que se caracterizan por una proliferación de micelio sobre los granos o entre ellos.

Generalmente aparece en la punta de la espiga y hace que esta adquiera un aspecto pulverulento de color verdoso o verde azulado (Presello *et al.*, 2004).

### 1.2.2.3.1 Penicillium oxalicum

*P. oxalicum* es una de las especies de mayor distribución y más ubicua de todos los *Penicillium*, aunque muestra una mayor preferencia por los climas cálidos también se ha encontrado en temperaturas de almacenamiento. Se considera un representante habitual de la microflora del suelo y ha sido aislado del maíz, arroz, sorgo, cebada, cacahuate, nueces, judías, semillas de soja, pimienta negra, cilantro y piensos para caballo; esta especie ha dado resultados positivos en la prueba de indol en estudios anteriores (Martínez, 2003; Vázquez, 2013). En el cuadro 1.4 se muestra su clasificación en el Reino Fungi de acuerdo a Pitt (1980).

*P. oxalicum* ha sido referenciado como productor de un amplio rango de polisacáridos y enzimas como pectinasas, glucanasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, quitinasas, galactanasas y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas. Además, puede producir metabolitos como ácido secalónico D, meleagrina, antiglutinina, oxacilina y ácido oxálico (Vázquez, 2013).

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Euascomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	Penicillium
Subgénero	Furcatum
Especie	oxalicum

Cuadro 1.4 Clasificación de *P. oxalicum* según Pitt (1980) Reino Fungi (Hongos verdaderos).

Posee típicamente penicilios biverticilados y asimétricos, estípites en su mayoría entre 200-400  $\mu$ m de largo, finas, paredes lisas, característicamente terminaciones en verticilios de 2-4 métulas, métulas 15, 25, (30)  $\mu$ m de largo, fiálides acerosas 10, 15, (20)  $\mu$ m con colula corta, conidios elipsoidales, muy largos, 3.5, 5, (7)  $\mu$ m de largo, con paredes lisas o finamente ornamentadas, columnas empaquetadas cerradas (Pitt y Hocking, 2009).

Las colonias en Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA) miden de 35-60 mm de diámetro, son planas o radialmente sulcadas, velutinas o ligeramente flocosas en áreas centrales; micelio usualmente inconspicuo, en áreas flocosas blanco o amarillo pálido, pero el crecimiento de la superficie esta coloreado de salmón; producción de conidios típicamente muy abundante, verde grisáceo en los márgenes, a continuación verde pálido u oliva hacia los centros, exudado limitado claro o ausente, reverso amarillo pálido, café, anaranjado o rosáceo. Las colonias en Extracto de Malta Agar (MEA) varían entre 20-50

mm de diámetro, son planas o ligeramente sulcadas radialmente, estrictamente velutinas, conidios muy abundantes con colores similares que en CYA a excepción del reverso algunas veces verdoso. Las colonias en Agar Nitrato Glicerol 25% (G25N) miden de 12-16 mm de diámetro, son planas o arrugadas, velutinas, micelio blanco o salmón, reverso pálido, verdoso, oliva o salmón. A 5 °C no hay germinación. A 37 °C, crecen colonias de entre 10-40 mm de diámetro, radialmente sulcadas profundas y centralmente rugosas, velutinas, micelio blanco, reverso oliva o café (Pitt y Hocking, 2009).

#### 1.2.2.3.2 Penicillium citrinum

Existen ciertos metabolitos cuya producción es ciertamente consistente para una especie, es decir, que la inmensa mayoría de cepas presentan capacidad de producirlos, con lo que parece adecuado asignarle un valor taxonómico a su detección.

La especie *P. citrinum*, de amplia distribución, elabora la micotoxina citrinina (CIT) por un gran número de sus cepas y además la produce en grandes cantidades. A esta especie se le relaciona con la aparición de niveles de CIT en arroz y maíz, así como en otros cereales y legumbres.

*P. citrinum* pertenece al subgénero *Furcatum* y se puede encontrar frecuentemente en maíz, soja, alimento para caballo, tierra, etc. (Martínez, 2003).

#### 1.2.2.3.3 Penicillium madriti

*P. madriti* es capaz de producir dos metabolitos secundarios llamados ácido penicílico y ácido orselínico (Birkinshaw y Gowlland, 1962).

#### 1.2.2.3.4 Penicillium rolfsii

*P. rolfsii* pertenece al Subgénero *Furcatum* y es capaz de producir Patulina. Se encuentra comúnmente en el suelo y frutos como la piña (Samson y Pitt, 2000).

#### 1.2.2.3.5 Penicillium miczynskii

*P. miczynskii* se encuentra comúnmente en piensos. Produce una micotoxina llamada citreoviridina (Cole, 1986).

#### 1.2.2.4 Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias producidas por ciertos hongos pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus, Fusarium* y *Penicillium*. Son altamente tóxicos, producen mutaciones (mutágenos), producen cáncer (cancerígenos), malformaciones en los fetos (teratógenos) y disminuyen la inmunidad (inmunosupresores). Debido a su gran variedad de efectos tóxicos, y sobre todo a su extrema resistencia al calor, la presencia de micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de los animales (Méndez y Moreno, 2009). Como se observa en el cuadro 1.5 el género *Penicillium* cuenta con un mayor número de especies micotoxigénicas (32), seguido por el género *Aspergillus* (15).

Cuadro 1.5 Principales géneros productores de micotoxinas y número de espec	ies
micotoxigénicas.	

Género	Especies micotoxígenas
Penicillium	32
Aspergillus	15
Fusarium	12
Byssochlamys	2
Stachybotrys	2
Trichoderma	2
Alternaria	1
Chaetomium	1
Paecilomyces	1
Rhizopus*	1

(Soriano, 2007)

\*El género *Rhizopus* pertenece a la división Zigomycota. El resto de géneros pertenecen a la división Ascomycota.

#### 1.2.2.5 Principales micotoxinas producidas por hongos del género Penicillium

#### 1.2.2.5.1 Ácido oxálico

El ácido oxálico y otros agentes nefrotóxicos pueden ser producto de *Aspergillus* y *Penicillium*. Producen daños tubulares y ocasionan signos y lesiones características de nefrosis tóxica tubular (Perusia y Rodríguez, 2001).

#### 1.2.2.5.2 Ácido secalónico D

Existen 6 tipos de ácidos secalónicos agrupados de la A a la G, siendo el D el más representativo de todos. Se ha aislado de otros géneros como *Aspergillus, Claviceps* y *Phoma*. Presenta toxicidad para ratas y ratones, y es posiblemente mutágeno. Se ha descrito como uno de los agentes causales de defectos en la fisura palatina. Es una micotoxina de almacenaje (Soriano, 2007).

#### 1.2.2.5.3 Ocratoxinas

Las ocratoxinas son consideradas una potente causa de enfermedades en el humano, que afectan el sistema nervioso (neurotóxicas) y pueden causar cáncer de riñón (nefrocancerígenas). Son producidas por hongos del género *Penicillium* como el *Penicillium verrucosum*, y algunas especies de *Aspegillus*. La mayoría de estos hongos producen principalmente ocratoxina A y raras veces ocratoxina B. Las ocratoxinas, son moléculas moderadamente estables y por tanto suelen resistir la mayoría de los procesos de elaboración de los alimentos. Se estima que la ingesta diaria de este tipo de micotoxinas en humanos se encuentra entre 0.7 y 4.7 nanogramos por kilogramo de peso corporal, de ella cerca del 50% es atribuida al consumo de cereales y sus productos derivados. La ocurrencia natural de la ocratoxina A (Fig. 1.9) es evidente en la mayoría de cereales como maíz, trigo, cebada, sorgo, arroz, avena y centeno. Los Estados Unidos y la Comisión Europea establecieron un límite máximo de tolerancia de 5 microgramos por kilogramo para los destinados al consumo humano y de 3 microgramos por kilogramo para los



Figura 1.9 Estructura química de la ocratoxina A (Ravelo et al., 2011).

#### 1.2.2.5.4 Toxinas tremorgénicas

Ocasionan temblores o contracciones involuntarias notables del cuerpo y una descarga excesiva de orina, seguidas de ataques convulsivos que a menudo ocasionan la muerte. Son producidas por especies tanto de *Aspergillus* como de *Penicillium* que infectan alimentos almacenados y los que se encuentran en refrigeración, así como a granos y productos obtenidos a partir de cereales. Los carneros, caballos y vacas al parecer son los animales domésticos que son afectados con mayor frecuencia por las toxinas tremorgénicas (Agrios, 1991).

### 1.2.2.5.5 Ácido penicílico

El ácido penicílico se describió por primera vez en 1913 en *P. puberulum*. Posteriormente se ha detectado en otra especies de *Penicillium (P. aurantiogriseum, P. roqueforti, P. janczewskii)*, entre otras. Se ha aislado de maíz comercial con un valor máximo de 230  $\mu$ g/kg y en algunos otros alimentos. Sin embargo, su presencia en alimentos no es muy alta probablemente debido a su inestabilidad, pues reacciona con diversos aminoácidos. Posee actividad antibiótica y herbicida, así como efectos hepatotóxicos y carcinogénicos. Presenta efecto sinérgico con la patulina y la ocratoxina A (Soriano, 2007).

#### 1.2.2.5.6 Patulina

La Patulina (PAT) (Fig. 1.10) es producida principalmente por *Penicillium expansum*, sin embargo, también la pueden producir especies de *Aspergillus*, *Paecylomyces* 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).



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

#### 1.2.2.5.7 Citrinina

La citrinina es producida especialmente por el hongo *Penicillium citrinum*, aunque se ha podido aislar de otras especies de *Penicillium* como el *P. expansum*, *P. lanosum*, *P. verrucosum* y especies de *Aspergillus*. En los años 30, cuando fue aislada, llamó la atención por su efecto antibacteriano, pero luego su potente efecto nefrotóxico, descartó su uso como antibiótico. Ha sido relacionada con la nefropatía porcina y aviar en diferentes países europeos (Blandon, 2010).

#### 1.2.2.5.8 Penitrems

Los penitrems son micotoxinas tremorgénicas (neurotoxinas). La neurotoxicosis que causan provoca temblores en animales de laboratorio. Existen diferentes tipos de penitrems; los primeros descritos fueron el penitrem A, penitrem B y penitrem C. El penitrem A (PEN A) es el más tóxico de los tres. Dicha micotoxina es producida por diversas especies de *Penicillium* como *P. crustosum* y sólo se produce a altos niveles de humedad (la a<sub>w</sub> mínima requerida para su producción es de 0,92 y la óptima alrededor de 0,95) (Martínez, 2003).

#### 1.2.2.5.9 Citreoviridina

La citreoviridina es una micotoxina producida por varias especies de hongos, especialmente del género "*Penicillium*". La ocurrencia de contaminación por esta toxina ha sido reportada en algunos alimentos, con mayor frecuencia en el arroz y el maíz, en países como Japón, Estados Unidos, Brasil, Corea y Bélgica. La Citreoviridina fue aislada por primera vez de

las investigaciones de la enfermedad de "arroz amarillo" que causaron el beriberi cardiaco en su mayoría jóvenes de Japón en la década de 1940. El beriberi se caracteriza por la deficiencia de tiamina (vitamina B1).

Los estudios toxicológicos han demostrado que citreoviridina causa parálisis de las extremidades, convulsiones, daño cardiovascular, paro respiratorio y paro cardíaco en animales de experimentación e inhibe difosfato de tiamina, lo que sugiere una relación con beriberi cardíaco (Wagner, 2014).

#### 1.2.3 Hongos de deterioro avanzado

Este grupo incluye aquellos que colonizan granos y otros productos alimenticios que han sufrido un deterioro biológico previo. Estos hongos proliferan en productos almacenados en altas humedades relativas superiores a 90%. Su característica biológica principal, es la de ser excelentes degradadores de materia orgánica. Este grupo puede invadir a los granos que han estado bajo pésimas condiciones de almacenamiento, condiciones que en ocasiones se inician en el campo; por ejemplo, cuando se dejan las mazorcas de maíz en las plantas en el campo o bien en las trojes o bodegas bajo condiciones de alta humedad, como es el caso del almacenamiento de grano forrajero a la intemperie (Moreno, 1988).

#### 1.2.4 Factores que influyen en el deterioro de alimentos por hongos

Cuando las condiciones ambientales son adecuadas los hongos son capaces de degradar todos los alimentos naturales y procesados. El principal factor intrínseco que gobierna la capacidad de llevar a cabo tal degradación es la actividad de agua del substrato (Aw), se define como la presión de vapor acuoso del substrato dividida por la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. La mayor parte de los hongos, pueden crecer a niveles de Aw de 0,8. Cuando se almacenan alimentos en presencia de una alta humedad, la toma de humedad sobre la superficie del alimento aumentará el nivel localizado del valor Aw en el cual el crecimiento del hongo será más rápido que bajo las condiciones óptimas de almacenamiento (Wainwright, 1995).

Otros factores que influyen son el pH y el potencial redox. Los hongos son generalmente tolerantes a las condiciones ácidas, mientras que el potencial redox es afectado por la tensión de oxígeno del medio ambiente. Aunque los hongos son considerados como organismos aerobios, muchos de ellos pueden crecer en condiciones de tensión de oxígeno baja. En tanto a temperatura los hongos pueden crecer en un rango de entre -15° a 45°C. La mayor parte de las esporas de mohos son destruidas por calentamiento durante 5 minutos a 65°C o 1 minuto a 80°C, aunque algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillum* resultan ser más resistentes (Wainwright, 1995).

Además, tienen una capacidad enzimática más amplia que la mayor parte de las bacterias y también pueden sintetizar sus propias vitaminas, lo que les permite crecer en ambientes que carecen de estos nutrientes esenciales (Wainwright, 1995).

#### 1.2.5 Métodos de Identificación de Hongos

La identificación tradicional de especies de hongos se basa principalmente en el aislamiento del microorganismo en medio de cultivo y la posterior observación de las características morfológicas (tamaño, conidios, conidióforos, micelios, etc.) (Ragazzo *et al.*, 2011). Esta metodología es laboriosa y requiere de conocimiento amplio para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas, sin embrago por el momento es el estudio más económico y rápido. Características como el tipo de esporas y las estructuras que las originan, y a la presencia o ausencia de reproducción sexual son utilizadas para definir los principales grupos de hongos. El estudio de la ontogenia de los anamorfos (fase asexual) y de los telemorfos (fase sexual) es básico en la identificación, principalmente en lo que se refiere a género y especie (Soriano, 2007) (Allende *et al.*, 2013).

Otra forma para clasificar e identificar este grupo de organismos es el estudio de sus características fisiológicas (crecimiento a diferentes temperaturas de incubación, asimilación de sustratos), bioquímicas (detección de actividades enzimáticas), del perfil de metabolitos secundarios (micotoxinas), etc., (Soriano, 2007).

Actualmente, en la identificación de microorganismos se están utilizando técnicas moleculares en las que se extraen ácidos nucleicos y después se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas basan su utilidad al explotar secuencias polimórficas dentro de los espacios internos transcritos (ITS1 e ITS2) del ADN ribosomal o secuencias únicas en el ADN (Allende *et al.*, 2013). Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables
en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular (principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones) (Tamay *et al.*, 2013).

La identificación precisa de los hongos fitopatógenos que se presentan en el campo o almacén, posibilita tanto la generación de información del rol ecológico de una especie determinada como las posibles consecuencias que potencialmente se pueden presentar y la manera de combatirlos (Ochoa *et al.*, 2007).

## 1.3 GENERALIDADES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

#### 1.3.1 Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa ha sobrepasado a otras técnicas de diagnóstico basadas en los ácidos nucleicos, debido a su simplicidad, sensibilidad, rapidez y especificidad (Palomares *et al.*, 2007).

Tras aislar el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) o el Ácido Ribonucleico (ARN) de las células, el siguiente paso es obtener miles o millones de copias de un gen determinado o fragmento de ADN. La multiplicación de los fragmentos de ADN puede realizarse *in vitro* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica por la que su creador, Cary Mullis, obtuvo el Premio Nobel, amplifica exponencialmente cualquier segmento de ADN de secuencia conocida. El componente clave de una reacción de PCR es el ADN de la polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*, un microorganismo adaptado a vivir y multiplicarse a muy alta temperatura. Esta polimerasa termoestable permite la replicación de cadenas en ciclos y produce un crecimiento geométrico del número de copias del ADN diana (FAO, 2010).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg+), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Todos estos elementos interactúan dentro de las tres etapas

principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempos necesarios no se modifiquen en cada uno de sus ciclos (Tamay *et al.*, 2013).

#### **1.3.2 Etapas de la PCR**

Un ciclo de PCR incluye tres pasos (Fig. 1.11):

- 1 Desnaturalización del ADN de 90 a 95 °C para separar el ADN en dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno y que posteriormente servirán de plantilla. La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de ADN y por lo tanto 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.
- 2 Hibridación de una pareja de oligonucleótidos de cadena única corta (cebadores) complementarios de las regiones diana que flanquean por ambos extremos el fragmento de interés de 45 a 65 °C aproximadamente; la temperatura y el tiempo requerido para la hibridación de los *primers* depende de la composición, tamaño y concentración de los *primers* amplificadores.
- 3 Extensión o elongación de las cadenas recién sintetizadas de ADN iniciada por los cebadores y facilitada por la Taq-Polimerasa, la cual lleva a cabo su acción insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde, esto se efectúa tradicionalmente a 72 °C. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima.

Dicho ciclo se puede repetir, normalmente unas 25 a 45 veces, para permitir la amplificación de suficientes amplicones (un fragmento de un gen o de ADN sintetizado usando la PCR) para que se puedan detectar (Cortazar y Silva, 2004; FAO, 2010).



Figura 1.11 Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Lawley, 2009).

#### **1.3.3 Marcadores Moleculares**

Los marcadores de ADN son útiles tanto en la investigación básica (p. ej., análisis filogenético y búsqueda de genes útiles) como en la aplicada (p. ej., selección asistida por marcador, pruebas de paternidad y trazabilidad de los alimentos) (FAO, 2010).

En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997) (FAO, 2010).

#### 1.3.3.1 ADN nuclear (nADN)

En eucariontes, la mayor parte de la información genética se encuentra contenida en el núcleo de la célula. El nADN se encuentra empaquetado y asociado a proteínas histonas, conformando los cromosomas. El nADN contiene regiones únicas (de una sola copia) y no únicas (duplicadas o regiones repetitivas). Se considera que los organismos diploides tienen dos copias de cada región genética (locus) en los pares homólogos de los cromosomas, llamadas alelos, sin tener en cuenta si contienen regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones o regiones intergenicas) (Stansfield, 1992).

#### **1.3.3.2 ADN mitocondrial (mtADN)**

Los polimorfismos del ADN mitocondrial (mtADN) se han utilizado ampliamente en análisis filogenéticos y de diversidad genética. El mtADN haploide, contenido por las mitocondrias en el citoplasma celular, presenta un modo materno de transmisión (los individuos heredan el mtADN de sus madres), así como una alta tasa de mutación; no se recombina. Dichas características permiten a los biólogos reconstruir relaciones evolutivas dentro de una especie y entre distintas especies valorando las pautas de mutación del mtADN (FAO, 2010).

#### 1.3.3.3 ADN ribosomal (rADN)

El rADN puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo. Contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El rADN se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18 rADN, 5.8 rADN y 28 rADN), separadas por dos espaciadores con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica. Estas secuencias, por la baja tasa de sustitución que presentan, son extremadamente útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas de taxa con tiempos de divergencia muy antiguos (Eguiarte *et al.*, 2007).

#### 1.3.4 Análisis del producto de PCR (Electroforesis en gel)

El análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR, se pueden llevar a cabo por medio de la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida. Este método permite separar estos fragmentos de acuerdo a su tamaño de cada uno, el cual se puede estimar usando fragmentos de ADN marcador como referencia. Tanto la agarosa como la acrilamida forman una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por lo cual obligamos a pasar a 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 (P). Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red, 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 (Fig. 1.12) (Eguiarte *et al.*, 2007).

La agarosa se usa en el análisis de moléculas de varios cientos hasta 20 000 pares de bases, en tanto que la poliacrilamida se usa para fragmentos de ADN más pequeños. El ADN se observa usando luz UV después de teñirlo con bromuro de etidio (Scragg, 2005).



Figura 1.12 Esquema de la técnica de electroforesis (Rogers, 2015).

En la Figura 1.12 se muestra una cámara de electroforesis con sus componentes principales como lo son el electrodo negativo y el electrodo positivo, la solucion TAE, el gel el cual puede ser de agarosa o de acrilamida con sus respectivos pozos en donde se van a inyectar los productos de PCR junto con los reactivos necesarios para llevar a cabo la electroforesis. Cuando esta se somete a corriente eléctrica las moléculas comienzan a migrar del polo negativo hacia el polo positivo, quedándose unas bandas o amplificados a lo largo del camino dependiendo de su peso molecular, las más pesadas se van quedando atrás mientras que las menos pesadas van avanzando hasta llegar a su peso molecular correspondiente.

## **CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

#### 2.1 JUSTIFICACIÓN

Uno de los daños más frecuentes en los granos de maíz almacenados en condiciones no apropiadas es el causado por los hongos del género *Penicillium*, en especial la especie *Penicillium oxalicum*, desarrollándose un color amarillento en los granos disminuyendo su calidad y valor como producto. No obstante, este no es el único problema relacionado con la presencia de hongos sobre los granos de maíz, sino también la capacidad que tienen de producir diversas micotoxinas como el ácido oxálico altamente tóxico y considerado de alto riesgo para la salud humana y de animales.

Es de vital importancia el control de la calidad de los granos almacenados, ya que el maíz es uno de los insumos más importantes para el consumo de la población mexicana. Por lo cual, la oportuna detección e identificación de *Penicillium oxalicum* y de otras especies de *Penicillium* causantes de pudrición y además productoras de micotoxinas es imprescindible para su posterior evaluación en cuanto a su potencial patogénico en poscosecha.

Para esto existen diversos métodos de identificación de especies de hongos, desde el método tradicional que se basa principalmente en el aislamiento del microorganismo en medio de cultivo y la posterior observación de las características macro y micromorfológicas; este método resulta un tanto laborioso y requiere de un conocimiento amplio para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. Y otros métodos utilizados actualmente, como las técnicas moleculares en las que se extraen ácidos nucleicos y después se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ayuda de *primers* específicos y/o universales, estas técnicas suelen tener ciertas ventajas como rapidez y alta especificidad siempre y cuando la técnica se encuentre previamente estandarizada.



Figura 2.1 Cuadro metodológico del desarrollo experimental.

#### 2.2.1 Descripción del Cuadro Metodológico

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las especies del género *Penicillium* en granos de maíz (*Zea mays* L.) por medio de su identificación morfológica y molecular a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, para confirmar la presencia de este hongo.

#### **OBJETIVO PARTICULAR 1**

Aislar la micobiota presente en diferentes muestras de granos de maíz, por el método de siembra directa en placa-agar para obtener las especies de *Penicillium* spp.

#### **OBJETIVO PARTICULAR 2**

Obtener cultivos monospóricos de las especies de *Penicillium* aisladas, para determinar las características macro y micro morfológicas de los hongos presentes en las muestras, utilizando claves especializadas que permitan identificarlos hasta especie.

#### **OBJETIVO PARTICULAR 3**

Extraer el ADN de las cepas monospóricas del género *Penicillium* por medio del método de Sambrook y por el KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food para su posterior identificación molecular.

### **OBJETIVO PARTICULAR 4**

Realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa con *primers* específicos diseñados por medio de programas bioinformáticos, para confirmar las especies de *Penicillium* que se identificaron morfológicamente.

#### **2.3 MATERIAL**

#### 2.3.1 Biológico

Muestras de diferentes variedades de maíz de diferentes regiones de México proporcionadas por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas, (UNIGRAS).

- 1. GTO 265
- 2. H469
- 3. (Carolina 2014) Maíz blanco dentado, cosecha 2014
- 4. GTO-2
- 5. AN 447
- 6. 14 "Pablo Alvarez"
- 7. 15 Jalisco "Pablo Alvarez" Ixtlahuacan
- 8. Juan de Grualua "Leonel Hdz"
- 9. Carmen Tonampal "Leonel Hdz"
- 10. Flores Magon "Leonel Hdz"
- 11. INIFAP
- 12. S/ACOMEX CHINA, CAMPECHE
- 13. Dzitbalche "Leonel Hdz"
- 14. EL PUY "Leonel Hdz"
- 15. Hecelchacan, Maíz blanco "Leonel Hz"
- 16. Guadalupe Victoria, Maíz blanco "Leonel Hdz"
- 17. Laja tendida, Maíz blanco "Leonel Hdz"
- 18. # 368
- 19. S/ACOMEX, Maíz blanco a granel, Tixmucuy/Campeche
- 20. Chavinda "Pablo Alvarez" MICH-2
- 21. Paraíso de Grijalva, Maíz blanco "Leonel Hdz"
- 22. Chicomuselo CHIS-2
- 23. Ahualulco "Pablo Alvarez" Jal-1
- 24. BASTION "Pablo Alvarez" GTO-2
- 25. Guaracha "Pablo Alvarez" MICH-1

## 2.3.2 Reactivos

A. Cultivos Monósporicos

- Cloro 3%
- Solución tween al 0.05%
- Medios de cultivo PDA, CYA, MEA, G25N, CZAPEK
- Azul de algodón
- Reactivo de Ehrlich
- B. Extracción de ADN por el método de Sambrook
  - Agua desionizada con un pH=7
  - Solución de lisis (Tris base 50 mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
  - Enzima Proteinasa K (20mg/mL)
  - Mezcla Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (12:24:1)
  - Etanol frío 70%
- B.1. Extracción de AND con el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food
  - Buffer de lisis A y B
  - RNAsa A
  - Solución de precipitación
  - MagneSil<sup>TM</sup>PMPs
  - Isopropanol
  - Etanol frío70%
  - Agua libre de nucleasas
  - C. Cuantificación
    - Agua libre de nucleasas
  - D. PCR
    - Kit para PCR, Promega:
      - Master Mix (50 unidades de Taq ADN polimerasa,400 µM de cada dNTP y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>)
    - Agua libre de nucleasas

#### E. Electroforesis

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

## 2.3.3 Equipo

- A. Cultivos monospóricos
  - Autoclave FAMSA, Modelo HGER
  - Campana de flujo laminar, Precision Scientific
  - Estereoscopio, Olympus
  - Microscopio compuesto, Olympus
  - Incubadora, Precision Scientific
- B. Extracción de ADN por el método de Sambrook
  - Tubos Eppendorf
  - Micropipetas, Rainin
  - Agitador Vortex, Genie K-55-G, 120 Volts
  - Incubadora Eppendorf, Thermomixer compact
  - Microcentrífuga, FORCE MINI y MiniSpin plus Eppendorf
- B.1. Extracción de ADN con el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food
  - Tubos Eppendorf
  - Micropipetas, Rainin
  - Agitador Vortex, Genie K-55-G, 120 Volts
  - Incubadora Eppendorf, Thermomixer compact
  - Microcentrífuga, FORCE MINI y MiniSpin plus Eppendorf
  - Magne Sphere Magnetic Separation Stand

- C. Cuantificación
  - Micropipetas, Rainin
  - Espectrofotómetro, Accesolab NanoDrop ND-1000 A113
  - Computadora

### D. PCR

- Micropipetas, Rainin
- Tubos Eppendorf
- Termociclador, Apollo instrumentation ATC 401
- Termociclador, Thermo SCIENTIFIC ARKTIK

### E. Electroforesis

- Cámara de electroforesis Apollo 75.710
- Fuente de poder, Bio Rad Power Pac 1000
- Balanza analítica electrónica, VELAB Balances
- Horno de microondas, Concave Reflex System MIRAGE JMI-010
- Parafilm
- Micropipetas, Rainin
- Transiluminador UV, Clavel Scientific LTD
- Equipo de fotografía para luz UV, Kodak digital Science

## 2.4 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

2.4.1 Obtención de aislamientos de *Penicillium* spp. en semillas de maíz desinfectadas superficialmente.

#### 2.4.1.1 Desinfección de muestras de maíz.

- 1. Se colocaron aproximadamente 50 granos de maíz de cada muestra en frascos de vidrio.
- Se adicionaron 50 mL de hipoclorito de sodio al 3% en cada frasco y se agitaron 1 o 2 minutos para desinfectar la semilla como se observa en la Figura 2.2.
- 3. Se decantó la solución de cloro y se escurrieron perfectamente los granos sobre papel estéril para su posterior manipulación.



Figura 2.2 Desinfección de granos de maíz.

### 2.4.1.2 Siembra directa en placa-agar

- Las muestras de semillas desinfectadas superficialmente se colocaron en grupos de 15 en cajas de Petri con medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) (Fig. 2.3).
- 2. Se realizaron triplicados de cada una de las 25 muestras.
- 3. Se trabajó en campana de flujo laminar en condiciones de asepsia.
- Las cajas con las semillas se incubaron de 25-32 °C durante 3, 7 y 15 días, hasta el desarrollo de la micobiota.



Figura 2.3 Siembra de semillas. a) siembra de maíz en campana de flujo laminar con alto grado de esterilización. b) semillas sembradas en medio de cultivo PDA.

#### 2.4.1.3 Aislamiento de micobiota

Una vez que se desarrollaron las colonias de hongos en las cajas Petri, se aislaron los hongos con las características del género *Penicillium* de los granos contaminados en medios de cultivo de PDA. Esto se verificó en el estereoscopio y en el microscopio compuesto. La metodología fue la siguiente:

- 1. Se trabajó en condiciones de esterilidad.
- 2. Para obtener aislamientos puros, en una caja con medio del cultivo PDA se inoculó el hongo con ayuda de una aguja de disección, marcando cinco puntos (Fig. 2.4).



Figura 2.4 Aislamiento de colonias de *Penicillium* spp. a) Aislamiento de especies de *Penicillium* a partir de las micobiotas desarrolladas. b) Inoculación de los hongos en medio de cultivo PDA.

#### 2.4.1.4 Cultivos monospóricos

Una vez que se aislaron los hongos de interés en medios de cultivo PDA se procedió a la elaboración de cultivos monospóricos para conseguir la homogeneidad genética y proceder a la identificación a nivel de especie de los hongos *Penicillium* seleccionados anteriormente.

Método de diluciones. Consistió en diluir una suspensión de esporas lo suficiente para obtener una concentración mínima de esporas separadas individualmente por acción del detergente tween 20; de modo que las colonias formadas en la caja provenían de un solo conidio.

El procedimiento se describe a continuación:

- 1. Se trabajó en condiciones estériles.
- Se procedió a realizar un corte circular con ayuda de un sacabocados en el medio de cultivo con el hongo seleccionado.
- Posteriormente en una gradilla se prepararon tubos eppendorf esterilizados y con solución tween 20 al 0.05% con 1000μL en el primer tubo y 900 μL en tres tubos más, haciendo un total de 4 tubos.
- Se colocó el explante de la colonia en el primer tubo, se cerró y se etiquetó. Despúes se agitó en vórtex durante 1 minuto.
- 5. Con ayuda de una micropipeta se tomaron 100 µL de solución de este primer tubo y se pasaron al segundo tubo, agitando en el vórtex durante 1 minuto más y así sucesivamente hasta realizar las cuatro diluciones.
- Despúes se tomaron 50 μL de la última dilución y se colocaron en una caja Petri con PDA, dispersándolos por toda la caja.
- Las cajas se incubaron a 25 °C durante 24 horas aproximadamente, hasta la germinación de esporas.
- Con ayuda de una aguja de disección se tomó una de las pequeñas colonias crecidas; y se inoculó en una caja Petri con PDA.
- 9. Se repitió este procedimiento con cada una de las cepas de cada muestra, teniendo cuidado y evitando la contaminación de las colonias con otros hongos.

10. Finalmente, se incubaron cada una de las cajas Petri a 25 °C durante 7 días para su desarrollo y crecimiento.

#### 2.4.2 Macromorfología

Para la determinación de la macromorfología de las especies de *Penicillium* se utilizaron los cultivos monospóricos, los cuales fueron resembrados en diferentes medios de cultivo para su caracterización morfológica.

- 1. Se prepararon los medios de cultivo CYA, MEA, CZAPEK y G25N.
- 2. Posteriormente se resembraron estos medios con cada hongo de interés en tres puntos equidistantes.
- 3. Las cajas Petri con las resiembras se incubaron a 25 °C durante 7 días, para permitir su desarrollo y crecimiento adecuado.
- 4. Adicionalmente cajas de Petri con CYA, se incubaron a 5 °C y 37 °C respectivamente para observar si hay o no crecimiento de las colonias.

#### 2.4.2.1 Características macromorfológicas

A los 7 días de desarrollo de los hongos, se procedió a la observación y fotografía del anverso y reverso de cada colonia; se midieron los diámetros de las colonias con ayuda de un Vernier y se registraron por escrito algunas de sus características morfológicas como son: textura, profundidad, densidad, presencia o ausencia de exudados, presencia o ausencia de pigmentos solubles.

Para determinar la coloración de cada una de las colonias por ambos lados, se tomó como referencia una gama de colores Pantone, la cual se puede consultar en la siguiente liga <u>http://www.instaladoresonline.com/colores\_pantone.html</u>

### 2.4.2.2 Reacción de Ehrlich

Los aislamientos fueron examinados para la producción de ácido ciclopiazónico y otros alcaloides por medio de la reacción de Ehrlich utilizando el método de papel-filtro (Frisvad y Samson, 2004). El reactivo de Ehrlich se compone de 2 g de 4-dimetilaminobenzaldehído, 85 mL de etanol al 96% y 15 mL de HCl 10 N. A partir de una colonia en CYA incubada 14 días a 25 °C, se tomó del centro un explante circular de 8 mm de diámetro. Se tomó un papel filtro de un poco más de 1 cm de longitud de cada lado y se

colocó húmedo con el reactivo sobre cada explante como se observa en la Fig. 2.5 a, b y c. Si aparece un anillo color violeta de 6-30 minutos después quiere decir que el cultivo contiene ácido ciclopiazónico o alcaloides relacionados. Algunos hongos producen alcaloides que reaccionan con el reactivo de Ehrlich y dan como resultado anillos de color rosa a rojo o amarillos.



Figura 2.5 Reacción de Ehrlich.

## 2.4.3 Micromorfología

La determinación de las características micromorfológicas de las especies de *Penicillium* se realizó por medio de la técnica de Ridell (Micro-cultivos) de la siguiente manera:

1. Se cortaron cuadros de MEA de una caja Petri de 1cm de lado y 3mm de espesor con un bisturí estéril y caliente como muestra la Figura 2.6 a y b.



Figura 2.6 Cuadros de MEA de 1 cm x 3 mm.

 Se colocó el cuadro de MEA en un portaobjetos que estaba sobre una varilla de vidrio doblada en forma de "V" en una caja Petri (previamente esterilizada) (Ver Fig. 2.7 a, b y c.



Figura 2.7 MEA sobre varilla de vidrio y portaobjetos.

- 3. Se tomó con el asa el inóculo del hongo previamente seleccionado.
- 4. Se inocularon por picadura en cada uno de los lados del cuadro de MEA como se muestra en la Figura 2.8 a y b.



Figura 2.8 Inoculación por picadura de Penicillium sobre MEA.

5. Se colocó sobre el MEA un cubreobjetos estéril y se presionó ligeramente para que se adhiriera al medio de cultivo de acuerdo con la Figura 2.9.



Figura 2.9 Cubreobjetos sobre MEA inoculado con Penicillium.

 Posteriormente se adicionaron 5 ml de glicerol al 10% en la caja Petri (Figura 2.10 a y b).



Figura 2.10 Adición de Glicerol al 10% como nutriente.

- 7. Se incubó la caja a 25 °C durante 7 días.
- 8. Pasados estos 7 días ya se puede identificar el hongo, se procedió a retirar el glicerol con una micropipeta.
- 9. Se desprendió con cuidado el cubreobjetos que se encuentra sobre el cuadro de MEA y se colocó sobre un portaobjetos nuevo que contenía una gota de azul de algodón, se selló la preparación con barniz de uñas transparente como se observa en la Figura 2.11.
- 10. Se observaron las preparaciones a 10X, 20X y 40X sobre el microscopio. Se realizaron las mediciones correspondientes de 30 estructuras fúngicas por cada cepa. Tomando en cuenta cada una de las partes como su estípite, métulas, fiálides, conidios, etc. y se realizó un cuadro comparativo para poder identificar las especies por medio de claves morfológicas.
- Se utilizaron las claves de identificación de hongos de Pitt (1979) y Pitt y Hocking (2009).



Figura 2.11 Preparaciones con azul de algodón de las especies de Penicillium.

## 2.5 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

#### 2.5.1 Selección de primers

Se seleccionó la secuencia del gen Cct8 componente putativo del complejo de chaperoninas TCP-1 reportada en Houbraken y Samson, (2011) para la identificación de la especie *Penicillium oxalicum*, con número de acceso (GenBank JN121944). Posteriormente con esta secuencia se diseñaron los *primers* en el programa de PrimerQuest.

-primer frontal CTACCTCAACCGCTTCAACA

-primer reverso TGCGAGGAATCACCTCAAAG

Se propuso el uso de  $\beta$ -tubulina (Bena) y de Calmodulina (CaM) como marcadores de identificación secundaria de las especies de *Penicillium* spp., tomados de Visagie *et al.* (2014).

Para  $\beta$ -tubulina:

-primer frontal Bt2a GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC

-primer reverso Bt<sub>2</sub>b ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC

Para Calmodulina:

-primer frontal CMD5 CCGAGTACAAGGARGCCTTC

-primer reverso CMD6 CCGATRGAGGTCATRACGTGG

#### 2.5.2 Extracción de ADN por método de Sambrook

Para la extracción del ADN de las especies aisladas de *Penicillium*, se empleó el protocolo propuesto por Sambrook. Este protocolo se basa en la disolución del tejido de la muestra usando detergentes y proteinasa, la extracción de proteínas y polisacáridos con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, seguido por la precipitación de ADN con etanol frío.

A continuación se describe la metodología de Sambrook (2001) con algunas modificaciones:

Disgregación de la muestra.

- 1. Con la ayuda de un mortero, se trituró la muestra.
- 2. Se pesaron  $125 \ \mu g$  de la muestra en un tubo Eppendorf.
- 3. Se adicionaron 1250 µL de solución de lisis.
- Se agitó el tubo con vórtex hasta visualizar pedazos más pequeños y una mezcla homogénea.
- 5. Se adicionaron 7 µL de enzima Proteinasa K previamente concentrada a 20mg/mL.
- 6. Se mezcló el tubo varias veces suavemente.
- Se incubaron los tubos con las muestras a 50 °C en Thermomixer compact por 2 horas.
- Se desactivó la enzima elevando y manteniendo la temperatura en el Thermomixer compact a 60 °C durante 1 hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos.

- 9. Se adicionó al tubo que contenía la muestra, 0.25 mL de la mezcla fenolcloroformo-alcohol isoamílico.
- 10. Se mezcló el tubo varias veces suavemente.
- 11. Se centrifugó el tubo a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se separaron las fases, y se recuperó la fase acuosa superior que contiene el ADN.
  Es importante evitar recuperar cualquiera de las otras fases presentes.
- Se trasladó la fase recuperada a 2 tubos Eppendorf nuevos (aproximadamente 500 μL en cada tubo).

Precipitación de ADN.

- 14. Se adicionaron 1000 µL de etanol frío a cada uno de los 2 tubos con la muestra.
- 15. Se mezclaron los tubos suavemente.
- 16. Se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 17. Se decantó el etanol y se dejaron secar en la incubadora a 37 °C. El ADN se visualizó pegado al tubo como una mancha blanca.

18. Una vez eliminado el etanol, se adicionaron al tubo 50 µL de agua libre de nucleasas para resuspender el ADN. Se agitó suavemente el tubo hasta su completa disolución.

# 2.5.3 Extracción de ADN por KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food.

Para la extracción del ADN de las especies aisladas de *Penicillium*, se empleó también el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. Este Kit tiene entre sus ventajas, evitar el uso de incubaciones largas de la proteinasa K, el uso de solventes orgánicos peligrosos como el cloroformo, entre otras. Está diseñado para la purificación de ADN de una gran variedad de alimentos desde 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 200 mg del hongo en un tubo eppendorf de 2 mL.
- 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 del hongo.
- Se adicionaron 5 µL de RNAsa, se cerró el tubo y se agitó vigorosamente con el vórtex.
- 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).
- 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.
- 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.
- 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 μL 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.
- 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 μL de agua libre de nucleasas, se mezcló en el vórtex 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.

#### 2.5.4 Cuantificación del 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 (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta (también puede hacerse en el intervalo visible). 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. 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 (Querci, 2007).

A continuación se describe el método para la cuantificación del ADN por espectrofotometría:

 Se accesó en la computadora al programa de NanoDrop, seleccionando la opción para ácidos nucleicos.

- Se calibró el equipo (Accesolab NanoDrop ND-1000 A113) con 2 μL de agua libre de nucleasas.
- 3. Se limpió el lector y se colocaron nuevamente 2  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para registrarlo como blanco.
- 4. Se limpió el lector y se adicionaron 2  $\mu$ L de la muestra de ADN a cuantificar y se tomó la lectura de las muestras.
- Se registraron los datos proporcionados por el programa en cuanto a la concentración de ADN en una relación de 260nm/280nm, que debe ser aproximadamente cercana a 1.8.

## 2.5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La preparación de las muestras para llevar a cabo la reacción se realizó de acuerdo con el protocolo que precisa el kit de PCR (Promega) y los *primers* frontal y reverso los cuales deben de ser hidratados previamente con agua libre de nucleasas.

A continuación se describe brevemente el protocolo que se siguió para llevar a cabo la amplificación de ADN por medio de la PCR. Los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción se observan en el cuadro 2.1 para cada muestra.

Componente	Volumen (µL) 1x
Master Mix	12.5
Primer Frontal	0.5
Primer Reverso	0.5
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	10.5
ADN (50ng/µl)	1

Cuadro 2.1 Componentes de la PCR, para un volumen de reacción de 25 µL.

- Se agregó a cada tubo los componentes de la PCR que se indican en el cuadro 1.5. Se adicionó la cantidad de ADN de la muestra correspondiente, excepto al "blanco" y se etiquetó cada uno.
- 2. Se colocaron en la microcentrífuga los tubos con las muestras y se llevaron al termociclador posteriormente.

 Se programó el termociclador de acuerdo a las condiciones establecidas para cada uno de los *primers*. En el cuadro 2.2 se observan las condiciones correspondientes a los *primers* diseñados para *P. oxalicum*, y en el cuadro 2.3 las condiciones correspondientes para los *primers* de Calmodulina y β-tubulina.

Etapa	Paso	Temperatura(°C)	tiempo (seg)		
Desnaturalización	1	94	120		
	1	94	30		
Alineación	2	56	45		
	3	72	45		
Extensión	1	72	300		
	2	4	x		

Cuadro 2.2 Condiciones de PCR para los primers de P. oxalicum.

Cuadro 2.3 Condiciones de PCR para los *primers* de Calmodulina y β-tubulina.

Etapa	Paso	Temperatura(°C)	tiempo(seg)		
Desnaturalización	1	94	300		
	1	94	45		
Alineación	2	55	45		
	3	72	60		
Extensión	1	72	300		
	2	4	œ		

Una vez programados los termocicladores se llevaron a cabo las PCR correspondientes a cada uno de los *primers* utilizados para obtener las amplificaciones del ADN de interés y posteriormente poder llevar a cabo su análisis.

#### **2.5.6 Electroforesis**

Para llevar a cabo el análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR, se realizaron por medio de la electroforesis con geles de agarosa que sirven para tamaños de moléculas grandes desde 50 pb hasta unas 40 Kb (Cornejo *et al.*, 2014). La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

Preparación del gel de agarosa y carga de muestras.

- 1. Se preparó el gel de agarosa a una concentración de 1% en solución TAE 1X.
- 2. Se dejó enfriar lo suficiente y se le agregó una gota de Bromuro de etidio.
- 3. Se selló perfectamente la caja para el gel y se vertió la solución lentamente para evitar la formación de burbujas.
- 4. Se colocaron los peines, y se dejó solidificar el gel.
- 5. Se retiraron los peines y se cubrió la cámara para electroforesis con TAE 1X.
- 6. Se colocaron sobre el parafilm 4  $\mu$ L de muestra de ADN, 3  $\mu$ L de Bromuro de etidio diluido y 3  $\mu$ L de buffer de carga blue/orange.
- 7. Se mezclaron los 3 reactivos con ayuda de una micropipeta.
- Se transfirió la muestra homogeneizada a uno de los pozos del gel de agarosa (a partir del pozo 3). Se repitió el mismo procedimiento con el resto de las muestras.
- En el carril 2 se colocaron 4 μL del blanco más 3 μL de Bromuro de etidio diluido y 3 μL de buffer de carga blue/orange.
- 10. Y en el carril 1 se cargaron 2  $\mu$ L del marcador molecular más 3  $\mu$ L de Bromuro de etidio diluido y 3  $\mu$ L de buffer de carga blue/orange.
- Se tapó la cámara de electroforesis y se conectaron los electrodos, posteriormente se encendió la fuente de poder y se programó en 90 V aproximadamente durante 40 minutos.

Visualización con luz UV.

 Se colocó el gel dentro del transiluminador de luz UV y se visualizaron los fragmentos. Se capturaron las imágenes con la cámara fotográfica Kodak digital Science.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

# 3.1 Identificación morfológica de la micobiota presente en granos de maíz en medio de cultivo PDA

Para la identificación de los hongos presentes en los granos de maíz analizados, se consideró la macro y micromorfología de las colonias presentes en las micobiotas desarrolladas en medio de cultivo PDA. Cada una de las cepas fue analizada y se identificó hasta nivel de género (Figura 3.1 a, b, c, d y e) con las claves de Barnett y Hunter (1998).





Figura 3.1 Micobiota desarrollada en distintas muestras.

A continuación en el cuadro 3.1 se presenta la frecuencia de cada género presente en las micobiotas de las 25 muestras de maíz.

	Fusarium			Aspergillus			Eurotium			Penicillium		
*Xi	Frecuencia absoluta (ni)	Frecuencia relativa (fi=ni/N)	Frecuencia relativa (fi=ni/N) en %									
1	44.44**	0.075	7.491	0	0	0	0	0	0	24.44	0.579	57.895
2	15.56	0.26	2.622	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	33.33	0.056	5.618	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2.22	0.004	0.375	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	31.11	0.052	5.243	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	15.56	0.026	2.622	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	33.33	0.056	5.618	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	20	0.034	3.371	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	26.67	0.045	4.494	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	51.11	0.086	8.614	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	17.78	0.030	2.996	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	8.89	0.015	1.498	20	0.409	40.909	11.11	0.192	19.231	0	0	0
13	11.11	0.019	1.873	6.66	0.136	13.636	0	0	0	6.667	0.158	15.789
14	40	0.067	6.742	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	6.67	0.011	1.124	11.11	0.227	22.727	15.55	0.269	26.923	2.222	0.053	5.263
16	26.67	0.045	4.494	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	35.56	0.060	5.993	4.44	0.091	9.091	2.22	0.038	3.846	0	0	0
18	11.11	0.019	1.873	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	28.89	0.049	4.869	2.22	0.045	4.545	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.444	0.105	10.526
21	26.67	0.045	4.494	4.44	0.091	9.091	0	0	0	0	0	0
22	68.89	0.116	11.610	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	15.56	0.026	2.622	0	0	0	13.33	0.231	23.077	0	0	0
24	15.56	0.026	2.622	0	0	0	15.55	0.269	26.923	4.444	0.105	10.526
25	6.67	0.011	1.124	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	N=593.33	1	100	48.89	1	100	57.78	1	100	42.22	1	100

Cuadro 3.1 Frecuencia de hongos presentes en los granos de maíz.

\*Xi= muestras de maíz. \*\*Promedio de 3 repeticiones. Cada repetición consistió de 1 caja de Petri con 15 granos de maíz.

El género que presentó mayor frecuencia sobre los granos de maíz analizados fue *Fusarium* presente en todas las muestras de maíz a excepción de la No. 20; en la muestra número 22 se encontró la mayor frecuencia relativa para este género. En 6 de las 25 muestras se encontró presente el género *Aspergillus;* en la muestra número 12 se encontró la mayor frecuencia relativa para este hongo. *Eurotium y Penicillium* estuvieron presentes en 5 de las 25 muestras de maíz analizadas. Cabe destacar que en la muestra No. 1, *Penicillium* presentó una frecuencia relativa del 57. 89%. El análisis de la presencia del hongo del género *Penicillium* es muy importante debido a que este hongo se encuentra reportado como uno de los géneros con mayor número de especies micotoxígenas, lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor.

## **3.2 Identificación morfológica de las especies de** *Penicillium* aisladas de los granos de maíz en medio de cultivo CYA, MEA, G25N y CZAPEK.

Se aislaron 14 cepas de *Penicillium* spp. de los granos de maíz. Posteriormente se obtuvieron cultivos monospóricos y se procedió a la realización de microcultivos en medio de cultivo MEA para llevarse a cabo el análisis microscópico de las estructuras fúngicas. En el cuadro 3.2 se describe un resumen de las características micromorfológicas que fueron analizadas en microscopio compuesto para la posible identificación de dichas cepas por medio de claves especializadas. En el anexo B se muestran las claves de identificación morfológicas para cada cepa.

Se identificaron 8 especies diferentes de *Penicillium* en los aislamientos: *P.* Subgénero *Aspergilloides, P. citrinum, P. rolfsii, P.* Ser. *Janthinella, P.* Ser. *Oxalica, P. madriti, P. miczynskii* y *P. oxalicum*, siendo este último el más frecuente en las muestras de maíz. Esto concuerda con Martínez, (2003), Presello *et al.*, (2004) y Vázquez, (2013) quiénes reportaron la presencia de dichas especies en granos de maíz.

Cepa	Especie	Ramificación conidióforo	Tamaño estípite	Ornamentación estípite	Tamaño métulas	Métulas (Irregulares o simétricas)	Tamaño fiálides	Fiálides forma	Ornamentación conidios	Forma conidios	Tamaño conidios
1	P. Subgénero Aspergilloides	30 Monoverticilados	30-114µm 3-7µm	liso	-	-	4-12μm 2-4μm	cilindroidal	liso	piriforme	6x4, 5x4, 7x5, 5x5, 6x6, 4x3, 8x6, 5x3 y 9x9 μm
2	P. citrinum	28 Biverticilado l Monoverticilado l Triverticilado	12-60µm	liso	6-10µm	28 simétricas 2 irregulares	6-22µm	ampuliforme	liso	esférico	2µm
3	P. rolfsii	27 Biverticilado 1 Monoverticilado 2 Triverticilado	22-78µm	liso	6-18µm	29 simétricas 1 irregular	8-18µm	ampuliforme	liso	esférico elipsoidal	2, 2x3, 2x4 μm
4	P. oxalicum	25 Biverticilado 4 Monoverticilado 1 Triverticilado	22-134µm	liso	4-18µm	27 simétricas 3 irregulares	8-26µm	ampuliforme acerosa	liso	esférico elipsoidal	2, 3x2 μm
5	P. Ser. Janthinella	20 Biverticilado 9 Monoverticilado 1 Triverticilado	4-87µm	liso 7 septado 15 ornamentado 8	8-46µm	11 simétricas 19 irregulares	6-36µm	cilíndroidal acerosa	liso	elipsoidal	2µm
6	P. Ser. Oxalica	21 Biverticilado 8 Monoverticilado 1 Triverticilado	11-60µm	liso 14 septado 12 finamente ornamentado 4	6-20µm	24 simétricas 6 irregulares	8-24µm	acerosa cilíndroidal	liso	elipsoidal esférica	2.5x2, 3x2, 4x3 μm
7	P. oxalicum	27 Biverticilado 3 Triverticilado	20-216µm	liso 7 septado 22 ornamentado 1	8-18µm	29 simétricas 1 irregular	6-18µm	acerosa cilíndroidal	liso	piriforme	2, 3 µm
8	P. oxalicum	28 Biverticilado 2 Monoverticilado	12-76µm	liso 6 septado 19 finamente ornamentado 5	9-20µm	28 simétricas 2 irregulares	8-20µm	ampuliforme cilindroidal	liso	piriforme	2,2.66x1.33 4x3 µm
9	P. madriti	29 Biverticilado 1 Monoverticilado	40-88µm	septado	8-14µm	simétricas	8-14µm	acerosa	liso	esférico	2µm
10	P. miczynskii	23 Biverticilado 7 Monoverticilado no vesiculados	52-408µm	liso 2 septado 18 ornamentado 10	8-18µm	11 simétricas 19 irregulares	6-14µm	cilíndroidal	liso	esférico	2-5µm
11	P. oxalicum	29 Biverticilado 1 Triverticilado	60-200µm	septado 28 ornamentado 2	8-32µm	26 simétricas 4 irregulares	8-18µm	acerosa	liso	piriforme elipsoidal	2, 2x4, 2x3 μm
12	P. oxalicum	27 Biverticilado 2 Monoverticilado 1 Triverticilado	42-148µm	septado 28 ornamentado 2	8-16µm	29 simétricas 1 irregular	10-20µm	ampuliforme	liso	esférico	2µm
13	P. Ser. Oxalica	23 Biverticilado 5 Monoverticilado 1 Triverticilado 1 Poliverticilado	18-122µm	liso 2 septado 27 ornamentado 1	8-18µm	28 simétricas 2 irregulares	10-20µm	acerosa	liso	piriforme elipsoidal	2x3, 2, 3x3, 2x1.33, 1.33 μm
14	P. oxalicum	28 Biverticilado 2 Monoverticilado	16-70µm	liso 1 septado 21 ornamentado 8	8-14µm	28 simétricas 2 irregulares	6-16µm	acerosa	liso	piriforme	2µm

Cuadro 3.2 Descripción general de caracteres micromorfológicos para la identificación de las especies de *Penicillium*.

A continuación, en la figura 3.2 se muestran las fotografías correspondientes al hongo aislado de la muestra de maíz M15 el cual fue identificado morfológicamente como Penicillium Subgénero Aspergilloides. En las figuras 3.3 y 3.4 se muestran las fotografías correspondientes a los hongos aislados de la muestra de maíz M13 los cuales fueron identificados morfológicamente como Penicillium citrinum y Penicillium rolfsii respectivamente. En las figuras 3.5 y 3.6 se muestran las fotografías correspondientes a los hongos aislados de la muestra de maíz M1 los cuales se identificaron morfológicamente como Penicillium oxalicum y Penicillium Ser. Janthinella respectivamente. En las figuras 3.7 y 3.8 se muestran las fotografías correspondientes a los hongos aislados de la muestra de maíz M20 los cuales se identificaron morfológicamente como Penicillium Ser. Oxalica y Penicillium oxalicum respectivamente. En la figura 3.9 se muestran las fotografías correspondientes al hongo aislado de la muestra de maíz M24 el cual fue identificado morfológicamente como Penicillium oxalicum. En las figuras 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 y 3.15 se muestran imágenes correspondientes a hongos aislados los cuales fueron identificados morfológicamente como Penicillium madriti, Penicillium miczynskii, Penicillium oxalicum, Penicillium oxalicum, Penicillium Ser. Janthinella y Penicillium oxalicum respectivamente. Además cada una de las figuras contiene su respectiva descripción macromorfológica y el resultado obtenido de la reacción de Ehrlich, mismos que fueron utilizados para la identificación de dichas cepas por medio de claves especializadas. En el anexo B se muestran las claves de identificación morfológicas para cada cepa.

## 1) Penicillium Subgénero Aspergilloides (Fig. 3.2)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 24-29 mm, sulcada radial con anillos concéntricos, profundidad y relativamente densa, velutina, color del micelio: amarillo al centro de la colonia (1205 Pantone), después sigue un anillo de color amarillo (141 Pantone), luego un anillo de color café obscuro (464 Pantone) más obscuro que en la gama y finalmente amarillo a la periferia (1205 Pantone); no presenta exudado; presenta pigmento soluble abundante de color café-anaranjado; y el reverso de la colonia es color amarillo mostaza (Figura 3.2 a).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 15-19 mm, esponjada, profundidad baja pero relativamente densa, entre velutina y flocosa, color del micelio: al centro verde (119 Pantone), luego un anillo color verde (5767 Pantone) y en la periferia color amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados; presenta pigmento soluble poco abundante color café; y el reverso de la colonia es color café al centro (470 Pantone) y a la periferia amarillo (101 Pantone) (Figura 3.2 b).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 43-47 mm, plana, profundidad media pero relativamente densa, costrosa y polvosa, color del micelio: al centro color café (154 Pantone), después sigue un anillo amarillo (136 Pantone), finalmente hay una capa de forma irregular y polvosa de color verde (119 Pantone); no presenta exudados, presenta pigmento soluble abundante de color anaranjado-amarillo; y el reverso de la colonia es color verde (399 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.2 d).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 20-22 mm, esponjada con anillos concéntricos, poca profundidad pero relativamente densa, flocosa y a la periferia polvosa, color del micelio: al centro color amarillo (136 Pantone), después sigue un anillo pardo entre amarillo (1205 Pantone) y verde (119 Pantone), luego otro anillo polvoso color verde (119 Pantone) y finalmente la periferia amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color verde (399 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.2 c).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo tenue (Figura 3.2 e)

Fotografías del conidióforo de Penicillium Subgénero Aspergilloides (Figura 3.2 f, h, i)

Fotografía de los conidios (Figura 3.2 g).

## 1) Penicillium Subgénero Aspergilloides



Figura 3.2 Características morfológicas de *Penicillium* Subgénero *Aspergilloides*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (e) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo tenue. (f, g, h, i) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto.

### 2) Penicillium citrinum (Fig. 3.3)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 15-21 mm, sulcada con anillos concéntricos, profundidad media pero relativamente densa, velutina, color del micelio: verde al centro de la colonia (382 y 386 Pantone) y amarillo a la periferia (109 y 101 Pantone); no presenta exudado; pigmento soluble poco abundante color amarillo; y el reverso de la colonia es color amarillo mostaza (Figura 3.3 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 21-24 mm, esponjada, profundidad baja y medio densa, flocosa, color del micelio: al centro verde (386 Pantone), luego un anillo color café (459 Pantone) y en la periferia color blanco; no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color café al centro (470 Pantone) y a la periferia amarillo (101 Pantone) (Figura 3.3 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 13-19.5 mm, sulcada con dos surcos al centro en forma de circulo discontinuo e irregular, profundidad media pero relativamente densa, velutina, color del micelio: al centro café (4535 Pantone), después sigue un café (4505 Pantone) y a la periferia café (4535 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color verde (399 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.3 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 10-17 mm, plano con el centro ligeramente levantado, profundidad media y poco densa, velutina al centro con la periferia lisa, color del micelio: blanco al centro y la periferia transparente; no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia el centro es color blanco y la periferia es amarillo (101 Pantone) (Figura 3.3 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.3 k).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 21-22 mm (Figura 3.3 k).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo (Figura 3.3 i)

Fotografía del conidióforo de Penicillium citrinum (Figura 3.3 j)

#### 2) Penicillium citrinum



Figura 3.3 Características morfológicas de *Penicillium citrinum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo. (j) Fotografía de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (k) Fotografías del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.
# 3) Penicillium rolfsii (Fig. 3.4)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 37-45 mm, cerebriforme, profundo pero relativamente densa, velutina, color del micelio: al centro blanco y a la periferia amarillo (141 Pantone); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color anaranjado (157 Pantone) (Figura 3.4 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 42-47 mm, plana, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro y la periferia es beige (155 Pantone) y entre ambos es verde (370 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color beige (134 Pantone), sigue un anillo café (139 Pantone), luego un anillo beige (134 Pantone), posteriormente un anillo grueso que ocupa casi todo el cuerpo de la colonia de color verde (4505 Pantone) y finalmente la periferia beige (1205 Pantone) (Figura 3.4 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 17-21 mm, sulcada con pequeñas erupciones discontinuas e irregulares formando un anillo irregular, media pero relativamente densa, costrosa y gelatinosa al centro y la periferia velutina, color del micelio: al centro beige (148 Pantone), después siguen erupciones pardas de color amarillo (134 Pantone) y verde (399 Pantone), finalmente la periferia es gris (454 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color beige (148 Pantone), posteriormente siguen unas manchas de color verde (399 Pantone) y beige (148 Pantone) y la periferia es beige (148 Pantone) (Figura 3.4 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 35-38 mm, plana, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro y la periferia es color blanco y entre ambos es verde (370 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia el centro color beige (148 Pantone), luego sigue un anillo grueso color verde (4525 Pantone) y a la periferia un anillo beige (155 Pantone) (Figura 3.4 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.4 k).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 21-22 mm (Figura 3.4 k).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo tenue (Figura 3.4 j)

Fotografía del conidióforo de Penicillium rolfsii (Figura 3.4 i)

# 3) Penicillium rolfsii



Figura 3.4 Características morfológicas de *Penicillium rolfsii*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (j) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo tenue. (i) Fotografía de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (k) Fotografías del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

## 4) Penicillium oxalicum (Fig. 3.5)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 50-52 mm, plana, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro tiene pequeños orificios y cuenta con

anillos de colores; centro beige (155 Pantone), le sigue un rosa (1625 Pantone), luego beige (148 Pantone), posteriormente un verde (119 Pantone) y por último amarillo (1205); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color al centro amarillo (134 Pantone), sigue un naranja (157 Pantone) y luego un amarillo (136 Pantone), luego café (154 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.5 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 36-51 mm, sulcada con el centro hundido, profundidad baja y medio densa, velutina, color del micelio: al centro naranja (157 Pantone), sigue un verde (119 Pantone), seguido por un amarillo (120 Pantone), le sigue un anillo verde marcado (119 Pantone) y la periferia es amarillo (120 Pantone); presenta exudados color transparente; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color al centro naranja (151 Pantone), sigue un anillo rojo (185 Pantone), luego un amarillo (136 Pantone) con anillo marcado violeta (490 Pantone) y finalmente la periferia amarillo (115 Pantone) (Figura 3.5 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 18-32 mm, sulcada con anillos concéntricos y el centro levantado, profundidad baja pero densidad media, velutina y flocosa, color del micelio: al centro rosa (488 Pantone), sigue debajo un verde (119 Pantone) y por arriba un rosa (488 Pantone), sigue un anillo rosa (170 Pantone) y anillo marcado rosa (488 Pantone) y finalmente la periferia es color rosa (162 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color café obscuro (182 Pantone), seguida por un rojo (174 Pantone), luego un anillo naranja (157 Pantone) y la periferia es amarillo (155 Pantone) (Figura 3.5 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 31-33 mm, plana con el centro levantado, profundidad media y medio densa, velutina y la periferia funiculosa, color del micelio: al centro es verde (617 Pantone), posteriormente una capa transparente, sigue un anillo verde (119 Pantone) y la periferia es amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia el centro color verde (4505 Pantone), luego sigue un anillo marcado de color verde (119 Pantone) y a la periferia un amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.5 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.5 l)).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 38-41 mm (Figura 3.5 l).

Prueba de Ehrlich: anillo rosa tenue (Figura 3.4 i)

Fotografía del conidióforo de Penicillium oxalicum (Figura 3.5 k)

Fotografía de los conidios (Figura 3.5 j)

# 4) Penicillium oxalicum



Figura 3.5 Características morfológicas de *Penicillium oxalicum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo rosa tenue. (j, k) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (l) Fotografías del crecimiento de las colonias a 5 y  $37 \,^{\circ}$ C.

# 5) Penicillium Ser. Janthinella (Fig. 3.6)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 49-52 mm, plana con anillos de colores y el centro un poco levantado con pequeños orificios, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro beige (155 Pantone), le sigue un rosa (148 Pantone), luego un anillo verde (119 Pantone) y por último a la periferia amarillo (1205); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia se observan formas de pétalos al centro amarillo (134 Pantone) y a la orilla café (139 Pantone), sigue un anillo marcado rojo (199 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.6 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 51-55 mm, con burbuja levantada al centro (volcán) y pequeño orificio hundido, profundidad baja y medio densa, flocosa y a la orilla velutina, color del micelio: al centro es color blanco, sigue un color verde (119 Pantone y la periferia es amarillo (1205 Pantone); presenta exudados color amarillo (109 Pantone); no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color al centro café (139 Pantone), y alrededor naranja (172 Pantone), sigue color carne (134 Pantone) y finalmente la periferia amarillo (121 Pantone) (Figura 3.6 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 17-20 mm, sulcada con anillos concéntricos y el centro costroso-gelatinoso, profundidad media pero densidad media, velutina y gelatinosa, periferia funiculosa, color del micelio: al centro es color pardo entre verde (119 Pantone) y rosa (162 Pantone) y la periferia es color beige (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color café (470 Pantone), seguida de un anillo amarillo (134 Pantone), luego un anillo carne (472 Pantone) y la periferia es amarillo (134 Pantone) (Figura 3.6 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 30-35 mm, sulcada con anillos concéntricos y el centro ligeramente levantado, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro café (468 Pantone), posteriormente café (466 Pantone), sigue un anillo muy tenue color verde (5767 Pantone), sigue un color verde (617 Pantone), sigue un anillo marcado verde (370 Pantone), se repite el verde (5767 Pantone), seguido por otro anillo marcado verde (399 Pantone) y la periferia es amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia anillos concéntricos intercalados de verde (399, 4535 y 4525 Pantone) (Figura 3.6 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.6 m).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 41-44 mm (Figura 3.6 m).

Prueba de Ehrlich: anillo rosa tenue (Figura 3.6 i)

Fotografías del conidióforo de Penicillium Ser. Janthinella (Figura 3.6 j, k)

Fotografía de los conidios (Figura 3.6 l)

# 5) Penicillium Ser. Janthinella



Figura 3.6 Características morfológicas de *Penicillium* Ser. *Janthinella*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo rosa tenue. (j, k, l) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (m) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

## 6) Penicillium Ser. Oxalica (Fig. 3.7)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 44-46 mm, plana con anillos de colores y el centro flocosa, profundidad media y medio densa, velutina y flocosa, color del micelio: al centro beige (155 Pantone), le sigue una capa rosa (1625 Pantone) con pequeños orificios, luego una capa verde (119 Pantone) y por último a la periferia amarillo (1205); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro color carne (134 Pantone), sigue un naranja (157 Pantone), sigue un naranja (151 Pantone), sigue un café (139 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.7 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 45-48 mm, plana con muchos micelios levantados largos unidos al final, profundidad media y medio densa, flocosa y funiculosa, color del micelio: al centro naranja (157 Pantone), sigue un color verde (358 Pantone), seguido por una capa verde (119 Pantone), todos estos cubiertos de micelios color amarillo (1205 Pantone) y la periferia anillo marcado verde (370 Pantone) polvoso; presenta exudados transparentes; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color al centro café (154 Pantone), luego capa tenue de naranja (151 Pantone), posteriormente capa amarilla (134 Pantone) y finalmente la periferia anillo amarillo (109 Pantone) (Figura 3.7 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 12-18 mm, sulcada con anillos concéntricos y el centro levantado, profundidad baja pero relativamente densa, velutina y en el penúltimo anillo gelatinosa, color del micelio: al centro y debajo café (470 Pantone) y por arriba color carne (488 Pantone), sigue un anillo color carne (475 Pantone), luego anillo gelatinoso color carne (472 Pantone) y periferia color carne (488 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color café (470 Pantone), seguida de un color carne (472 Pantone), y la periferia es amarillo (1205Pantone) (Figura 3.7 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 26-30 mm, plana con anillos concéntricos y el centro ligeramente levantado, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro café (482 Pantone), posteriormente una capa verde (617 Pantone), sigue un anillo marcado verde (370 Pantone) y la periferia color café (482 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color beige (134 Pantone) (Figura 3.7 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.7 l).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 41-47 mm (Figura 3.7 l).

Prueba de Ehrlich: anillo rosa tenue (Figura 3.7 i)

Fotografías del conidióforo de Penicillium Ser. Oxalica (Figura 3.7 j, k, m).

# 6) Penicillium Ser. Oxalica



Figura 3.7 Características morfológicas de *Penicillium* Ser. *Oxalica*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo rosa tenue. (j, k, m) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (l) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

## 7) Penicillium oxalicum (Fig. 3.8)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 49-52 mm, plana con anillos de colores y el centro un poco levantada como media esfera, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro rosa (162 Pantone), luego una capa beige (155 Pantone), le sigue una capa rosa (162 Pantone), luego un anillo marcado verde (119 Pantone) y por último a la periferia amarillo (1205 Pantone); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro color café obscuro (154 Pantone), luego una capa carne (134 Pantone), otra capa color café (154 Pantone), luego un anillo marcado color verde (119 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.8 a, e)

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 47-51 mm, esponjada/voluminosa con el centro hundido y anillos de colores, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro verde (119 Pantone), alrededor rojo (174 Pantone), seguido por una capa verde (119 Pantone) que se difumina, luego anillo marcado verde (119 Pantone), todos estos cubiertos de micelios color amarillo (1205 Pantone) y también la periferia; presenta exudados transparentes; presenta pigmentos solubles amarillos (109 Pantone); y el reverso de la colonia al centro es color rojo (174 Pantone), luego capa amarilla (141 Pantone) y finalmente la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.8 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 31-34 mm, plana con el centro levantado en forma de media esfera, profundidad media y medio densa, alrededor del centro es flocosa con anillos concéntricos de colores y la periferia funiculosa, color del micelio: al centro es color rosa (162 Pantone) sigue una capa de color verde (4505 Pantone), sigue un anillo marcado verde (119 Pantone), y la periferia amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color rojo (484 Pantone), posteriormente capa rosa (488 Pantone), luego un anillo café (464 Pantone) y la periferia es amarillo (1205Pantone) (Figura 3.8 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 34-37 mm, plana con anillos concéntricos y el centro ligeramente levantado, profundidad media y poco densa, velutina y la periferia funiculosa, color del micelio: al centro es café (468 Pantone) y gris (Cool Gray 1 Pantone), posteriormente una capa verde (5767 Pantone), sigue un anillo marcado verde (119 Pantone) y la periferia color amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.8 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.8 k).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 39-42 mm (Figura 3.8 k).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo-rosa tenue (Figura 3.8 i)

Fotografías del conidióforo de Penicillium oxalicum (Figura 3.8 j, l, m).

# 7) Penicillium oxalicum



Figura 3.8 Características morfológicas de *Penicillium oxalicum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo-rosa tenue. (j, l, m) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (k) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

## 8) Penicillium oxalicum (Fig. 3.9)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 49-52 mm, sulcada radial con capas de colores al centro ligeramente levantado en forma de media esfera y pequeños orificios, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro beige (155 Pantone), le sigue una capa rosa (162 Pantone), luego un anillo marcado verde (119 Pantone) y por último a la periferia amarillo (1205 Pantone); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro color café obscuro (154 Pantone), luego una capa carne (134 Pantone), otra capa rosa (202 Pantone), luego capa color café (168 Pantone) y a la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.9 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 47-50 mm, esponjada/voluminosa con el centro hundido, profundidad media y medio densa, velutina y flocosa, color del micelio: al centro hundido color carne (134 Pantone), luego anillo de micelio levantado café (4535 Pantone), seguido por una capa verde (119 Pantone), luego anillo marcado amarillo (1205 Pantone) y por ultimo verde (119 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmentos solubles; y el reverso de la colonia al centro es color naranja (137 Pantone), rodeado por un circulo color café (154 Pantone) y finalmente capa amarilla (120 Pantone) (Figura 3.9 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 15-17 mm, voluminosa al centro y plana en la periferia con anillos concéntricos y su centro levantado, profundidad media-baja y relativamente densa, velutina, gelatinosa y periferia funiculosa; color del micelio: al centro es color café (168 Pantone) y rosa (1625 Pantone),sigue un anillo rosa (162 Pantone), sigue un anillo marcado gelatinoso brillante carne (157 Pantone), y la periferia amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es color rojo-café (174 Pantone), posteriormente carne (148 Pantone), luego un anillo marcado carne (157 Pantone) y la periferia es amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.9 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 25-30 mm, plana con anillos concéntricos y el centro ligeramente levantado, profundidad media y poco densa, velutina, color del micelio: al centro es café (468 Pantone), posteriormente una capa café (466 Pantone), sigue un anillo marcado verde (617 Pantone), otro anillo marcado color verde (370 Pantone) y la periferia verde (617 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color verde al centro (617 Pantone), luego anillo marcado verde (5767 Pantone) y otro anillo verde marcado (370 Pantone) y finalmente periferia verde claro (386 Pantone) (Figura 3.9 c, g).

CYA, 5°C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.9 j).

CYA, 37°C, 7 días: Diámetro de la colonia de 36-41 mm (Figura 3.9 j).

Prueba de Ehrlich: anillo rosa tenue (Figura 3.9 i)

Fotografía del conidióforo de Penicillium oxalicum (Figura 3.9 k).

# 8) Penicillium oxalicum



Figura 3.9 Características morfológicas de *Penicillium oxalicum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo rosa tenue. (k) Fotografía de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (j) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

# 9) Penicillium madritii (Fig. 3.10)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 38-43 mm, cerebriforme, profundidad media pero relativamente densa, velutina con micelios sobresalientes en el centro de la colonia, color del micelio: al centro de la colonia es café (4535 Pantone), sigue una capa café (451 Pantone) y la periferia es un anillo gris (454 Pantone); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color café al centro (464 Pantone), seguido de una capa café más claro (465 Pantone) y la periferia es color amarillo (1205 Pantone y color café (4535 Pantone) (Figura 3.10 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 38-46 mm, plana con el centro ligeramente levantado por micelios unidos, profundidad media y medio densa, velutina, porosa y polvosa, color del micelio: en la mayor parte de la colonia verde (5767 Pantone) y la periferia es café claro (4535 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color carne (134 Pantone) (Figura 3.10 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 18-23 mm, globosa con erupciones irregulares en forma de piedra, profundidad baja pero relativamente densa, costrosa, color del micelio: al centro pardo entre café (4505 Pantone) y café claro (454 Pantone), con periferia en forma de anillo plano rosa (473 Pantone) gelatinoso brillante; presenta exudados transparentes, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia al centro es pardo entre rosa (473 Pantone) y café obscuro (440 Pantone) y la periferia es un anillo color rosa (473 Pantone) (Figura 3.10 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 34-40 mm, plana, profundidad media y medio-poco densa, velutina y al centro con pocos micelios levantados, porosa; color del micelio: al centro y la periferia es color amarillo (1205 Pantone) y entre estos dos y predominantemente es color verde (5767 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia un punto al centro color carne (134 Pantone), luego sigue una capa color café muy tenue (464 Pantone), luego una capa de color carne (134 Pantone) muy tenue y que a la periferia va subiendo de tonalidad (Figura 3.10 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.10 i).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 43-48 mm (Figura 3.10 i).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo tenue (Figura 3.10 k)

Fotografías del conidióforo de Penicillium madriti (Figura 3.10 j, l)

# 9) Penicillium madriti



Figura 3.10 Características morfológicas de *Penicillium madriti*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (k) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo tenue. (j, l) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (i) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

#### 10) Penicillium miczynskii (Fig. 3.11)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 27-33 mm, sulcada en forma radial con un circulo al centro ligeramente hundido, profundidad media pero relativamente densa, velutina con pequeños orificios al centro de la colonia, color del micelio: al centro de la colonia es rosa (489 Pantone), sigue una capa color rosa (475 Pantone), luego un anillo color gris (Cool Gray 1 Pantone) y la periferia es café (479 Pantone); no presenta exudado; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color café claro al centro (468 Pantone), seguido de una capa extensa café muy tenue (464 Pantone) y la periferia es color café obscuro (469 Pantone) (Figura 3.11 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 27-28 mm, plana con el centro levantado de forma irregular y la periferia anillo levantado, profundidad media pero relativamente densa, velutina, color del micelio: al centro de la colonia es color verde (119 Pantone) aproximadamente una tonalidad más fuerte ya que no se encuentra dentro de la gama Pantone y la periferia es blanca; no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color carne (134 Pantone) (Figura 3.11 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 35-41 mm, del centro sulcada en forma de flor y la demás superficie plana, profundidad media pero relativamente densa, velutina, color del micelio: al centro de la colonia es color verde (365 Pantone) con algunos micelios levantados color rosa (162 Pantone) y algunos puntos blancos, luego una capa verde (451 Pantone), otra capa verde (365 Pantone); no presenta exudados, presenta pigmento soluble amarillo pálido; y el reverso de la colonia presenta puntos dispersos color café (154 Pantone) (esclerocios de 800-130µm) y al fondo de color amarillo (100 Pantone), el centro y la periferia son color amarillo (121 Pantone) (Figura 3.11 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 17-19 mm, porosa y en la periferia un anillo levantado y orificios pequeños, profundidad media y medio densa, velutina; color del micelio: al centro de la colonia es color amarillo (1205 Pantone), luego una capa gruesa de un verde demasiado tenue (617 Pantone) y por último la periferia es color amarillo (1205 Pantone); presenta exudados amarillo-transparente, no presenta pigmento soluble; y

el reverso de la colonia es al centro y la periferia un color café (4535 Pantone) y entre ambos un color café (464 Pantone) (Figura 3.11 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.11 j).

CYA, 37°C, 7 días: Diámetro de la colonia de 11-17 mm (Figura 3.11 j).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo tenue (Figura 3.11 i)

Fotografía del conidióforo de *Penicillium* miczynskii (Figura 3.11 k)

# 10) Penicillium miczynskii



Figura 3.11 Características morfológicas de *Penicillium miczynskii*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo tenue. (k) Fotografía de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (j) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

#### **11**) *Penicillium oxalicum* (Fig. 3.12)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 44-48 mm, plana con anillos concéntricos de colores y en el centro algunos micelios levantados con orificios pequeños alrededor, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro de la colonia es rosa (162 Pantone), sigue una capa color amarillo (1205 Pantone), luego un anillo concéntrico rosa (489 Pantone), nuevamente capa rosa (162 Pantone), luego anillo concéntrico verde (119 Pantone) y la periferia es café (4535 Pantone); presenta exudados transparentes; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color café obscuro al centro (469 Pantone), seguido de una capa color carne (134 Pantone), luego un anillo concéntrico grueso café obscuro (469 Pantone), luego anillo concéntrico color carne (134 Pantone), posteriormente anillo concéntrico café (139 Pantone) y la periferia es color amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.12 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 42-49 mm, plana con el centro esponjado y micelios levantados que se unen, además el centro ligeramente hundido, profundidad media y medio densa, velutina y polvosa, color del micelio: al centro de la colonia es color carne (134 Pantone) con micelios levantados alrededor color café (4535 Pantone), luego una capa extensa color verde (119 Pantone) y finalmente la periferia parda entre un amarillo (120 Pantone) y verde (119 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color anaranjado al centro (137 Pantone) rodeado por un circulo café (154 Pantone) y finalmente una capa amarilla (120 Pantone) (Figura 3.12 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 16-18 mm, plana con el centro ligeramente levantado y con pequeños poros, anillos concéntricos y la periferia levantada; profundidad media pero relativamente densa, funiculosa en la periferia y gelatinosa, color del micelio: al centro es una combinación entre un café (168 Pantone) y un rosa (1625 Pantone), luego un anillo concéntrico rosa (162 Pantone), otro anillo marcado gelatinoso y brillante color carne (157 Pantone) y finalmente la periferia es color amarillo (1205 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color rojo (174 Pantone), seguido de un anillo concéntrico café (154 Pantone), luego una

capa color carne (148 Pantone) y la periferia es color carne (134 Pantone) (Figura 3.12 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 24-33 mm, plana con anillos concéntricos verdes y el centro ligeramente levantado, profundidad media y poco densa, velutina y la periferia funiculosa; color del micelio: el centro de la colonia es color café (468 Pantone), luego una capa café (466 Pantone), luego un anillo marcado color verde (370 Pantone) y por último la periferia es color café (466 Pantone) con polvo verde (119 Pantone);no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es al centro y la periferia un color amarillo (1205 Pantone), el centro está rodeado de un circulo color café (168 Pantone), y entre ambos una capa color verde (119 Pantone) (Figura 3.12 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.12 l).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 41-44 mm (Figura 3.12 l).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo tenue (Figura 3.12 k)

Fotografías del conidióforo de Penicillium oxalicum (Figura 3.12 i, j)

## 11) Penicillium oxalicum



Figura 3.12 Características morfológicas de *Penicillium oxalicum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (k) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo tenue. (i, j) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (l) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

#### 12) Penicillium oxalicum (Fig. 3.13)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 42-45 mm, plana con anillos concéntricos de colores y en el centro algunos micelios levantados con orificios pequeños alrededor, profundidad media y medio densa, velutina y al centro flocosa, color del micelio: al centro de la colonia es beige (155 Pantone), sigue una capa color rosa (162 Pantone), luego una capa verde (4505 Pantone), posteriormente capa verde (119 Pantone), y la periferia se repite nuevamente verde (4505 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color anaranjado al centro (151 Pantone), seguido de una capa color café (154 Pantone), y la periferia es color carne (157 Pantone) (Figura 3.13 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 43-46 mm, plana, profundidad media y medio densa, velutina y polvosa, color del micelio: al centro de la colonia es color amarillo (1205 Pantone), luego una capa extensa color verde (5767 Pantone), luego un anillo marcado color verde un poco más obscuro que (370 Pantone) y finalmente la periferia color amarillo (1205 Pantone); presenta exudados transparentes; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color café obscuro al centro (168 Pantone), seguido de una capa roja (Warm red 2x Pantone), luego una capa beige (155 Pantone) la cual es predominante y finalmente una capa verde (4505 Pantone) (Figura 3.13 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 7-12 mm, circulo abombado con pequeños poros y la periferia plana; profundidad baja pero relativamente densa, flocosa y en la periferia lisa y gelatinosa, color del micelio: al centro es rosa (162 Pantone) y en la periferia es color carne (475 Pantone) transparente; presenta exudados transparentes, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color amarillo (136 Pantone), con manchas café obscuro (139 Pantone) y la periferia es color carne (134 Pantone) (Figura 3.13 d, h).

CZAPEK, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 31-35 mm, plana con anillos concéntricos y el centro ligeramente levantado, profundidad media y poco densa, velutina; color del micelio: el centro de la colonia es color café (468 Pantone), luego una capa café (466 Pantone), luego un anillo marcado color verde (617 Pantone), luego otro anillo

marcado color verde (370 Pantone) y por último la periferia es color verde (617 Pantone);no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es al centro color verde (617 Pantone), luego un anillo marcado color verde (5767 Pantone), otro anillo color verde (119 Pantone) y la periferia tiene puntos verdes (370 Pantone) (Figura 3.13 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.13 j).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 42-44 mm (Figura 3.13 j).

Prueba de Ehrlich: anillo amarillo tenue (Figura 3.13 i)

Fotografías del conidióforo de Penicillium oxalicum (Figura 3.13 k, l)

# 12) Penicillium oxalicum



Figura 3.13 Características morfológicas de *Penicillium oxalicum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo amarillo tenue. (k, l) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (j) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C

#### 13) Penicillium Ser. Oxalica (Fig. 3.14)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 53-57 mm, plana en la mayoría de la superficie y radialmente sulcada, con el centro ligeramente levantado, profundidad media y medio densa, velutina y al centro flocosa, color del micelio: al centro de la colonia es rosa (162 Pantone), sigue una capa color rosa (500 Pantone), luego una capa color café claro (468 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color rosa al centro (1625 Pantone), rodeado por un círculo color vino (182 Pantone), luego una capa rosa (163 Pantone) seguido de una capa gruesa color café (469 Pantone), y la periferia es color beige (155 Pantone) (Figura 3.14 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 52-55 mm, plana y en el centro unos micelios levantados color blanco, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro de la colonia es color blanco, luego una capa extensa color verde seco (4505 Pantone), y finalmente la periferia color verde (119 Pantone); no presenta exudados; presenta pigmento soluble amarillo (1205 Pantone); y el reverso de la colonia es color rojo al centro (174 Pantone), luego una capa amarilla en casi toda la colonia (120 Pantone), y finalmente la periferia amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.14 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 16-19 mm, sulcada con pequeñas erupciones irregulares al centro y con la periferia plana; profundidad baja y medio densa, velutina, color del micelio: al centro rugoso color rosa (472 Pantone), por debajo de las erupciones color café (437 Pantone) y en la periferia es color carne brilloso-transparente (148 Pantone); no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color pardo entre café (168 Pantone) y beige (155 Pantone) y la periferia es color beige (155 Pantone) (Figura 3.14 d, h).

CZAPEK, 25-27°C, 7 días: Diámetro de la colonia de 20-32 mm, plana con anillos concéntricos, profundidad media y poco densa, velutina y polvosa; color del micelio: el centro de la colonia es color café claro (454 Pantone), luego un anillo marcado verde (119 Pantone), luego otro anillo marcado color verde (617 Pantone), seguido de un anillo salteado poco marcado (119 Pantone) y otro anillo verde (617 Pantone) y finalmente la

periferia es color amarillo (1205 Pantone);no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color amarillo (1205 Pantone) (Figura 3.14 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.14 j).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 44-46 mm (Figura 3.14 j).

Prueba de Ehrlich: anillo rosa tenue (Figura 3.14 i)

Fotografías del conidióforo de Penicillium Ser. Oxalica (Figura 3.14 k, l)

# 13) Penicillium Ser. Oxalica



Figura 3.14 Características morfológicas de *Penicillium* Ser. *Oxalica*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo rosa tenue. (k, l) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (j) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

#### 14) Penicillium oxalicum (Fig. 3.15)

CYA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 44-47 mm, plana con el centro levantado en forma de pico con micelio, profundidad media y medio densa, velutina y al centro flocosa, color del micelio: al centro de la colonia es rosa (162 Pantone), sigue una capa color rosa (169 Pantone), luego una capa color verde (4505 Pantone), luego anillo marcado verde (119 Pantone) y periferia color verde (4505); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color rojo al centro (182 Pantone), luego una capa roja más desvanecida (180 Pantone), luego una capa café (464 Pantone) y la periferia es color beige (134 Pantone) (Figura 3.15 a, e).

MEA, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 53-56 mm, plana, profundidad media y medio densa, velutina, color del micelio: al centro de la colonia y periferia es color amarillo (1205 Pantone), seguido de una capa verde (119 Pantone), después otra capa verde (370 Pantone); no presenta exudados; no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color rojo al centro (174 Pantone), rodeado de un anillo rojo (185 Pantone), luego una capa amarilla en casi toda la colonia (1205 Pantone), y finalmente la periferia verde (358 Pantone) (Figura 3.15 b, f).

G25N, 25-27 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 11-14 mm, sulcado con el centro levantado en forma de media esfera y con poros, y la periferia plana; profundidad baja y medio densa, velutina, color del micelio: al centro color violeta (678 Pantone) y en la periferia es color rosa (698 Pantone); presenta exudados transparentes, no presenta pigmento soluble; y el reverso de la colonia es color café al centro (168 Pantone) y la periferia es color beige (155 Pantone) (Figura 3.15 d, h).

CZAPEK, 25-27°C, 7 días: Diámetro de la colonia de 22-31 mm, plana con anillos concéntricos y el centro poco micelio blanco, profundidad media y poco densa, velutina; color del micelio: el centro de la colonia es blanco, luego una capa verde (5767 Pantone), luego un anillo marcado color verde (119 Pantone), seguido de otro anillo marcado verde (5767 Pantone) y otro anillo no muy marcado verde (119 Pantone) y finalmente la periferia es un anillo verde (399 Pantone);no presenta exudados, no presenta pigmento soluble; y el

reverso de la colonia es color pardo entre café (139 Pantone) y café (148 Pantone) (Figura 3.15 c, g).

CYA, 5 °C, 7 días: No hubo crecimiento (Figura 3.15 j).

CYA, 37 °C, 7 días: Diámetro de la colonia de 43-44 mm (Figura 3.15 j).

Prueba de Ehrlich: anillo rosa tenue (Figura 3.15 i)

Fotografías del conidióforo de Penicillium oxalicum (Figura 3.15 k, l)

# 14) Penicillium oxalicum



Figura 3.15 Características morfológicas de *Penicillium oxalicum*. Fila superior (a, b, c, d) de izquierda a derecha se observan colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N; fila inferior (e, f, g, h) de izquierda a derecha se observa el reverso de las colonias en CYA, MEA, CZAPEK y G25N a 25 °C durante 7 días. (i) Prueba de Ehrlich-anillo rosa tenue. (k, l) Fotografías de *Penicillium* spp. en microscopio compuesto. (j) Fotografía del crecimiento de las colonias a 5 y 37 °C.

\*Las cepas que no se identificaron hasta nivel de especie no compartieron todas las características descritas en las claves para alguna especie en particular, por lo que se decidió dejarlo hasta nivel de Subgénero o Serie.

#### 3.3 Extracción y cuantificación de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN de los cultivos monospóricos correspondientes al género *Penicillium*, empleando el KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food ya que este presenta ciertas ventajas sobre otras técnicas, como la obtención de extracciones de ADN en menor tiempo ya que no es necesaria la incubación de la proteinasa K y evita el uso de solventes orgánicos peligrosos como el cloroformo, entre otras. Dichas extracciones fueron cuantificadas posteriormente con ayuda del espectrofotómetro, los valores de concentración ( $ng/\mu L$ ) y pureza (260/280) de las muestras seleccionadas se muestran en el cuadro 3.3.

Cuadro 3.3 Concentración de ADN y relación 260/280 de las cepas monospóricas del género *Penicillium*.

No. cepa	Concentración de ADN (ng/µL)	Pureza relación 260/280
1R1	37,5	5,16
2R1	203,6	3,54
3R1	211,6	4,17
4R2	183,6	3,03
5R1	272,2	2,48
6R2	217,3	2,74
7R1	186,0	3,24

1R1 repetición 1 de la cepa 1 y 4R2 repetición 2 de la cepa 4; etc.

Estas concentraciones de ADN obtenidas de la extracción de los hongos fueron utilizadas para la realización de la PCR con los *primers* de *P. oxalicum* (Ver cuadro 3.3).

Respecto a los valores obtenidos en cuanto a la relación 260/280 o el equivalente a la pureza del ADN, podemos observar que están por arriba de lo ideal que es aproximadamente 1.8-2.0, lo cual indica que el ADN extraído podría estar contaminado con ARN (Querci, 2007), lo cual se atribuye a diversos factores que pudieran influir en la

obtención de dicha pureza como por ejemplo que este Kit está diseñado para la extracción de ADN de alimentos altamente procesados o que el volumen de la reacción pudo necesitar ser optimizado dependiendo del tipo de muestra de partida y de su composición. Pero por otro lado, las concentraciones de ADN son altas indicando la posibilidad de que este ADN es apto para ser utilizado en la reacción de PCR.

Posteriormente se llevó a cabo una segunda extracción con el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food de las 14 cepas seleccionadas correspondientes a especies de *Penicillium* cuyas concentraciones de ADN y purezas se presentan en el cuadro 3.4.

	Concentración	Pureza relación			
No. cepa	de ADN				
	(ng/µL)	260/280			
1R1	72,2	3,29			
2R2	96,2	3,80			
3R2	186,2	6,58			
5R2	124,6	3,30			
6R2	86,4	4,52			
8R2	130,7	2,99			
9R1	85,1	3,58			
10R1	64,3	3,36			
11R1	80,3	3,43			
12R1	86,5	3,59			
13R1	73,1	2,71			
14R1	52,3	4,27			

Cuadro 3.4 Concentración de ADN y relación 260/280 de las cepas monospóricas del género *Penicillium*.

1R1 repetición 1 de la cepa 1 y 2R2 repetición 2 de la cepa 2; etc.

Estas concentraciones de ADN obtenidas de la extracción de los hongos fueron utilizadas para la realización de la PCR con los *primers* de  $\beta$ - tubulina y Calmodulina (Ver cuadro 3.4).

Posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN de los cultivos monospóricos correspondientes al género *Penicillium* de las cepas 4R2 y 7R2 identificados morfológicamente como *P. oxalicum*, empleando el protocolo de Sambrook adaptado para llevar a cabo la extracción de hongos. Dichas extracciones fueron cuantificadas posteriormente con ayuda del espectrofotómetro, los valores de concentración y pureza se muestran en el cuadro 3.5.

Cuadro 3.5 Concentración de ADN y relación 260/280 de las cepas monospóricas del género *Penicillium*.

	Concentración	Pureza	Dilución	Concentración	Pureza
No. cepa	de ADN (ng/µL)	relación 260/280	de ADN	de ADN (ng/µL)	relación 260/280
4R2	4727,1	1,84	4R2	196,7	2,02
7R2	4241,0	1,98	7R2	230,6	1,96

Estas concentraciones de ADN obtenidas de la extracción de los hongos fueron utilizadas para la realización de la PCR con los *primers* de  $\beta$ - tubulina y Calmodulina (Ver cuadro 3.5).

Respecto a los valores obtenidos en cuanto a la relación 260/280 o el equivalente a la pureza del ADN, podemos observar que son adecuados y se encuentran entre 1.8 - 2.0, lo cual nos indica que nuestro ADN es puro (Querci, 2007). Las concentraciones de ADN son altas indicando la posibilidad de que este ADN es apto para ser utilizado en la reacción de PCR. Esto se realizó con el fin de obtener una mayor pureza del ADN que la que se logró obtener por medio del KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food y al realizar la PCR observar si los amplificados obtenidos eran de mejor calidad.

Primeramente se utilizó el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food para extraer del ADN de las cepas de *Penicillium* aisladas y realizar su identificación molecular por medio de la PCR, se utilizaron *primers* diseñados para la especie de *P. oxalicum*, sin embargo aunque al principio se obtuvo el amplificado esperado pero muy tenue posteriormente ya no se obtuvo ningún amplificado. Además la pureza del ADN estaba

contaminada con ARN por lo que se decidió utilizar como segunda opción la técnica de Sambrook para la extracción del ADN de las cepas 4 y 7 y realizar la PCR, sin embargo aunque se obtuvo una buena pureza de dicho ADN ya no se obtuvieron amplificados.

Para realizar la PCR con los *primers* de  $\beta$ -tubulina y Calmodulina se utilizaron las extracciones obtenidas por medio de la técnica de Sambrook (cepa 4 y 7) y las extracciones obtenidas por medio del Kit (cepa 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14) con los cuales se obtuvieron amplificados, lo cual nos indicó que ambos ADN estaban bien y que probablemente lo que estaba fallando eran los *primers* diseñados para *P. oxalicum* los cuales pudieron haberse contaminado.

### 3.4 Diseño de primers específicos para Penicillium oxalicum

Se seleccionó una cepa micotoxigénica a partir del estudio de la micobiota presente en los granos de maíz, para la realización de la identificación molecular por medio de la PCR. Se diseñaron los *primers* correspondientes a *Penicillium oxalicum* por ser una de las especies que contaminan más comúnmente el maíz. Esto se realizó a partir del gen Cct8 y con ayuda de programas bioinformáticos (PrimerQuest) ver anexo C. A continuación en el cuadro 3.6 se encuentran descritas las características de los *primers* frontal y reverso para *Penicillium oxalicum* con un amplificado de 449 pb.

	Secuencia	Inicia	Final	Longitud	Tm	GC %	Amplificado
Primer frontal	CTACCTCAACCGCTT CAACA	210	230	20	62°C	50	
Primer reverso	TGCGAGGAATCACCT CAAAG	639	659	20	62°C	50	449 pb

Cuadro 3.6 Propiedades de primers específicos para Penicillium oxalicum.

# **3.4.1** *Primers* β-tubulina y Calmodulina para identificación de especies de *Penicillium*

Recientemente la utilización del espaciador transcrito del área interna (ITS) era el más aceptado como código de barras oficial para la identificación de hongos; sin embargo, para el caso de las especies de *Penicillium* este marcador funciona bien para colocarlas en una sección y pocas veces para identificarlas hasta especie. Debido a tales limitaciones se ha recurrido a marcadores de identificación secundaria para lograr identificar hasta nivel especie. Los requisitos de tales marcadores son que sean fáciles de amplificar y que sean capaces de distinguir entre especies estrechamente relacionadas (Visagie *et al.*, 2014).

Se propuso el marcador  $\beta$ -tubulina aunque se han tenido algunos problemas, ya que las alineaciones a través de un género tan diverso como *Penicillium* son difíciles y a menudo contienen una gran proporción de sitios ambiguamente alineados (Visagie *et al.*, 2014).

Además, se propuso Calmodulina el cual es un marcador recomendado para la identificación de nuevas especies (Visagie *et al.*, 2014).

#### **3.5 PCR**

#### Identificación molecular de Penicillium oxalicum

En la Figura 3.16 se observa un gel de agarosa al 1% en donde se utilizaron los *primers* del gen Cct8 diseñados para *Penicillium oxalicum* a una temperatura de alineación (Tm) de 56 °C para analizar las cepas 4 y 7 las cuales morfológicamente se identificaron como *P. oxalicum*. En el cual se encuentra el marcador de peso molecular (MP) de 1 Kb en el carril 1, en el carril 2 el blanco (Bco) en el cual no hay ningún amplificado indicando que la reacción es correcta y que no hay contaminantes, en el carril 3 (M4R1) la cepa 4 repetición 1 en el cual no se muestra ningún amplificado, en el carril 4 (M7R1) la cepa 7 repetición 1 en el cual no hay ningún amplificado, en el carril 5 (M4R2) la cepa 4 repetición 2 en el cual se muestra un amplificado muy tenue aproximadamente de 449 pb lo cual corresponde con el diseño de los *primers* en el Cuadro 3.6, y en el carril 6 (M7R2) la muestra 7 repetición 2 no se muestra ningún amplificado; las extracciones de ADN utilizadas para esta reacción corresponden al cuadro 3.3. En este gel se puede confirmar que la muestra 4R2 identificada

morfológicamente como *P. oxalicum* corresponde también molecularmente con dicha especie, sin embargo la muestra 7 aunque morfológicamente fue identificada como *P. oxalicum* molecularmente se demuestra que no corresponde, aunque podría tratarse de una especie o subespecie muy cercana filogenéticamente.

Cabe mencionar que para lograr obtener tal amplificado se tuvieron que hacer muchas pruebas en las PCR modificando las Tm, los tiempos tanto de desnaturalización, hibridación y alineamiento, número de ciclos, etc. Y también como se mencionó anteriormente dichos *primers* proporcionaron al principio amplificados aunque muy tenues, los cuales después de un tiempo ya no amplificaron probablemente porque se contaminaron o algún otro tipo de factor.



**Figura 3.16.** Electroforesis del marcador Cct8 componente putativo del complejo de chaperoninas TCP-1 en *Penicillium oxalicum*, Tm de 56 °C. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M4R1) Muestra 4R1. M7R1) Muestra 7R1. M4R2) Muestra 4R2 (*P. oxalicum*). M7R2) Muestra 7R2.

# Identificación molecular de *Penicillium* spp. en maíz con marcadores para Calmodulina

En la Figura 3.17 se muestran los amplificados con los *primers* de Calmodulina de las diferentes especies de *Penicillium*.



**Figura 3.17.** Electroforesis de los amplificados de las cepas M1 a la M7con *primers* de Calmodulina. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M1) Muestra 1R1 (*P.* Subgénero *Aspergilloides*). M2) Muestra 2R2 (*P. citrinum*). M3) Muestra 3R2 (*P. rolfsii*). M4) Muestra 4R2 (*P. oxalicum*). M5) Muestra 5R2 (*P. Ser. Janthinella*). M6) Muestra 6R2 (*P. Ser. Oxalica*). M7) Muestra 7R2 (*P. Ser. Oxalica*).

En el carril 1 (MP) se observa el marcador de peso molecular de 1Kb; en el carril 2 (Bco) se observa el control negativo en el cual no hay ningún amplificado; en el carril 3 (M1) se observa un amplificado de 650 pb de la cepa identificada como *Penicillium* Subgénero *Aspergilloides;* en el carril 4 (M2) no se observa ningún amplificado de la cepa identificada como *Penicillium citrinum*, se ha reportado que esta especie es difícil de identificar molecularmente; en el carril 5 (M3) no se observa ningún amplificado de la cepa identificada como *Penicillium rolfsii* esto se podría atribuir probablemente a que la pureza dada por la relación 260/280 cuantificada es demasiado alta, indicando una contaminación por ARN (véase cuadro 3.4); en el carril 6 (M4) se observa un amplificado de 550 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum;* en el carril 7 (M5) y 8 (M6) se observa una amplificado de 500 pb para las cepas identificadas como *Penicillium* Ser. *Janthinella* y *Penicillium* Ser. *Oxalica* respectivamente y en el carril 8 (M7) se observa un amplificado de 700 pb para la cepa identificada como *P. Ser. Oxalica*.
En la Figura 3.18 se muestran los amplificados con los *primers* de Calmodulina de las diferentes especies de *Penicillium* de las cepas aisladas.



**Figura 3.18**. Electroforesis de los amplificados de las cepas M7 a la M14 con *primers* de Calmodulina. MP) Marcador de peso molecular 100 pb. Bco) Blanco. M7) Muestra 7R2 (*P. Ser. Oxalica*). M8) Muestra 8R2 (*P. oxalicum*). M9) Muestra 9R1 *P. madriti*). M10) Muestra 10R1 (*P. myczynskii*). M11) Muestra 11R1 (*P. oxalicum*). M12) Muestra 12R1 (*P. oxalicum*). M13) Muestra 13R1 (*P. Ser. Oxalica*). M14) Muestra 14R1 (*P. oxalicum*).

En el carril 1 (MP) se observa el marcador de peso molecular de 100 pb; en el carril 2 (Bco) se observa el control negativo en el cual no hay ningún amplificado; en el carril 3 (M7) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *P*. Ser. *Oxalica;* en el carril 4 (M8) se observa un amplificado de 450 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum*; en el carril 5 (M9) se observa un amplificado de 475 pb de la cepa identificada como *Penicillium madriti*; en el carril 6 (M10) se observa un amplificado de 520 pb de la cepa identificada de 520 pb de la cepa identificada como *Penicillium madriti*; en el carril 6 (M10) se observa un amplificado de 520 pb de la cepa identificada como *Penicillium miczynskii;* en el carril 7 (M11)se observa un amplificado de 450 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum;* en el carril 8 (M12) se observa un amplificado de 450 pb para la cepa identificada como *Penicillium oxalicum;* en el carril 9 (M13) se observa un amplificado de 480 pb de la cepa identificada como *Penicillium Ser. Oxalica* y en el carril 10 (M14) se observa un amplificado de 450 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum.* Con una Tm de 55 °C en el programa de PCR se obtuvieron amplificados para el gen de Calmodulina de las diferentes especies de *Penicillium.* 

Para los geles en las figuras 3.17 y 3.18 el marcador de peso molecular nos sirve de referencia para saber el tamaño aproximado de los amplificados obtenidos. De acuerdo con el peso molecular del marcador se calculó el tamaño aproximado del fragmento amplificado para cada especie.

#### Identificación molecular de *Penicillium* spp. en maíz con marcadores para β-tubulina

En la Figura 3.19 se muestran los amplificados con los *primers* de  $\beta$ -tubulina de las diferentes especies de *Penicillium*.



**Figura 3.19**. Electroforesis de los amplificados de las cepas M1 a la M8 con *primers* de  $\beta$ -tubulina. MP) Marcador de peso molecular 1 Kb. Bco) Blanco. M1) Muestra 1R1 (*P. Subgénero Aspergilloides*). M2) Muestra 2R2 (*P. citrinum*). M3) Muestra 3R2 (*P. rolfsii*). M4) Muestra 4R2 (*P. oxalicum*). M5) Muestra 5R2 (*P. Ser. Janthinella*). M6) Muestra 6R2 (*P. Ser. Oxalica*). M7) Muestra 7R2 (*P. Ser. Oxalica*). M8) Muestra 8R2 (*P. oxalicum*).

En el carril 1 (MP) se observa el marcador de peso molecular de 1Kb; en el carril 2 (Bco) se observa el control negativo en el cual no hay ningún amplificado; en el carril 3 (M1) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium* Subgénero *Aspergilloides;* en el carril 4 (M2) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium citrinum*; en el carril 5 (M3) no se observa ningún amplificado de la cepa identificada como *Penicillium citrinum*; en el carril 5 (M3) no se observa ningún amplificado de la cepa identificada como *Penicillium rolfsii* esto se podría atribuir probablemente a que la pureza dada por la relación 260/280 cuantificada es demasiado alta, indicando una contaminación por ARN (véase cuadro 3.4); en el carril 6 (M4) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum;* en el carril 7 (M5) se observa un amplificado de 500 pb para la cepa identificada como *Penicillium Ser*.

*Janthinella*; en el carril 8 (M6) se observa un amplificado de 500 pb para la cepa identificada como *Penicillium* Ser. *Oxalica*; en el carril 9 (M7) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *P*. Ser. *Oxalica* y en el carril 10 (M8) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum*.

En la Figura 3.20 se muestran los amplificados con los *primers* de  $\beta$ -tubulina de las diferentes especies de *Penicillium*.



**Figura 3.20.** Electroforesis de los amplificados de las cepas M9 a la M14 con *primers* de  $\beta$ -tubulina. 1) Marcador de peso molecular 1 Kb. 2) Blanco. M9) Muestra 9R1 (*P. madriti*). M10) Muestra 10R1 (*P. miczynskii*). M11) Muestra 11R1 (*P. oxalicum*). M12) Muestra 12R1 (*P. oxalicum*). M13) Muestra 13R1 (*P. Ser. Oxalica*). M14) Muestra 14R1 (*P. oxalicum*).

En el carril 1 (MP) se observa el marcador de peso molecular de 1 Kb; en el carril 2 (Bco) se observa el control negativo en el cual no hay ningún amplificado; en el carril 3 (M9) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium madriti*; en el carril 4 (M10) se observa un amplificado de 500 pb de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium miczynskii;* en el carril 5 (M11) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificado de 500 pb de serva un amplificado de 500 pb de la cepa identificado de 500 pb de serva un amplificado de 500 pb d

un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium* Ser. *Oxalica* y en el carril 8 (M14) se observa un amplificado de 500 pb de la cepa identificada como *Penicillium oxalicum*. Para obtener los amplificados con los *primers* de  $\beta$ -tubulina en las especies de *Penicillium* se realizó una PCR con una Tm de 55 °C, obteniendo un amplificado de 500 pb para la mayoría de las especies de *Penicillium*.

Estos resultados nos arrojan que como se observa en las figuras 3.19 y 3.20 el marcador de  $\beta$ -tubulina no presento diferencias y por lo tanto no sirve para diferenciar entre especies de *Penicillium* e identificarlas molecularmente.

#### CONCLUSIONES

- En el maíz analizado hubo alta incidencia de *Fusarium* spp. en la mayoría de las muestras. Aunque la presencia del *Penicillium* spp. fue menor, cobra mayor importancia debido a que hay un mayor número de especies micotoxígenicas que en *Fusarium* spp., lo cual indica un peligro a la salud, debido al mal manejo de los granos de maíz desde la cosecha hasta su transformación.
- Las especies identificadas morfológicamente en el maíz fueron: *P. oxalicum, P. citrinum, P. rolfsii, P. madriti y P. miczynskii.* Sin embargo hubo otras que no se lograron identificar debido a que no compartían todas las características en particular con alguna especie, por lo cual se decidió identificarlas hasta Subgénero y Serie como fueron: *P. Subgénero Aspergilloides, P. Ser. Oxalica y P. Ser. Janthinella.* La especie más común entre las muestras fue *P. oxalicum.*
- El mejor método para la extracción de ADN de las cepas de *Penicillium* fue el de Sambrook debido a que se obtienen grandes concentraciones y además una mejor pureza, sin embargo ambas extracciones tanto las obtenidas por medio del Kit y las obtenidas por el protocolo de Sambrook amplificaron en las pruebas de PCR con los *primers* de Calmodulina y β-tubulina.
- Se diseñaron *primers* específicos a partir del gen Cct8 para *P. oxalicum*, por medio de programas bioinformáticos. Se logró identificar *P. oxalicum* de una de las cepas.
- Se utilizaron *primers* de Calmodulina y β-tubulina; para lograr diferenciar entre especies de *Penicillium* con alta similitud filogenética. Para el caso de β-tubulina no se encontraron diferencias entre especies de *Penicillium*; sin embrago, para el caso de Calmodulina si se encontraron diferencias entre especies.
- La identificación morfológica de *Penicillium* spp. fue un método muy laborioso, tardado y se necesitó del apoyo de expertos en el área de micología; a diferencia de la identificación molecular que es un método más rápido y más confiable.

#### RECOMENDACIONES

- Estandarización de condiciones de temperatura y tiempo para los diferentes medios de cultivo; para que no varíen las características morfológicas de las cepas.
- Se recomienda una secuenciación para un mejor análisis de cada una de las especies de *Penicillium*.
- Realizar árboles filogenéticos para ver las especies cercanas y lejanas.
- Diseño de primers más específicos para cada especie
- Realizar PCR-RFLP que permita realizar cortes más precisos y nos permitan una mejor diferenciación entre especies.
- Análisis de las micotoxinas que producen las especies encontradas en este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

Agrios George, N. (1991). Manual de enfermedades de las plantas. México: 1ra Edición, Tomo 3; Ciencia y Técnica S.A.; pp. 1-397.

Allende, R., Picos, P.A., Márquez, I., Carrillo, J.A., García, R.S. y León, J. (2013). Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de pudrición de tallos y frutos de tomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 31, No. 1, pp. 13-19.

Araque, H. y Venezuela, A. (2012). *Engormix. Las Micotoxinas relacionadas con la sequía no son iguales a la Vomitoxina*. Recuperado el 10 de septiembre del 2014 de <u>http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/las-micotoxinas-relacionadas-con-</u> <u>t4465/p0.htm</u>

Asturias, M.A. (2004). Maíz de alimento sagrado a negocio del hambre. Quito-Ecuador. Acción Ecológica. Red por una América latina libre de transgénicos; pp. 1-111.

Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota: 4ta Edición, APS PRESS; pp.1-218.

Benítez, C.G. y Pfeiffer, H. (2006). El maíz: origen, composición química y morfología. *Materiales avanzados*. No. 7, pp. 15-20.

Birkinshaw, J.H. y Gowlland, A. (1962). Studies in the Biochemistry of Micro-organisms 110. Production and biosynthesis of orsellinic acid by *Penicillium madriti* G. Smith. *Biochemistry*. Vol. 84, pp. 342-347.

Blandon Martínez, J. C. (2010). Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo en el pienso de animales de renta. Tesis de Doctorado en Veterinaria. Facultad de Veterinaria de Barcelona, Universidad Autonoma de Barcelona, Bellaterra; pp. 1-173.

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). (2004). Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. México, D.F.: 4ta Edición, CIMMYT; pp. 1-112.

Cole, R. (1986). Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins. New York. ACADEMIC PRESS, INC., pp. 1-486.

Textura decoración. (2008). *Colores Pantone*. Recuperado el 6 de mayo del 2015 de http://www.instaladoresonline.com/colores\_pantone.html

Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México: 1a Edición, Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT; pp. 1-256.

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

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

FAO. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Recuperado el 10 de septiembre del 2014 de http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents.

FAO. (1993). La ingeniería en el desarrollo - Manejo y tratamiento de granos poscosecha.Recuperadoel28deagostodel2016dehttp://www.fao.org/docrep/x5041s/x5041S04.htm#Almacenamiento

FAO. (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Recuperado el 4 de Septiembre del 2014 de http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s00.htm

Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (FND). (2014). *Panorama del maíz*. Recuperado el 20 de septiembre del 2014 de <u>http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Ma%</u> C3%ADz%20(may%202014).pdf

Frisvad, J. y Samson, R. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Revista Studies in Mycology*. Vol. 49; pp. 1–174. 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.

Gallardo, E. D., Ibarra, G. M. y Sánchez, R. I. (2006). Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de Fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 24, No. 1, pp. 27-34.

García, J.C. (2013). *Papel de periódico. La nixtamalización del maíz*. Recuperado el 14 de septiembre del 2014 de <u>http://papeldeperiodico.com/2013/07/24/la-nixtamalizacion-del-maiz/</u>

Hernández, S., Reyes, M., García, J. y Mayek, N. (2007). Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 25, No. 2, pp. 127-133.

Houbraken, J. y Samson, R.A. (2011). Phylogeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*. Vol. 70, pp. 1-51.

Lastres, L. y Soza, F. (2009). Manual de sanidad vegetal: Programa para la agricultura sostenible en laderas de América Central. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana; pp. 1-75.

Lawley, R. (2009). Food Safety Watch. The science of safe food. Obtenido de A revolution in the microbiology laboratory. Recuperado el 14 de septiembre del 2014 de http://www.foodsafetywatch.org/features/a-revolution-in-the-microbiology-laboratory/

Link, H.F. (1809). Observationes in ordines plantarum naturales. *Dissertatio I. Magazine der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin.* No. 3, Vol. 1, pp. 3-42.

Martínez, E. (2003). Estudio de Especies Micotoxígenicas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Tesis de Doctorado en Veterinaria. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra; pp. 1-255.

Méndez, A. y Moreno, E. (2009). Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia*, Vol. 1, pp. 1-7.

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

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

Núñez, L. (2013). *Vía Orgánica. Producción de maíz en México y el mundo*. Recuperado el 19 de septiembre del 2014 de <u>http://viaorganica.org/produccion-de-maiz-en-mexico-y-el-mundo-2/</u>

Ochoa, J. L., Hernández, L. G., Latisnere, H., León, J. L. y Larralde, C. P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol. 5, No. 5, pp. 352-359.

Osca Lluch, J. M. (2001). Cultivos Herbaceos Extensivos: Cereales. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; pp. 1-252.

Palomares, J.C., Cuenca, M., Ferrer, C. y Colom, M.F. (2007). Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular. *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol. 1,pp. 20-1 a 20-14.

Perusia, O. y Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Rev. investig. vet.* Vol. 12, No. 2, pp. 87-116.

Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London. Academic Press Inc., pp. 1-633.

Pitt, J.I. (1980). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London. Academic Press, pp. 1-148.

Pitt, J. y Hocking, A. (2009). Fungi and Food Spoilage. New York: 3a Edición, Springer; pp. 1-519.

Presello, D.A., Botta, G. y Iglesias, J. (2004). Podredumbres de espiga de maíz y micotoxinas asociadas. *Revista Idia XXI*, Vol. 1,pp.152-157.

Promega (2009). *Wizard magnetic DNA purification system for food. Instructions for use of products FF3750 and FF3751*. Recuperado el 23 de marzo del 2016 de <u>https://worldwide.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/</u>wizard%20magnetic%20dna%20purification%20system%20for%20food%20protocol.pdf

Querci, M., Jermini, M. y Van den Eede, G. (2007). Análisis de la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en muestras de alimentos. Sección No. 4. Extracción y purificación de ADN. Italia: Comunidades Europeas; pp. 1-17.

Ragazzo, J., Gutierrez, A., Luna. G., Gómez, J. y Calderon, M. (2011). Molecular identification of the fungus causing postharvest rot in jackfruit. *Revista Mexicana de Micología*, Vol. 34, pp. 9-15.

Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A.J. y Hardisson, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 26, No. 6, pp. 1215-1226.

Rebufel, P. y Olavarría, J. (1989). Metodologías para la identificación de especies de hongos en granos básicos almacenados. *Programa Postcosecha, Estación Experimental La Platina, INIA*, pp. 85-90.

Rebuffel, P. (1988). Desarrollo de hongos en los granos. *Seminario Postcosecha de Granos en la Zona Sur*, pp. 17-20.

Rogers, K. (2015). *Encyclopedia Britannica. Gel electrophoresis*. Recuperado el 15 de enero del 2016 de http://global.britannica.com/science/gel-electrophoresis

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

Samson, R.A. y Pitt, J.I. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Amsterdam: 1ra Edición, Harwood Academic Publishers; pp. 1-524.

Samson, R., Houbraken, J., Thrane U., Frisvad, J. y Andersen, B. (2010). Food and Indoor fungi. Utrecht. CBS KNAW Fungal Biodiversity Center; pp. 1-390.

Santibáñez, R., Hernández, M., Montañez, O., Tapia, J., Martínez, J., y Avellaneda, J. (2011). Identificación y cuantificación de hongos micotoxigénicos en alimento para bovino. *Revista Ciencia y Tecnología*, Vol. 4, No. 1, pp. 19-23.

Scragg, A. (2005). Biotecnología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos. México: LIMUSA, Grupo Noriega Editores.

Serna Saldívar, S. R.O. (2013). Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. México, D.F.: 2da Edición, AGT Editor, S.A.; pp. 1-703.

SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2014). Avances de la Producción. Recuperado el 20 de Septiembre del 2014 de <u>http://www.gob.mx/siap/</u>

Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, Vo. 60, pp. 119-122.

Soriano del Castillo, J. (2007). Micotoxinas en Alimentos. España: Ediciones Díaz de Santos, pp. 1-424.

Stansfield, W. (1992). Genética. México: 3ra Edición, McGraw-Hill Interamericana.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, Vol. 2, No. 2, pp. 70-78.

Ustarroz, F., Saavedra, A., Errasquin, L., Bragachini, M., Casini, C. y Méndez, J. (2010). Maíz cadena de valor agregado: alternativas de transformación e industrialización. Manfredi, Córdoba, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; pp. 1-34.

Vázquez, G. (2013). Mejora de la eficacia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol en enfermedades de plantas hortícolas. Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Madrid; pp. 1-303.

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

Wainwright, M. (1995). Introducción a la Biotecnología de los Hongos. España: Acribia, S.A. de C.V., pp. 1-240.

Wagner, M. (2014). *Laboratorio de toxicología*. *Citreoviridina*. Resuperado el 20 de febrero del 2016 de http://www.toxicologia.unb.br/?pg=desc-noticias\_foco&id=23

# ANEXOS

A) Se realizaron medios de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA), Agar Extracto de Levadura (CYA), Extracto de Malta-Agar (MEA), Agar Nitrato Glicerol 25% (G25N) y CZAPEK.

# Medios de cultivo:

- ✓ PDA
  - 29.25 g Papa Dextrosa Agar
  - 750 mL de agua destilada
- ✓ CYA
  - 3.75 g Extracto de Levadura
  - 36.75 g Agar CZAPEK
  - 750 mL de agua destilada
- ✓ MEA
  - 15 g Dextrosa
  - 15 g Agar Bacteriológico
  - 15g Extracto de Malta
  - 1 g Peptona de Caseína
  - 750 mL de agua destilada
- ✓ G25N
  - 0.56 g CZAPEK
  - 2.77 g Extracto de Levadura
  - 9 g Agar
  - 187.5 g Glicerol
  - 750 mL de agua destilada
- ✓ CZAPEK
  - 36.75g CZAPEK
  - 750 mL de agua destilada

## Equipo

Autoclave FAMSA, Modelo HGER

Campana de flujo laminar, Precision Scientific

# Realización de medios de cultivo

- 1. Se pesaron los reactivos correspondientes a cada medio de cultivo y se vaciaron a un matraz de 1 Litro, además se debe de etiquetar.
- 2. Los reactivos se disolvieron en 750 ml de agua destilada, agitando y moviendo el matraz en forma circular.
- 3. Se le colocó un tapón de manta en la boquilla y posteriormente aluminio.
- El matraz se introdujo en la autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>, una temperatura de 120°C durante 15 minutos, para su correcta esterilización.
- 5. Una vez terminado este ciclo, se bajó la presión y la temperatura, para poder abrir y extraer el matraz de la autoclave.
- 6. Se prepararon las cajas Petri, necesarias para colocar los cultivos.
- 7. Se vació el medio cultivo en cada una de las cajas, hasta el límite que está marcado por una línea, se cerraron las cajas y se dejaron enfriar sin mover.
- 8. Se llenaron todas y cada una de las cajas Petri y se repitió el mismo procedimiento.
- Finalmente, cada caja se etiqueto y se incubo a 25°C aproximadamente durante 72 horas para observar si hay o no crecimiento de algún tipo de colonia de hongos o bacterias.



Figura 3.21 Medios de cultivo.

B) Claves de identificación morfológica.

Сера	Identificada como:	Claves	Referencia	
	Penicillium	Subgénero		
1	Subgénero	Aspergilloides	Pitt y Hocking, 2009	
	Aspergilloides	1		
		1-2-3 Subgénero		
2	Penicillium citrinum	Furcatum	Pitt y Hocking, 2009	
		1-2-5-6		
		Subgénero Furcatum		
3	Penicillium rolfsii	1-17-18- Serie	Pitt, 1979	
		oxálica 19-21-22-23		
		Subgénero Furcatum		
4	Penicillium oxalicum	1-17-18- Serie	Pitt, 1979	
		oxálica 19-21-22-23		
5	Penicillium Ser. Subgénero Furcatum		Ditt 1070	
5	Janthinella	1-2	r III, 1979	
6 13	Penicillium Ser.	Subgénero Furcatum	Pitt v Hocking 2009	
0, 15	Oxalica	1-2-3	The y Hocking, 2007	
7 8 11 12 14	Penicillium oralicum	Subgénero	Pitt v Hocking 2009	
7, 0, 11, 12, 14		Furcatum1-2-3	1 htt y 110eking, 2009	
		Subgénero Furcatum		
9	Penicillium madriti	1-17-18-Serie	Pitt, 1979	
		oxálica 19-21-25		
		1-2 Sección		
10	Penicillium	Divaricatum- 3-	Ditt 1070	
10	miczynskii	Serie Fellutana 12-	1111, 17/7	
		13-14-16		

# C) Diseño de *primers* para Penicillium oxalicum en PrimerQuest

mer	Quest						
say Des	sign / Results				/ He	lp / About	
Cct8 Ger	n Assay Set 1 Details						
Dook to J	Douitto						
Васкто	Results						
arame	ter Set: General PCR (Primers only)						
sequen	ce Name: Cots Gen						
Amplico	on Length: 449	Ctores .	See. 1	Lawath	<b>T</b>	0.0%	
Francisco	07400704400007704404 (0)	Start	Stop	Length	100	GC%	
Forward	CTACCTCAACCGCTTCAACA (Sense)	210	230	20	62	50	
Reverse		639	629	20	62	50	
	-						
Base	Sequence						GT
Base	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCCATTGA	TATCTCTCAGACCGAGACC	GGAAGAACA	GTCCTTTTGA	AGAATGC	CGAAGAGAIG	
<b>Base</b> 1 101	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCCATTGA ACTTCACCAAGGGCGAGGAGGACCGTCTCGAGGCCGCCATC	TATCTCTCAGACCGAGACC	ggaagaaca gcctgcgtg	GTCCTTTTGAA TGGTCGTTGC	AGAATGC( IGGTTCC)	AGTGTCGGTG	AC
<b>Base</b> 1 101 201	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCCATTGA ACTTCACCAAGGGCGAGGAGGACCGTCTCGAGGCCGCCATC TGCCATGCA <b>CTCAACCGCTTCAACA</b> TCCTTGTGATCA	TATCTCTCAGACCGAGACC AAGGAGTTGTACGACTCCG AGATTCTCTCCAAGTTTGA	GGAAGAACA GCCTGCGTG GCTCCGTCG	GTCCTTTTGAA TGGTCGTTGC TCTATGCCGA0	AGAATGC( IGGTTCC) GTTGTCG(	AGTGTCGGTG GTGCTACCCC	
<b>Base</b> 1 101 201 301	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCATTGA ACTTCACCAAGGGCGAGGAGGACCGTCTCGAGGCCGCCATC TGCCATGCACTACCTCAACGCTTCAACA CGCCGTCTGGGTGCCCCTATGCCCGACGAGATGGGCCAGAT	TATCTCTCAGACCGAGACC AAGGAGTTGTACGACTCCG AGATTCTCTCCAAGTTTGA CGATGTGGTCGAAACGACC	GGAAGAACA GCCTGCGTG GCTCCGTCG GAGATCGGT	GTCCTTTTGA TGGTCGTTGC TCTATGCCGA GGTGACCGTG	AGAATGC( IGGTTCCA GTTGTCG( ICACTGT?	CGAAGAGAIG AGTGTCGGTG GTGCTACCCC ITTCAGACAA	GAC
<b>Base</b> 1 101 201 301 401	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCATTGA ACTTCACCAAGGGCGAGGAGGACCGTCTCGAGGCCGCCATC TGCCATGCACTACCTCAACGCTCCAACATCGTTGGAGAA GCCCGTCTGGGTGCCCCTATGCCCGACGAGATGGGCCAGAT ACGCCAACGCCGTGACCCGCACATCAACAATTGTTCTGCGG	TATCTCTCAGACCGAGACC AAGGAGTTGTACGACTCCG AGATTCTCTCCAAGTTTGA CGATGTGGTCGAAACGACC GGCGCTACCCAGAACCACT	GGAAGAACA GCCTGCGTG GCTCCGTCG GAGATCGGT TGGATGACA	GTCCTTTTGAA TGGTCGTTGC TCTATGCCGAG GGTGACCGTG TTGAGCGTGC	AGAATGC( IGGTTCC <i>I</i> GTTGTCG( ICACTGT? GATCGAC(	AGTGTCGGTG GTGCTACCCC ITTCAGACAA GACGGTGTCA	GAC
<b>Base</b> 1 101 201 301 401 501	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCCATTGA ACTTCACCAAGGGCGAGGAGGACCGTCTCGAGGCCGCCATC TGCCATGCA <u>CTACCCCCAACGGCCACA</u> TCCTTGTGATCA GCCCGTCGGGTGCCCCTATGCCCGACGAGATGGGCCAGAT ACGCCAACGCCGTGACCCCGACATCAACAATTGTTCTGCGG CGTCAAGGCCATCACCAAGGACCCCCGCTGGTGCCCGGTG	TATCTCTCAGACCGAGACC AAGGAGTTGTACGACTCCG AGATTCTCTCCAAGTTTGA CGATGTGGTCGAAACGACC GGCGCTACCCAGAACCACT CCGGTGCCACCGAGATCCA	GGAAGAACA GCCTGCGTG GCTCCGTCG GAGATCGGT TGGATGACA GCTCGTGGA	GTCCTTTTGAZ TGGTCGTTGC? TCTATGCCGAG GGTGACCGTG? TTGAGCGTGCC GCGTATCTCC2	AGAATGCO FGGTTCCA GTTGTCGO FCACTGT GATCGACO AACTTCGO	AGTGTCGGTG GTGCTACCCC ITTCAGACAA GACGGTGTCA CCGACAAGAC	3AC 3CC 1GP 1AC
Base 1 101 201 301 401 501 601	Sequence GCCCAGAAGGCCAAGGTCGGCGTTTTCAGCTGCCCCATTGA ACTTCACCAAGGGCAAGGAGAGCCGTCTCGAGGCCGCCATC TGCCATGCA <u>CTAACCCCCTCAACA</u> TCCTTGTGATCA GCCCGTCTGGGTGCCCCTATGCCCGACGAGATGGGCCAGAT ACGCCAACGCCGTGACCCCGCACATCAACAATTGTTCTGCGG CGTCAAGGCCATCACCAAGGACCCCCGGTGGCCCCGGTG GGTCTTCCCCAGCACGCCATCGCAAATACGCCGAGGCC <b>T</b>	TATCTCTCAGACCGAGACC AAGGACTTCTACGACTCCG AGATTCTCTCCAAGTTGA CGATGTGGTCGAAACGACC GCCGCTACCAGAAACCACC CCGGTGCCACCGAGATCCA TGAGGTGATTCCTCCGCCACA	GGAAGAACA GCCTGCGTG GCTCCGTCG GAGATCGGT TGGATGACA GCTCGTGGA CTGGCCGAG	GTCCTTTTGAA TGGTCGTTGC' TCTATGCCGAG GGTGACCGTG' TTGAGCGTGCC GCGTATCTCCA TCTGCCGGTC'	AGAATGCO FGGTTCCA FTTGTCGO FCACTGTC GATCGACO AACTTCGO FCGATGCO	AGTGTCGGTG GTGCTACCCC ITTCAGACAA GACGGTGTCA CCGACAAGAC CACCGAGGTT	

Penicilli	IM oxalicum strain CBS 219.30 culture-collection CBS:219.30 Cct8 gene,			
partial c	ds	Customize view		
OreDeels IV				
GenBank: JN	121944.1	Analura ékia sasuanaa		
<u>FASTA</u> <u>Gra</u>	phics PopSet	Analyze this sequence		
		Run BLAST		
<u>Go to:</u> ₪		Pick Primers		
LOCUS	JN121944 723 bp DNA linear PLN 29-JUN-2015	Highlight Sequence Features		
DEFINITION	Penicillium oxalicum strain CBS 219.30 culture-collection	Find in this Paguanga		
	CBS:219.30 Cct8 gene, partial cds.	Find in this bequence		
ACCESSION	JN121944			
VERSION	JN121944.1 GI:372124406			
ROUDCE	Danizillium ausliaum	LinkOut to external resources		
OPGANTSM	Penicillum oxalicum Denicillium oxalicum	CBS 219.30 (strain passport)		
OKOMMIDN	<u>renterritam Gaarleam</u> Eukarvota: Fungi: Dikarva: Ascomvecta: Pezizomvectina:		[StrainInfo]	
	Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;			
	Penicilium.			
REFERENCE	1 (bases 1 to 723)	Related information		
AUTHORS	Houbraken, J. and Samson, R.A.	Full text in PMC		
TITLE	Phylogeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into			
	three families	PopSet		
JOURNAL	Stud. Mycol. 70 (1), 1-51 (2011)	Protein		
PUBMED	22308043 2 (hassa 1 to 703)	PubMed		
AUTHORS	2 (Dases 1 to 723) Houbraken J. and Samson R A.	-		
TITLE	Direct Submission	Taxonomy		
JOURNAL	Submitted (14-JUN-2011) Applied and Industrial Mycology, CBS-KNAW			
	Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, Utrecht 3584 CT, The		_	
	Netherlands	Recent activity		
FEATURES	Location/Qualifiers	Turr	n Off Clear	
sourc	1723		40.20	
	/organism="Penicillium oxalicum"	Penicillium oxalicum strain CBS 2	(19.30 9 Nucleotide	
	/mol_type="genomic DNA"		0 Nucleonide	
	/SUITUNE collection="CBS:210 30"	Genotypic identification of Penicill	ium	
	/durdare_concession obj. <u>223330</u> /db xref="taxon:69781"	expansum and the role of process	Ing PubMed	
mRNA	<1>723	Species-specific PCR to describe	local-	
	/product="Cct8"	scale distributions of four cryptic s	speci	
CDS	<1>723		Que more	
	/codon_start=1		See more	
	/product="Cct8"			
	/protein_id=" <u>AEX87613.1</u> "			
	/ap_xrei="Gl:3/21244U/" /lation=UlovAvyClugeContractment in the remainstractered r			
	77 IKEI AUGUI BAAAAGAGAGAUI TAHAI NBEMI I AILAL AKEL DDI GDAAGTADI 70 V ATAITATATAI — HÄVHVAAL OLE DI LATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT			
	LCAPMPDEMGOIDVETTEIGGDRVTVFROFDANAVTRTSTIVLRCATONHLDDIFRA			
	IDDGVNAVKAITKDPRLVPGAGATEIOLVERISNFADKTPGLPOHAIRKYAEAFEVIP			
	RTLAESAGLDATEVLSRLYTAHH"			

ORIGIN						
1	gcccagaagg	ccaaggtcgg	cgttttcagc	tgccccattg	atatetetea	gaccgagacc
61	ggaagaacag	tccttttgaa	gaatgccgaa	gagatggtca	acttcaccaa	gggcgaggag
121	gaccgtctcg	aggccgccat	caaggagttg	tacgactccg	gcctgcgtgt	ggtcgttgct
181	ggttccagtg	tcggtgacct	tgccatgcac	tacctcaacc	getteaacat	ccttgtgatc
241	aagattctct	ccaagtttga	gctccgtcgt	ctatgccgag	ttgtcggtgc	taccccctt
301	gcccgtctgg	gtgcccctat	gcccgacgag	atgggccaga	tcgatgtggt	cgaaacgacc
361	gagatcggtg	gtgaccgtgt	cactgttttc	agacaagaag	acgccaacgc	cgtgacccgc
421	acatcaacaa	ttgttctgcg	gggcgctacc	cagaaccact	tggatgacat	tgagcgtgcg
481	atcgacgacg	gtgtcaacgc	cgtcaaggcc	atcaccaagg	acccccgcct	ggtgcccggt
541	gccggtgcca	ccgagatcca	gctcgtggag	cgtatctcca	acttcgccga	caagaccccc
601	ggtcttcccc	agcacgccat	ccgcaaatac	gccgaggcct	ttgaggtgat	tcctcgcaca
661	ctggccgagt	ctgccggtct	cgatgccacc	gaggttctct	cccgcctgta	cactgcgcac
721	cac					
ORIGIN						
1	gcccagaag	g ccaaggtcg	g cgttttca	gc tgccccat	tg atatetet	ca gaccgagacc
61	ggaagaacag	g teettttga	a gaatgeeg	aa gagatggt	ca acttcaco	aa gggcgaggag
121	gaccgtctcc	aggccgcca	t caaggagt	tg tacgacto	cg gcctgcgt	at ggtcgttgct
181	ggttccagto	tcggtgacc	t toccatoc	ac tacctcaa	cc gcttcaad	at cottotoatc
241	aagattetet	ccaagtttg	a geteegte	gt ctatgccg	ag ttgtcggt	oc taccccctt
301	acceateta	g gtgccccta	t gcccgacg	ag atggggcca	ga togatoto	ort coaaacoacc
361	gagatcogt	g gtgaccgtg	t cactottt	tc agacaaga	ag acgccaad	coc cotoacccoc
421	acatcaacaa	a ttattetae	g gggcgcta	cc cagaacca	ct togatgad	at tgagcgtgcg
481	atcgacgacg	atatcaaca	c cotcaago	cc atcaccaa	dd ycccccd	ct aatacccaat
541	accaatacca	a cogagatoo	a getegtgg	ag cgtatctc	ca acttore	rga caagaccccc
601	gatetteece	adcacdcca	t concasat	sc accasaac	ct ttgaggtg	rat tectogeaca
661	ctaaccaaat	ctaccaata	t costocca	cc geogagge		ta cactogoa
721	cac	, ordeoddio	o ogaogoda	oo yayyotoo		jou cacegogodo
	Cac					