



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**"Identificación de *Fusarium verticillioides* en granos y
productos procesados de maíz mediante la Reacción
en Cadena de la Polimerasa"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

CERÓN ADAME ALEJANDRA

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA
COASESORA: M. EN M. JOSEFINA MORENO LARA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2018



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.



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

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

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

Identificación de *Fusarium verticillioides* en granos y productos procesados de maíz mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Que presenta la pasante: Alejandra Cerón Adame

Con número de cuenta: 413108960 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. José Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>Dra. Susana Patricia Miranda Castro</u>	
SECRETARIO	<u>I.A. Miriam Alvarez Velasco</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. María Guadalupe Amaya León</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza</u>	

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

LMCF/cga*

DEDICATORIAS

A Dios y los santos, por darme salud y vida para poder lograr mis metas y propósitos.

A mis padres, Raúl Ceron Alarcón y María Guadalupe Adame Díaz, primero por darme la vida, ser mis dos grandes pilares, ser mis dos ejemplos a seguir, mis guías en este mundo, darme todo lo necesario y mucho más, por su gran apoyo porque este logro es suyo también, gracias infinitas.

A mi hermanos, Raúl Cerón Adame y Montserrat Adame Regnier por ser mis grandes compañeros día a día, en las buenas y en las malas.

A mi abuela, María Ruth Díaz López, por cuidarme desde pequeña y llenarme de amor, por ser mi ejemplo de fortaleza y mi mayor amor.

A Erik Espinoza, Elda Godínez, Diana Laguna y Elihu Herrera por ser mis compañeros de esta gran aventura, por su enorme apoyo en cada semestre, su paciencia y por su amor incondicional.

Un agradecimiento especial al proyecto “Técnicas genómicas multidisciplinarias aplicadas en las ciencias de la salud y producción de alimentos” con la clave PIAPI1617.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma De México, por darme la oportunidad de lograr una de las metas más importantes en la mayor casa de estudios.

A la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán por ser mi alma mater, mi hogar por varios años y darme una formación académica, profesional y personal.

Al Dr. Francisco Montiel Sosa por su sabiduría brindada, por su asesoría y apoyo durante este proyecto.

A la Maestra Josefina Moreno Lara, por su tiempo, apoyo y consejos durante la experimentación y desarrollo de esta tesis, ayudándome a concluir con esta meta en mi vida, muchas gracias.

A la Maestra Miriam Álvarez Velasco por siempre tener una sonrisa que compartir, por transmitir esa buena energía siempre, por sus consejos brindados.

A mis sinodales, por su paciencia y tiempo para leer este trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos y observaciones.

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE CUADROS.....	10
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	11
Capítulo 1: Antecedentes.....	14
1.1. Maíz.....	14
1.1.1. Origen.....	14
1.1.2. Clasificación.....	15
1.1.3. Morfología del Maíz	19
1.1.4. Constitución del grano de Maíz	21
1.1.5. Usos.....	24
1.1.6. Producción mundial	27
1.1.7. Producción nacional.....	31
1.1.8. Consumo mundial	33
1.1.9. Consumo nacional.....	36
1.1.10. Importancia del maíz en el mundo	37
1.2. Hongos y enfermedades que atacan al maíz	38
1.2.1. Enfermedades en las hojas	39
1.2.2. Enfermedades en el tallo y mazorcas	40
1.3 Hongo <i>Fusarium verticillioides</i>	42
1.3.1. Taxonomía y morfología de <i>Fusarium verticillioides</i>	42
1.3.2. Temperatura y humedad para el crecimiento óptimo.....	43
1.3.3. Rutas de entrada y colonización del patógeno	43
1.3.4. Fumonisinas	45
1.3.5. Producción de fumonisinas	46
1.3.6. Daño que produce en humanos, plantas y animales	47
1.4. Técnicas para la identificación morfológica de los hongos.....	49
1.4.1. Medio de cultivo	50
1.4.2. Técnica para granos enteros	50
1.5. Técnicas moleculares para la detección de hongos.....	51
1.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	52

1.5.1.2. Fundamento de la PCR.....	53
1.5.1.3. Etapas de la PCR.....	53
1.5.1.4. Ventajas y desventajas.....	55
1.5.2. Electroforesis.....	56
Capítulo 2: Metodología.....	58
2.1. Justificación.....	58
2.2. Cuadro metodológico.....	60
2.3. Objetivo general.....	61
2.3.1. Objetivo Particular 1	61
2.3.2. Objetivo Particular 2	61
2.3.3. Objetivo Particular 3	61
2.3.4. Objetivo Particular 4	61
2.3.5. Objetivo Particular 5	61
2.4. Métodos y materiales	62
2.4.1. Materiales Biológicos	62
2.4.2. Medio de cultivo	63
2.4.3. Determinación de micobiota	63
2.4.4. Análisis de la micobiota.....	64
2.4.5. Extracción de ADN.....	64
2.4.6. Cuantificación de ADN	66
2.4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	67
2.4.8. Primers	68
2.4.9. Reacción en cadena de la polimerasa	68
2.4.10. Electroforesis.....	69
Capítulo 3: Resultados y Discusión	71
3.1. Resultados del objetivo 1.....	71
3.2. Resultados del objetivo 2.....	71
3.3. Resultados del objetivo 3.....	74
3.4. Resultados del objetivo 4.....	74
3.4. Resultados del objetivo 5	76
CONCLUSIONES	81

RECOMENDACIONES	84
Bibliografía	85
ANEXOS	89
Anexo 1. Evaluación de los primers	89
Anexo 2. Calculo de Tm.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación gráfica de la evolución de maíz a partir del teocintle.....	15
Figura 2 Corte del grano de maíz.....	20
Figura 3 La panta del maíz.....	21
Figura 4 Componentes físicos y químicos del grano de maíz, y productos derivados de procesos de industrialización.	23
Figura 5 Comparación de aminoácidos entre el maíz y la leche.....	24
Figura 6 Producción mundial de maíz, 2005/2006-2015/2016*.....	28
Figura 7 Producción mundial de maíz; a) Superficie cosechada, b) Rendimiento promedio .	29
Figura 8 Principales países productores, 2014/2015 y 2015/2016*.....	30
Figura 9 Principales estados productores de maíz grano en México, 2006-2014.....	31
Figura 10 Producción de maíz grano en México por tipo, 2005-2015*.....	32
Figura 11 Producción de maíz grano en México; e) Por ciclo agrícola, f) Por modalidad hídrica	32
Figura 12 Consumo mundial de maíz por uso, 2005/2006-2015/2016*.....	34
Figura 13 Principales países consumidores de maíz; a) Consumo total, b) Por tipo de consumo	35
Figura 14 Consumo de maíz grano en México, 2013-2015*.....	36
Figura 15 Consumo de maíz grano en México por tipo; i) Maíz blanco, j) Maíz amarillo.....	37
Figura 16 Producción mundial de cereales	38
Figura 17 <i>Fusarium verticillioides</i> , a) Microconidias de <i>F. verticillioides</i> producidas en esparadoquios, b) y en cadenas. (c-d) cultivos en agar papa-dextrosa.....	42
Figura 18 Rutas de entrada de <i>Fusarium verticillioides</i> a la plata del maíz	44
Figura 19 Estructura química de las fumonisinas	46
Figura 20 Pasos de un ciclo de la PCR	54
Figura 21 Amplificación exponencial del PCR.....	55
Figura 22 Electroforesis	57
Figura 23 Programa de la PCR para el termociclador.....	69
Figura 24 Gel de agarosa de muestra control de FV al 1% corrido a 90V. A) Marcador de peso molecular de 100 pb; B) Blanco; C) Cepa de <i>Fusarium verticillioides</i>	75
Figura 25 Gel de especificidad de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C-D) <i>Fusarium verticillioides</i> ; E) <i>Aspergillus flavus</i> ; F) <i>Penicillium oxalicum</i> ; G) Cerdo; H) Cacahuete; I) Calabaza.....	76
Figura 26 Gel de agarosa al 1% A) Marcador de molecular; B) Blanco; C) Maíz 1; D) Maíz 2; E) Maíz 3; F) Maíz 4; G) Maíz 5.	76
Figura 27 Gel de agarosa al 1% A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Maíz 6; D) Maíz 7; E) Maíz 8; F) Maíz 9.....	77
Figura 28 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Maíz 10; C) Maíz 11; D) Maíz 12; E) Maíz 13; F) Maíz 14; G) Blanco.....	77
Figura 29 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Maíz 15; D) Maíz 16; E) Maíz 17; F) Maíz 18.....	78
Figura 30 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Control positivo; D-E) M 1; F-G) M 2; H-I) M 3	79
Figura 31 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Control positivo; D-E) M 4; F) M 5; G-H) M 6.....	79
Figura 32 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Control positivo; D-E) M 7; F-G) M 8.....	80
Figura 33 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C-D) Control positivo; E-F) M 9; G-H) M 10.....	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Composición del maíz	22
Cuadro 2 Muestras de los granos de maíz.....	62
Cuadro 3 Muestras de los productos procesados de maíz.....	63
Cuadro 4 Componentes de la PCR.....	67
Cuadro 5 Primers para <i>Fusarium verticillioides</i>	68
Cuadro 6 Número de aislamientos	72
Cuadro 7 Cálculo de la frecuencia de aislamiento	73
Cuadro 8 Cálculo de la densidad relativa.....	73
Cuadro 9 Primers seleccionados	74

RESUMEN

En las semillas de maíz (*Zea mays L.*) uno de los patógenos más importantes es el *Fusarium verticillioides*. La presencia de hongos reduce el rendimiento y calidad del grano.

Este hongo es un patógeno necrótrofo y saprófito, por lo que es capaz de causar la muerte del tejido del hospedero y sobrevivir en el rastrojo. Este hongo filamentoso produce varias toxinas de las cuales, la fumonisina B1 es la más abundante. Esta micotoxina se acumula en granos y mazorcas por lo que el consumo de productos contaminados se ha asociado a distintos padecimientos en animales y humanos.

El objetivo fue identificar *Fusarium verticillioides* en granos y productos procesados de maíz, mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con ayuda de primers específicos.

Se realizó la metodología con una prueba de especificidad, en las que se utilizaron los primers del gen GaoB (galactosa oxidasa) que son específicos para *Fusarium verticillioides*. Para la identificación del hongo se aplicó la técnica de PCR, para eso se extrajo el ADN de 18 granos de maíz y 10 productos procesados a base de maíz, con el kit de Wizard Magnetic DNA Purification System for Food y mediante electroforesis se pudieron visualizar los resultados.

En la experimentación con respecto a los granos de maíz, se encontró la presencia de *Fusarium verticillioides* en algunas de las muestras por medios de cultivo (PDA), con respecto a los productos procesados a base de maíz no se encontró presencia del hongo en ellos.

Se concluye que la detección de *Fusarium verticillioides* en granos y productos procesados de maíz por la biología molecular fue rápida y específica.

INTRODUCCIÓN

El maíz es el principal cultivo en México, pues se siembra en ocho millones de hectáreas (Mha), lo que equivale a 50.98% de la superficie total de siembra, con un valor de producción de 79,596 millones de pesos, producción que se destina, sobre todo, al consumo humano y animal (SIAP, 2014).

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. Las panojas (a menudo, una por tallo) son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1 000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1 000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo.

El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado (FAO, 1993).

El valor nutricional del maíz es muy similar al de otros cereales, siendo algo superior al del trigo y solo ligeramente al del arroz (Martínez et. al., 2009).

Tradicionalmente el maíz había sido destinado fundamentalmente a la alimentación humana y animal. Sin embargo, en los últimos años con el avance en los conocimientos científicos y tecnológicos aplicados al estudio del maíz, se pueden obtener una variedad de productos a partir de este grano, incluidos los no alimentarios (SE, 2012)

El principal agente patógeno causante de la podredumbre de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) es *Fusarium verticillioides*, se inicia con la formación de micelios blancos, que van descendiendo desde la punta de la mazorca y dan una coloración rojiza a rosada a los granos infectados. Seguidamente se producen micotoxinas, particularmente las fumonisinas que tienen efectos tóxicos cuando son consumidos

por humanos y animales (Levin et al. 2003; Bush, et al. 2004).

Fusarium verticillioides ataca en todos los estados de crecimiento de la planta de maíz y a diferentes partes de la misma induciendo enfermedades de pre y postcosecha que causan reducción de rendimientos y afectan la calidad de la semilla (Schulthess et al. 2002). El patógeno produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo que disminuye su calidad (De la torre et al., 2014).

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) situó a la fumonisina B₁ dentro del grupo 2B, se encuentran catalogadas como posibles carcinógenos humanos. Con algunos daños a la salud: incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural, alteraciones neurológicas, preeclampsia, aborto espontáneo e incremento en la incidencia de algunos tipos de cáncer. (Torres S. & Lopez C., 2010).

En animales domésticos, aun cuando la toxicidad aguda de la fumonisina es baja, es la causa conocida de las enfermedades: la leucoencefalomalacia equina y el síndrome de edema pulmonar porcino (Harrison et al., 1990).

Por ende, se realizará la identificación del principal hongo patógeno en el maíz que es el *Fusarium verticillioides*, por identificación molecular a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, es un método eficaz y rápido, debido a que se puede identificar el hongo directamente en el grano reduce el tiempo para lograr su detección y evitar pérdidas económicas grandes, también se asegura la inocuidad del grano y del producto procesado para el consumo humano y animal.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1. Maíz

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado. (FAO, 1993).

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente «lo que sustenta la vida». El maíz, que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (FAO, 1993).

1.1.1. Origen

La teoría más aceptada sobre el origen señalada que este se derivó del teocintle anual mexicano *Zea mays ssp. Parviglumis* (Breable, G.W. 1938 y 1980; Buckler y Stevens, 2005; Doebley, 1983 y 2004; Doebley e Iltis, 1980; Doebley et al., 1987; Galinat, 1971, 1995 y 2001; Fukunaga et al., 2005; Iltis, 1983; Kato, 1976 y 1984; Matsuoka et al., 2002), y su domesticación se inició hace diez mil años aproximadamente, en la región central de la cuenca del Río Balsas (figura 1).

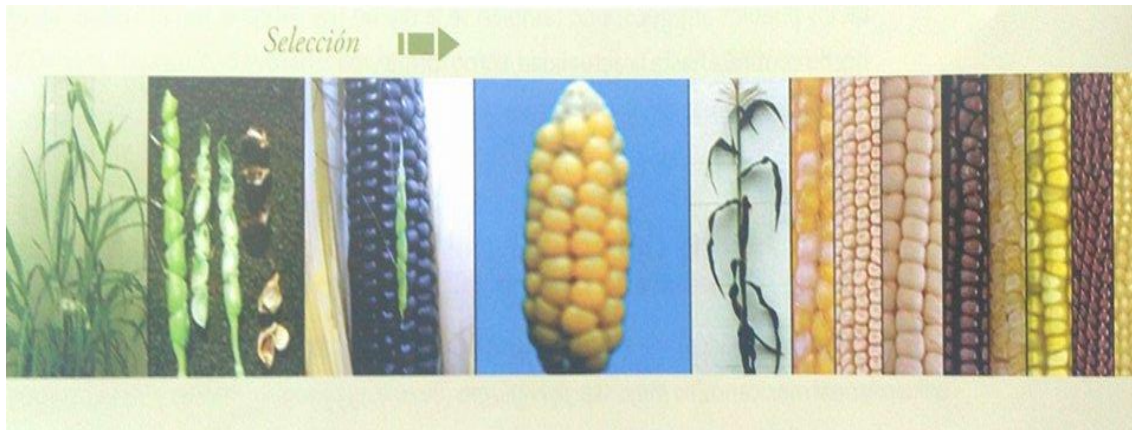


Figura 1 Representación gráfica de la evolución de maíz a partir del teocintle

1.1.2. Clasificación

Las diferentes tipos de clasificaciones mencionadas a continuación es según Gonzales Arguinzones, (2009):

Clasificación comercial del maíz

Desde el punto de vista de la compra-venta del maíz, este cereal se clasifica de la siguiente manera:

❖ Maíz blanco

El departamento de Agricultura de Estados Unidos indica que es el maíz formado por granos blancos, que pueden contener hasta 2% como máximo de otros colores. Los granos blancos ligeramente teñidos de color paja o rosa, se consideran como blancos con la condición de que el rosa cubra menos del 50% de la superficie del grano. Si la cobertura del color rosa es igual o mayor a 50%, serán considerados como granos de otros colores.

La norma oficial mexicana NOM-FF-34-1982 lo define como el maíz que corresponda a este color, que presenta un valor menor o igual al 5% de maíces amarillos y que contenga como máximo 5% de maíces oscuros (rojo, azul y morado). Un ligero tinte cremoso, pajizo o rosado, no influye para clasificarlos como blancos.

❖ Maíz amarillo

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos menciona que es el maíz compuesto por granos de color amarillo, y puede contener como máximo 5% de granos de otros colores. Los granos ligeramente teñidos de rojo se consideran como amarillos siempre y cuando el color rojo cubra menos de 50% del grano. Si no, se consideran como maíces de otros colores.

La norma oficial mexicana NOM-FF-34-1982 lo define como aquel maíz que corresponde a este color, que contenga hasta el 5% de maíces blancos y no más de 5% de maíces de otros colores.

❖ Maíz mezclado

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos menciona que todo maíz blanco y amarillo que presente valores que sobrepasan 2 y 5% respectivamente de granos de otros colores, serán clasificados como mezclados.

La norma oficial mexicana NOM-FF-34-1982 estipula dos tipos diferentes de mezclados:

- a) Mezclado 1. Lo define como todo aquel maíz blanco que contenga entre 5.1 y 10% de maíces amarillos, así como el maíz amarillo que presenta un valor entre 5.1 y 10% de maíces blancos. Ambos sin pasar sobrepasar 5% de maíces oscuros.
- b) Mezclado 2. Son aquellos maíces blancos que presentan más de 10% de maíces amarillos, así como los maíces amarillos que contengan más de 10% de granos blancos. Ambos sin sobrepasar 5% de maíces oscuros

❖ Maíz pinto

La norma oficial mexicana NOM-FF-34-1982 lo define como todo aquel maíz blanco, amarillo y mezclado que contenga más de un 5% de maíces oscuros (rojo, azul y morado).

Clasificación estructural del maíz

A excepción del tunicado, el maíz puede dividirse en varios grupos, en función de calidad, cantidad y patrón de composición del endospermo, en los siguientes tipos:

❖ Maíz harinoso

Se caracteriza por un endospermo harinoso, sin endospermo cristalino. Es de producción limitada en Estados Unidos. Es muy común en la región andina de Sudamérica. En México este tipo de maíz se usa para hacer pozole.

❖ Maíz dentado

Tiene una cantidad variable de endospermo corneo y harinoso. La parte cornea está a los lados y atrás del grano, mientras que la porción harinosa se localiza en la zona central y en corona del grano. Se caracteriza por una depresión en el grano, que se origina por la contracción del endospermo harinoso a medida que el grano se va secando. Se usa como alimento animal y materia prima industrial.

❖ Maíz corneo grado alimenticio

Es un típico híbrido de maíz de alta productividad y con características especiales (alto contenido de almidón corneo y olote blanco). Este maíz es especial para la molienda en seco, para fabricar frituras, grits, hojuelas y cerveza. Y para el cocimiento alcalino, al fin de manufacturar harinas para tortillas y otros productos.

❖ Maíz cristalino

Contiene una capa gruesa de endospermo cristalino, que cubre un pequeño centro harinoso. Generalmente el grano es liso y redondo. En Estados Unidos se produce poco; se siembra ampliamente en Argentina, en otras áreas de Latinoamérica y al sur de Europa, donde se usa de alimento animal y humano.

❖ Maíz palomero

Es una de las razas más primitivas y es una forma extrema de maíz cristalino. Se caracteriza por un endospermo cristalino muy duro, que solo tiene una pequeña

porción de endospermo harinoso. Sus granos son redondos y puntiagudos. Se emplea principalmente para consumo humano en la forma de palomitas (cotufas), dada su característica de expandirse al someterse al calor.

Clasificación especial del maíz

El maíz puede ser alterado genéticamente para producir modificaciones en el almidón, proteína, aceite y otras propiedades, como se menciona a continuación.

❖ Maíz waxi

La característica principal de este maíz es que su almidón está compuesto 100% de amilopectina, y es especial para la molienda húmeda, para obtener almidones para la industria y el área alimentaria, especialmente como estabilizante y espesante. La producción de almidón es inferior, entre 5% y 9% de la obtenida del maíz normal.

❖ Maíz alto en amilosa

La característica de este maíz es la proporción alta de amilosa que tiene. Actualmente hay 3 categorías de este maíz:

Clase V: con 40 a 60% de amilosa

Clase VII: con 60 a 80% de amilosa

Clase IX: con 90% de amilosa

Este maíz es desarrollado exclusivamente para la molienda húmeda. Y el almidón de este maíz es usado en textiles, adhesivos para cartón corrugado, en materiales de empaque y biodegradables y en caramelos de goma.

❖ Maíz con alto contenido de almidón

Es un híbrido estándar con niveles normales de aceite y proteína, y tiene de 69 a 72 % de almidón, este híbrido tiene facilidad de molienda, y la recuperación del almidón en gluten y de la cascarilla es mayor la molienda húmeda. La composición del almidón es de 22% de amilosa y 78% de amilopectina.

❖ Maíz alto en lisina

Este maíz es conocido como apaco-2 y tiene un alto contenido de lisina y de endospermo corneo y es desarrollado exclusivamente como alimento animal para aves de corral, cerdos y ganado lechero.

❖ Maíz con alto contenido de aceite

Este maíz tiene un contenido de aceite / a 6% en base seca, mientras que el maíz normal tiene aproximadamente 4.3%. es usado como ingrediente en los alimentos balanceados y para la producción de aceite para consumo humano.

❖ Maíz alto oleico/alto contenido de aceite

El aceite en el maíz estándar tiene cerca de 60% de ácido linoleico (grasa poliinsaturada) y aproximadamente 24% de aceite oleico (grasa saturada). La grasa con alto contenido de oleico tiene aproximadamente 48% de ácido linoleico y 34% de ácido oleico.

El maíz con alto oleico y alto contenido de aceite tiene ligeramente arriba de 60% de ácido oleico y 22% de ácido linoleico. En los cerdos esta composición puede causar una grasa más firme y más estable, extendiendo la frescura.

❖ Maíz con baja fitasa

Este maíz provee más fósforo disponible que el maíz amarillo estándar en la alimentación animal y reduce la necesidad de añadir fosforo suplementario cuando se alimenta a las aves de corral y a los rumiantes.

1.1.3. Morfología del Maíz

El fruto de la planta del maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es un cariósido y agrícolamente se le conoce como semilla.

En la figura 2 se indica el diagrama de un grano de maíz y el nombre de sus partes:

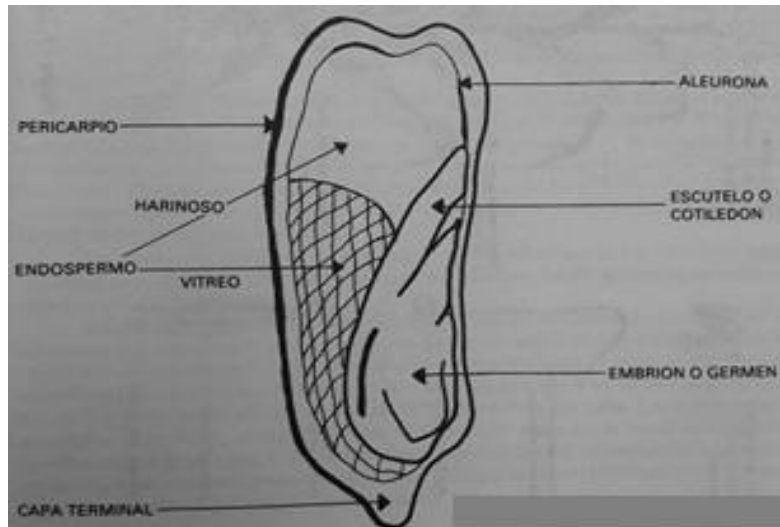


Figura 2 Corte del grano de maíz

Pericarpio: cubierta del fruto, de origen materno, se conoce como testa, ollejo o cascara. Contiene almidón, grasa, proteínas, cenizas, azúcares y fibra (carbohidratos no amiláceos como celulosa y hemicelulosa).

Aleurona: capa de células del endospermo, de naturaleza proteica.

Endospermo: tejido de reserva de la semilla que alimenta al embrión durante la germinación. Es la parte de mayor volumen, dos regiones bien diferenciadas hay en el endospermo suave o harinoso y el duro o endospermo vítreo. La porción depende de la variedad. Ahí se encuentra la mayor cantidad del almidón (el 86.6% promedio del almidón total del grano) y contiene además, las proteínas: albuminas, globulinas, prolamina (zeína) y glutelinas (gluten del maíz) y en escasas cantidades grasas (aceite), cenizas y azúcares.

Escutelo o cotiledón: parte del embrión

Embrión o germen: planta en miniatura con la estructura para originar una nueva planta, al germinar la semilla. Contiene la mayor cantidad de grasa (aceite) del grano (34.4% promedio. Biológicamente tiene más valor nutritivo en las proteínas:

albúminas, globulinas, glutelinas (más %) y escasa zeína (prolaminas).

Capa terminal: parte que se une al olote, con una estructura esponjosa, adaptada para la rápida absorción de humedad. Entre esta capa y la base del germen se encuentra un tejido negro conocido como capa hilar, la cual funciona como un mecanismo sellante durante la maduración del grano (La formación de la capa negra indica grano maduro).

En la figura 3 se muestra los diagramas de la planta del maíz con macollo o hijo y sin él.

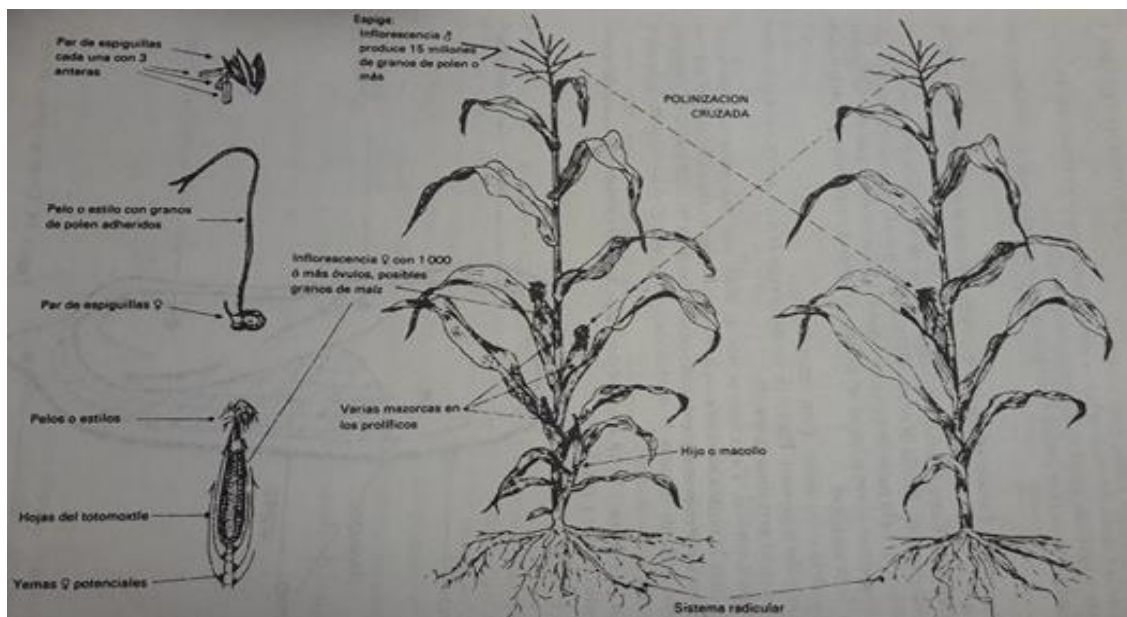


Figura 3 La planta del maíz

(Reyes Castañeda, 1990)

1.1.4. Constitución del grano de Maíz

Los granos de maíz están constituidos principalmente por tres partes: la cascarilla, el endospermo y el germen. 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, el cual tiene la función de nutrir a la planta cuando comienza el periodo de crecimiento, así como otras muchas sustancias necesarias durante el proceso de germinación y desarrollo de la planta.

El cuadro siguiente muestra la composición del maíz seco y tierno por cada 100 gramos:

Cuadro 1 Composición del maíz

Composición del maíz por cada 100 gr.		
	Seco	Fresco
Agua	10,3 gr.	75,9 gr.
Energía	365 Kcal	86 Kcal
Grasa	4,7 gr.	1,18 gr.
Proteína	9,4 gr.	3,22 gr.
Hidratos de carbono	74,2 gr.	19,02 gr.
Fibra	1 gr.	2,7 gr.
Potasio	287 mg	270 mg
Fosforo	210 mg	89 mg
Hierro	2,7 mg	0,52 mg
Sodio	35 mg	15 mg
Manganeso	0,48 mg	0,16 mg
Magnesio	127 mg	37 mg
Calcio	7 mg	2 mg
Cinc	2,21 mg	0,45 mg
Selenio	15,5 mcg	0,6 mcg
Vitamina C	0	6.8 mg
Vitamina A	469 UI	281 UI
Vitamina B1 (tiamina)	0,38 mg	0,20 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	0,20 mg	0,06 mg
Vitamina E	0,78 mg	0,090 mg
Niacina	3,62 mg	1,7 mg

(Rimache Artica , 2008)

En la figura 4 se muestra la composición del grano de maíz y algunos de los productos procesados que se pueden obtener del maíz, utilizados ampliamente en diferentes industrias.

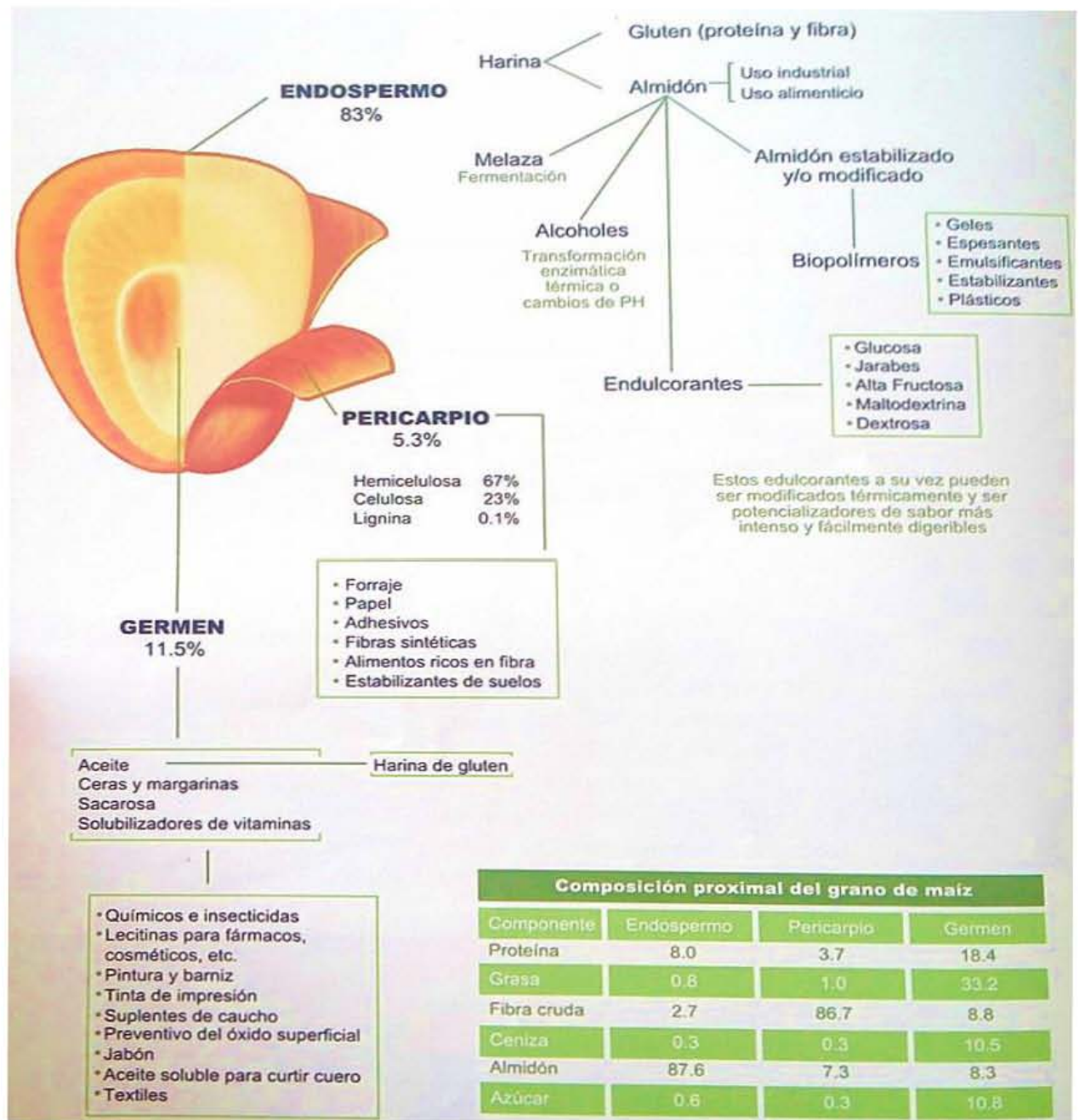


Figura 4 Componentes físicos y químicos del grano de maíz, y productos derivados de procesos de industrialización.

(Preciado et al, 2013)

La proteína del maíz contiene todos los aminoácidos esenciales, aunque en una proporción inferior a la ideal en algunos de ellos, especialmente la lisina y el triptófano (figura 5).

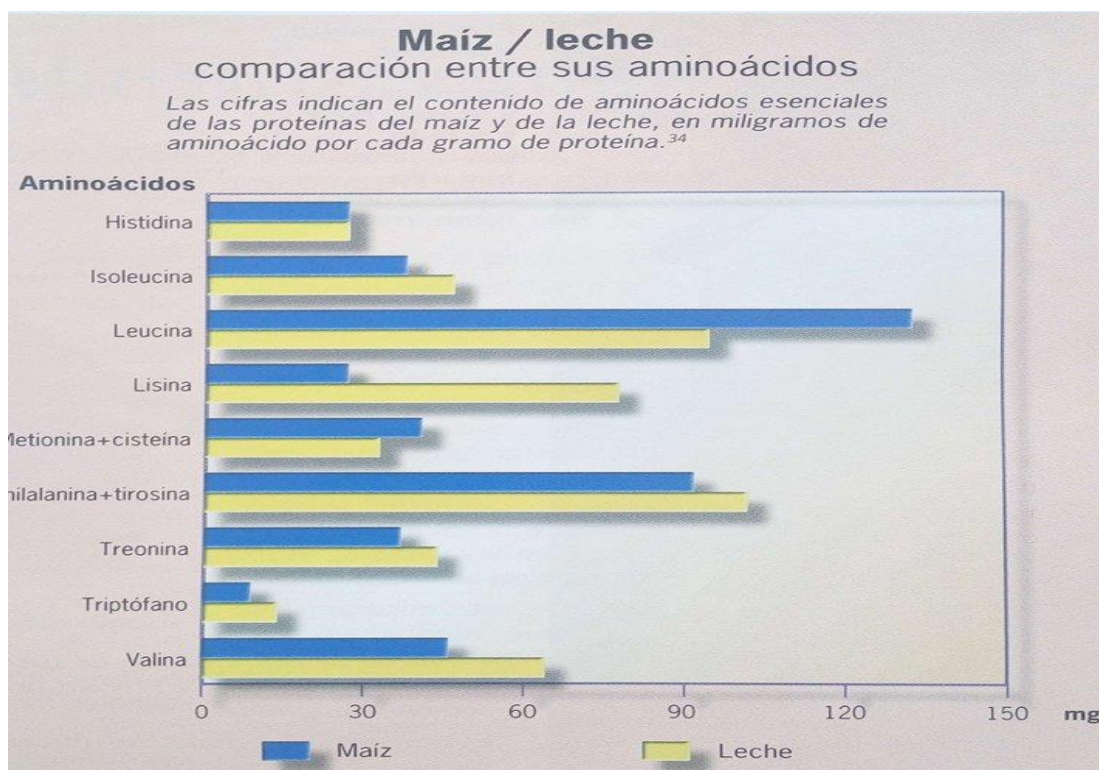


Figura 5 Comparación de aminoácidos entre el maíz y la leche

(Pamplona. 2008)

1.1.5. Usos

El maíz es usado en formas distintas según la FAO, (2001) principalmente se usa como alimento humano, ya sea doméstico o industrial; alimento para animales y fermentado para varios productos industriales.

El maíz es, desde un punto de vista nutricional, superior a muchos otros cereales.

A. Uso del maíz como alimento humano:

La mayor variedad se encuentra en México, América Latina y África Sub-Sahariana,

donde es un alimento básico.

Se describieron varias formas en las que es consumido el maíz en el mundo, como:

B. Mazorcas verdes

- Asadas al carbón.
- Hervidas en agua salada.
- Mazorcas tostadas enteras.
- El jugo extraído de los granos frescos, condimentado, cocido y llevado a punto de gelatina.
- Los granos frescos sueltos para hacer sopas como hortalizas o son secados y envasados.
- Granos frescos sueltos molidos hasta forma pastosa y sin fermentar como sopa.
- Fermentando la pasta unos días para varios tipos de potajes o budines.

C. Granos maduros secos

i. Granos enteros

- Los granos tostados.
- El maíz duro y maíz reventón se coloca en arena o recipiente caliente y se hacen reventar.
- El maíz harinoso tostado.
- Los granos hervidos se consumen enteros.
- Los granos hervidos y machacados hasta hacer una pulpa similar al arroz hervido.
- Los granos cocidos en agua con cal después de haberles quitado el pericarpio; pozole.
- Los granos remojados, fermentados y molidos húmedos llevados a un estado pastoso.

ii. Granos secos molidos para producir harinas

- Para hacer una pasta cocida, con o sin fermentación.
- Para hacer una masa para preparar pan sin fermentación.

- Para hacer una masa fermentada.
- Para harina de maíz.
- Granos quebrados con o sin germen hervidos o consumidos como arroz.
- iii. Los granos remojados y cocidos, hechos una pasta
 - Granos remojados, cocidos y pelados se les quita el germen total o parcialmente, se parten y se comen como arroz.
 - Similar a la anterior los granos partidos se preparan en una pasta.
 - Las gachas de maíz, fermentados o no, se preparan en bebidas dulces
- iv. Productos de maíz nixtamalizado
 - Los granos remojados y cocidos en agua con cal son pelados y molidos hasta formar una masa usada para hacer “tortillas, tamales”.
 - La masa seca mencionada anteriormente se hace en tiras en varios platos y para hacer harinas compuestas.
- v. Almidón de maíz cocido con o sin fermentación.

D. Maíz para forraje como alimento para ganado y aves

- La planta de maíz es un excelente forraje para el ganado, especialmente para las vacas lecheras y los animales de tiro.
- El maíz con los granos en estado pastoso es el más adecuado para usar como forraje y contiene más materia seca y elementos digestibles.
- Los restos del maíz que quedan después de la cosecha también se usa como forraje, sobre todo las plantas que permanecen verdes y erectas.
- Por su alto contenido de almidón y su bajo contenido de fibra hacen que sea una alta fuente de concentración de energía para la producción de ganado.
- El maíz amarillo es preferido para la alimentación del ganado y se le da como grano entero, roto o molido gruesamente, seco o cocido al vapor y suplementado con vitaminas o proteínas.
- El uso de maíz con proteínas de calidad como alimento animal muestra un buen potencial para la producción de cerdos.

E. Procesamiento industrial del maíz

Estos productos incluyen:

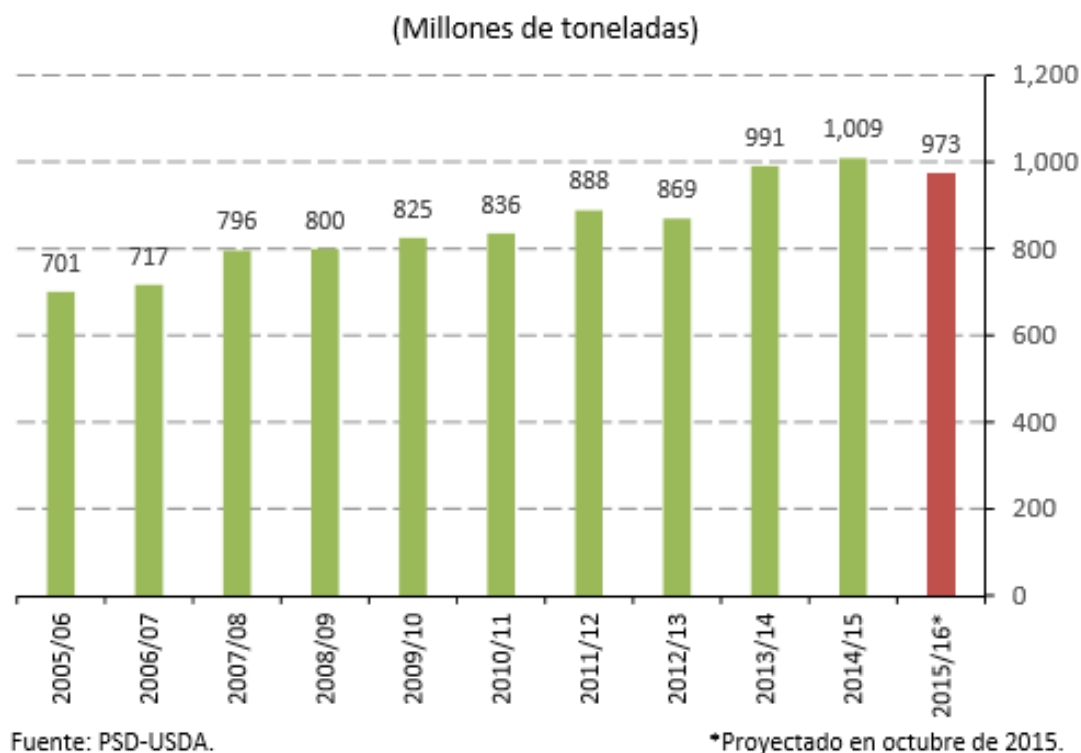
- Tortillas, harinas de maíz, masa, bocadillos, cereales para el desayuno, espesantes, pastas, jarabes, endulzantes, aceites de maíz, bebidas sin alcohol, cerveza, etc.

El proceso de molienda húmeda se usa para la producción de

- almidón puro, endulzantes, dextrosa, fructosa, glucosa y jarabes, incluyendo jarabe de fructosa con proteínas, almidón industrial, fibras, etanol y aceite de maíz a partir del germen.

1.1.6. Producción mundial

Entre los ciclos comerciales 2004/2005 y 2014/2015, la producción de maíz en el mundo (figura 6) presenta un crecimiento promedio anual de 3,5 por ciento, para ubicarse en este último en 1,008.7 millones de toneladas, lo que representa el nivel de producción más alto de la historia. Las expectativas para el 2015/2016 ubican una producción mundial de maíz con una reducción de 3.6 por ciento en relación a 2014/2015, o que se traduce en 972.6 millones de toneladas. (Fideicomisos Instituidos en la Relación con la Agricultura FIRA, 2015).



*Figura 6 Producción mundial de maíz, 2005/2006-2015/2016**

El volumen de producción histórico alcanzando en 2014/2015 derivó de una superficie cosechada (figura 7a) de 178.8 millones de hectáreas y rendimientos promedio (figura 7b) de 5.64 toneladas por hectárea, mismos que se ubican como el rendimiento más alto de la historia. El descenso estimado en el volumen de producción en el ciclo 2015/2016 será consecuencia de una reducción de 1.0 por ciento en la superficie cosechada global, lo que traduce en 177.1 millones de hectáreas, así como una reducción de 0.15 toneladas en los rendimientos por hectárea estimados, mismos que se estiman en 5.49 toneladas por hectárea (FIRA, 2015)

La reducción esperada en la superficie cosechada de maíz en el mundo es estimulada por las expectativas de reducción en la superficie cosechada de Estados Unidos y Brasil, consecuencia de los bajos precios del grano observados durante los últimos meses recientes que desincentivan a los productores de maíz en esos países (FIRA, 2015).

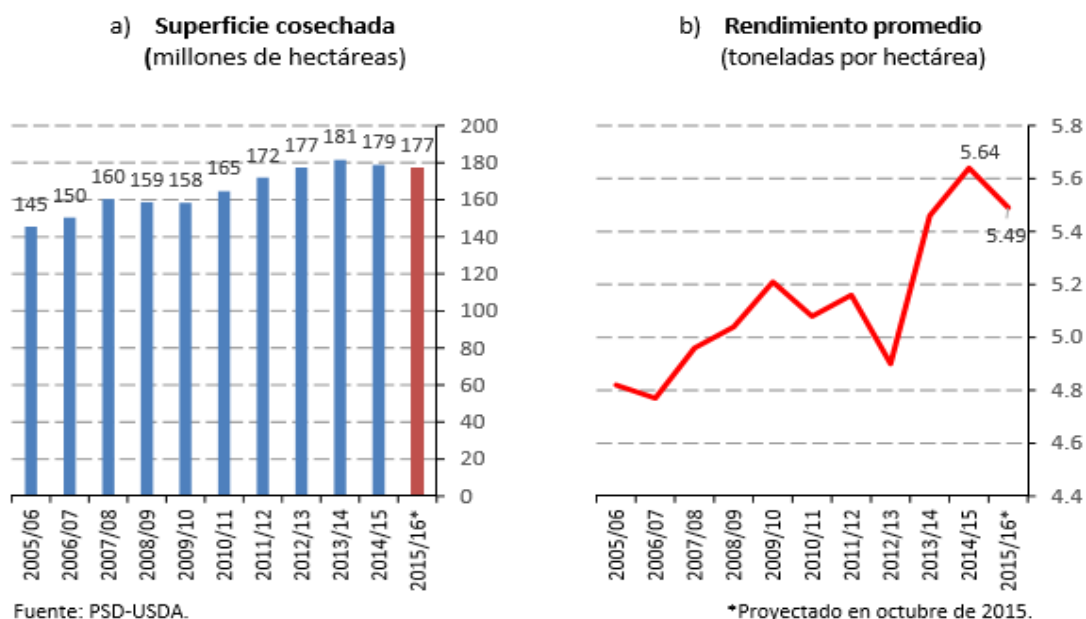
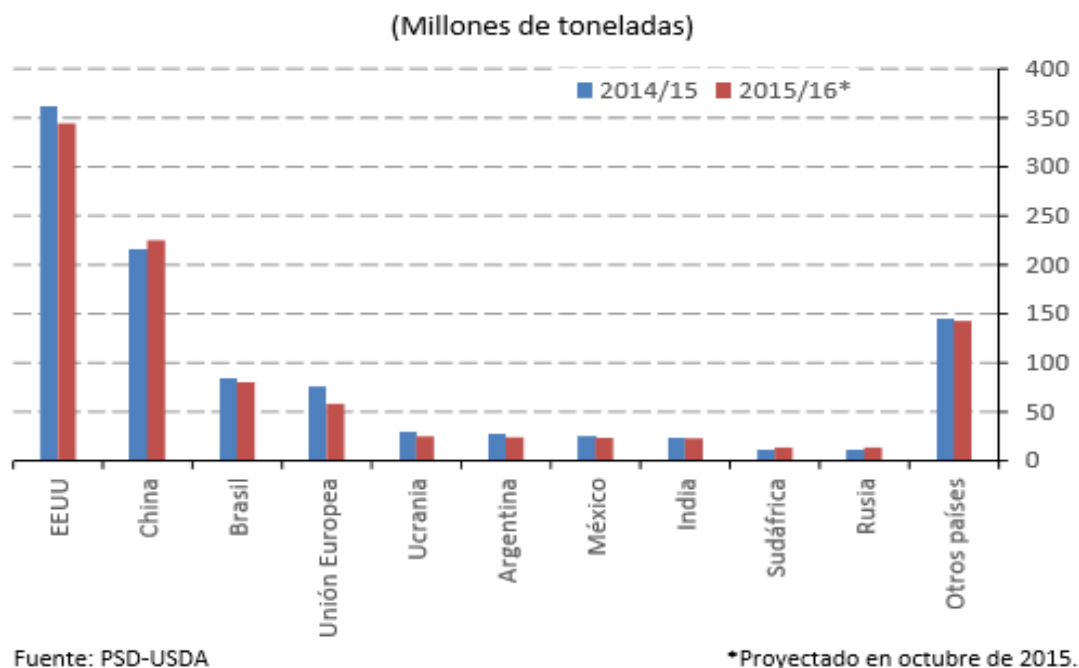


Figura 7 Producción mundial de maíz; a) Superficie cosechada, b) Rendimiento promedio

La producción estimada para el ciclo 2015/2016 en los principales países productores se (figura 8) ubica a la baja, con excepción de la producción en China. Por un lado, la producción en Estados Unidos, el principal productor de maíz en el mundo con una participación de 35.9 por ciento de la producción total mundial, se estima con un descenso de 4.6 por ciento en relación al ciclo 2014/2015, lo que se traduce en 344.3 millones de toneladas (FIRA, 2015).

De igual manera, la producción en Brasil, la Unión Europea y Ucrania, tercer, cuarto y quinto productor mundial respectivamente, estiman reducciones significativas en su producción. USDA estima que la producción brasileña caiga un 5.9 por ciento, para ubicarse en 80.0 millones de toneladas (FIRA, 2015).



*Figura 8 Principales países productores, 2014/2015 y 2015/2016**

En la Unión Europea se estima un marcado descenso de 23.4 por ciento en la producción de maíz para el ciclo comercial 2015/2016, para ubicarse en 58.0 millones de toneladas, el nivel de producción más bajo de los últimos ocho años. La reducción es resultado del descenso en los rendimientos por hectárea estimados en prácticamente todos los países productores de la Unión Europea consecuencia del verano con temperaturas excesivamente altas y condiciones de sequía. El rendimiento promedio en la Unión Europea se estima en 6.31 toneladas por hectárea, un 20.6 por ciento por debajo de los rendimientos en el último ciclo comercial (FIRA, 2015).

En Ucrania las condiciones de sequía y altas temperaturas también afectan el desarrollo del cultivo. Las estimaciones de producción 2015/2016 observan una reducción de 12.1 por ciento en la producción Ucraniana, para ubicarse en 25 millones de toneladas.

Por otro lado, la producción en China, el segundo productor y consumidor mundial de grano, se estima con un crecimiento anual de 4.3% en relación en el ciclo 2015/2016. Lo anterior ante el incremento de 2.1 en la superficie cosechada de maíz, misma que se explica por los atractivos precios mínimos ofrecidos en el mercado interno por el

gobierno chino (FIRA, 2015).

1.1.7. Producción nacional

Durante el año agrícola 2014 diez estados concentraron el 80 por ciento de la producción nacional de maíz grano (figura 9). Sinaloa se ubica como el principal productor de maíz en el país con una participación de 15.8 por ciento en 2014, lo cual representa un volumen de 3.7 millones de toneladas. En segundo lugar se encuentra Jalisco con 14.9 por ciento de participación y un volumen de producción de 3.5 millones de toneladas en 2014. En tercer lugar se encuentra Michoacán con una participación de 8.3 por ciento del total y un volumen de 1.9 millones de toneladas (FIRA, 2015).

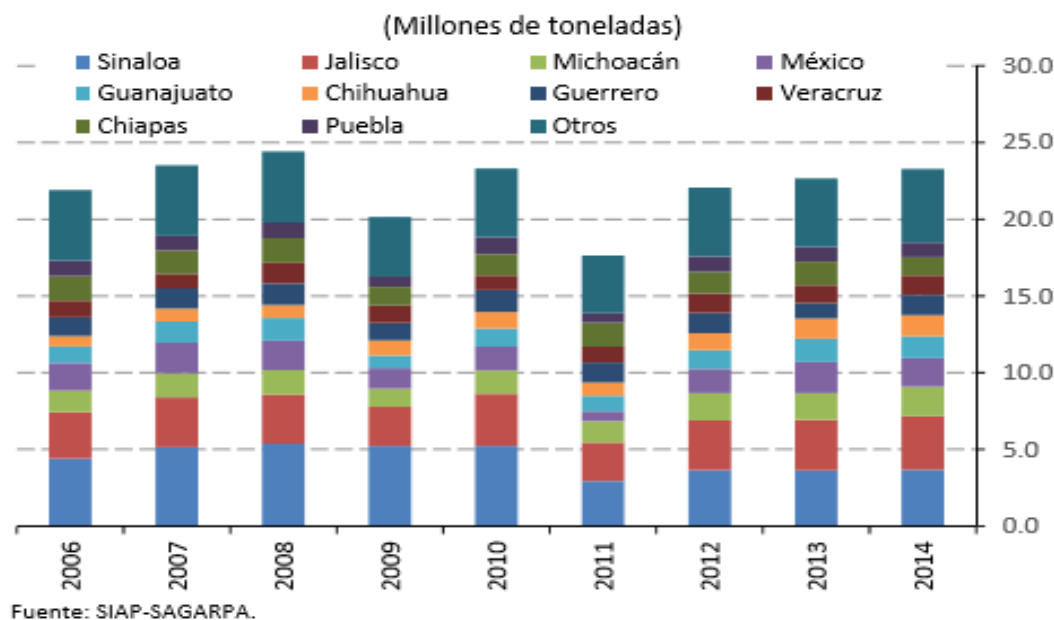


Figura 9 Principales estados productores de maíz grano en México, 2006-2014

La figura 10 por tipo de maíz muestra que durante el año agrícola 2014 el 89.0 por ciento de la producción total correspondió a maíz blanco, 10.4 por ciento maíz amarillo y el restante 0.6 por ciento a otros tipos de maíz. Es de resaltar que la proporción de maíz amarillo se ha incrementado de 4.9 por ciento en el año agrícola 2004 a 10.4 en 2014.

El programa de producción 2015 de SIAP- SAGARPA estima un incremento a tasa anual del 7.2 por ciento para ubicarse en 24.95 millones de toneladas, el nivel más

alto de los últimos quince años en el país (FIRA, 2015).

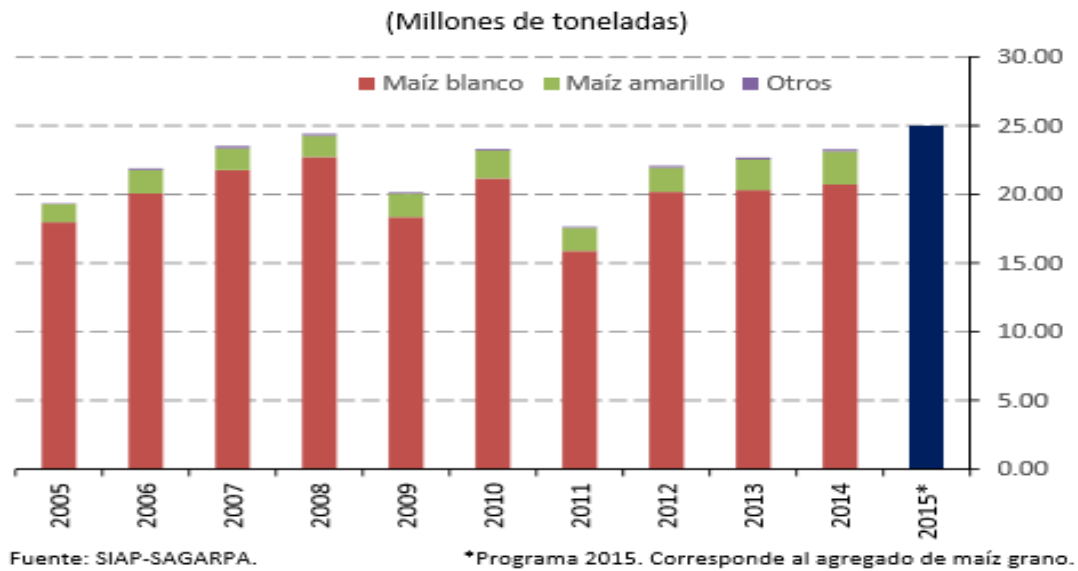


Figura 10 Producción de maíz grano en México por tipo, 2005-2015*

Por ciclo agrícola (Figura 11e), la producción de maíz en México ocurre mayormente durante el ciclo otoño- invierno. Así, durante el año agrícola 2014 el 77.2 por ciento de la producción de maíz provino del ciclo Primavera- Verano, mientras que el restante 22.8 por ciento se produjo en Otoño- Invierno. La proporción en el año agrícola 2015 se estima sin cambios (FIRA, 2015).

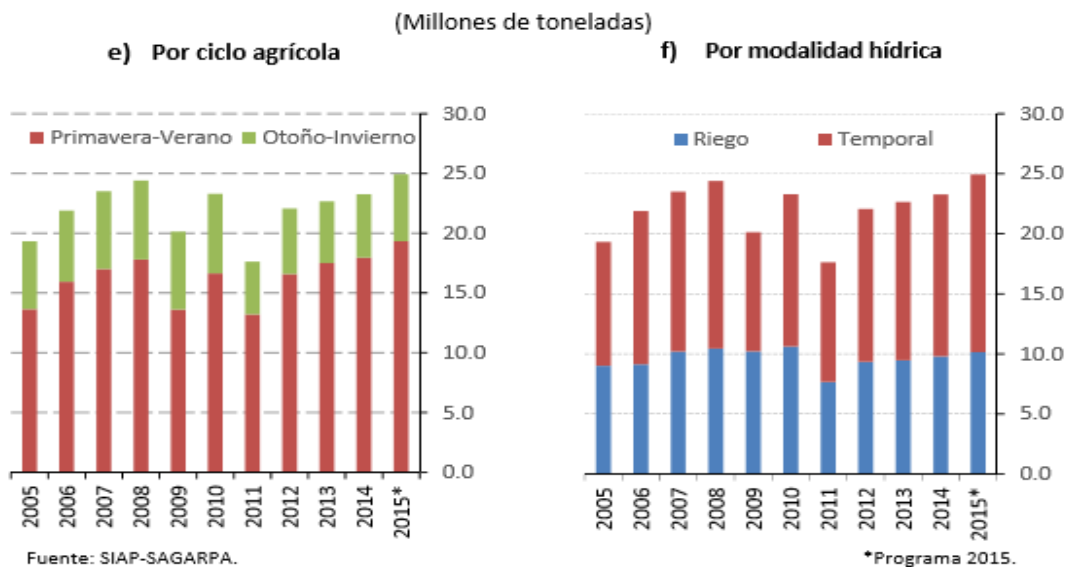


Figura 11 Producción de maíz grano en México; e) Por ciclo agrícola, f) Por

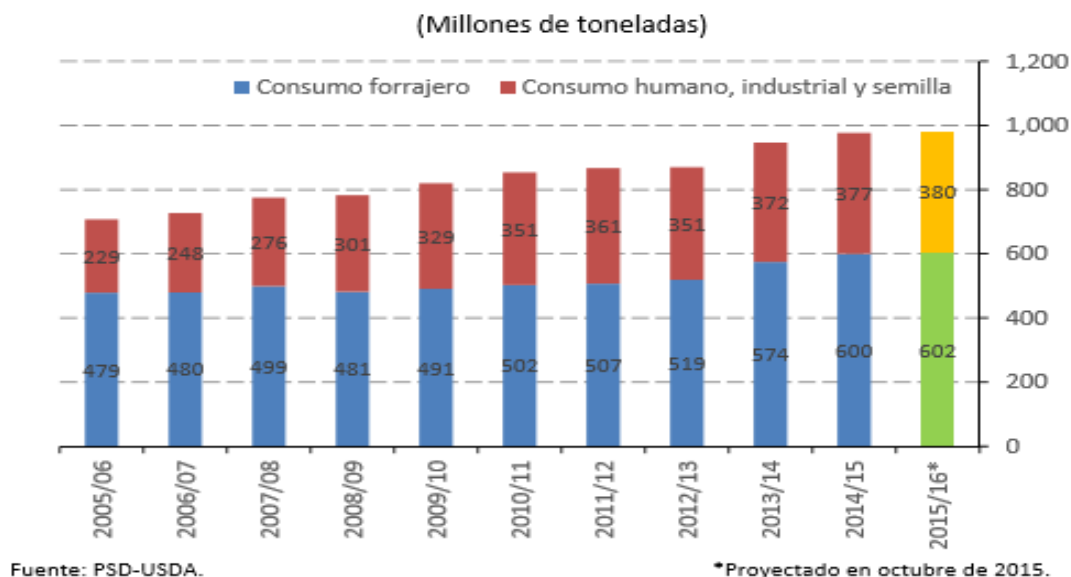
modalidad hídrica

Considerando la modalidad hídrica (Figura 11f), la producción de maíz bajo riego en el país muestra un menor dinamismo que el crecimiento en la producción de temporal. Durante los últimos 10 años la producción bajo riego ha crecido a una tasa media anual de 1.2 por ciento mientras que la producción bajo temporal ha crecido 3.7 por ciento. Lo anterior se explica por la reducción en la superficie cosechada bajo modalidad riego, toda vez que entre los años agrícolas 2005 y 2015 la superficie cosechada bajo riego presenta una tasa de crecimiento negativa de 0.5 por ciento; es decir, la superficie bajo riego ha disminuido en relación al 2005. Lo anterior podría explicarse por la reconversión productiva de dicha superficie hacia cultivos con mayores perspectivas de rentabilidad (FIRA, 2015).

Por otro lado, la superficie bajo temporal se ha incrementado a una tasa media anual de 1.7 por ciento entre 2005 y 2015, para ubicarse en 5.8 millones de hectáreas durante 2014. SIAP- SAGARPA estiman un incremento de 6.8 por ciento en la superficie de temporal durante el ciclo 2015 (FIRA, 2015).

1.1.8. Consumo mundial

El consumo mundial de maíz (figura 12) continúa creciendo de manera sostenida impulsado por crecimientos tanto en el consumo forrajero como en el consumo humano e industrial. Así, entre los ciclos comerciales 2004/2005 y 2014/2015 el consumo total del grano ha crecido a una tasa media anual de 3.6 por ciento; desagregado por tipo de consumo, el consumo forrajero ha crecido a una tasa media anual de 2.3 por ciento mientras que el consumo humano e industrial ha crecido 5.9 por ciento en promedio en el mismo periodo (FIRA, 2015).



*Figura 12 Consumo mundial de maíz por uso, 2005/2006-2015/2016**

Las expectativas para el 2015/2016 sitúan el consumo mundial de maíz con un crecimiento de 0.6 por ciento, lo que representan 982.2 millones de toneladas, 5.5 millones de toneladas más que durante 2014/2015. Dicho crecimiento resulta de incrementos de 0.5 por ciento en el consumo forrajero y 0.7 por ciento en el consumo humano (figura 13b), industrial y semilla, los cuales se situarán en 602.5 y 379.7 millones de toneladas, respectivamente (FIRA, 2015).

Ocho países concentran el 75.6 por ciento del consumo total mundial (figura 13a). El consumo de dichos países presenta una tendencia creciente durante los últimos años. Así, durante el ciclo comercial 2014/2015, el volumen de consumo en Estados Unidos, el principal país consumidor de maíz en el mundo, se colocó en 301.9 millones de toneladas, de las cuales el 55.3 por ciento corresponden a consumo humano, industrial y semilla, y el restante 44.7 por ciento corresponde a consumo forrajero. Las estimaciones de USDA consideran un incremento marginal de 0.2 por ciento en el consumo estadounidense para el ciclo comercial 2015/2016, impulsado por incrementos en el consumo humano e industrial (principalmente en la industria del etanol), toda vez que el consumo forrajero se estima estancado en relación al ciclo comercial anterior (FIRA, 2015).

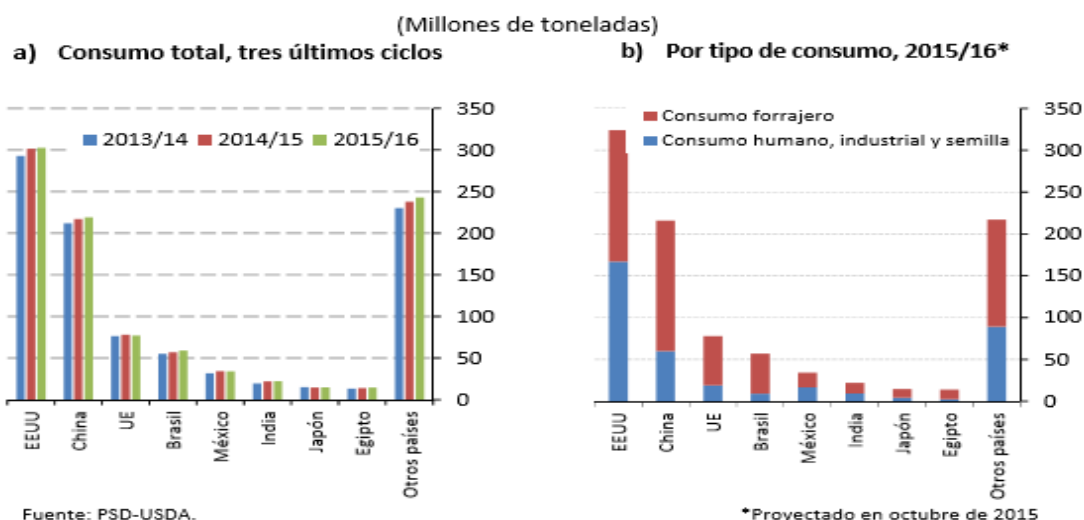


Figura 13 Principales países consumidores de maíz; a) Consumo total, b) Por tipo de consumo

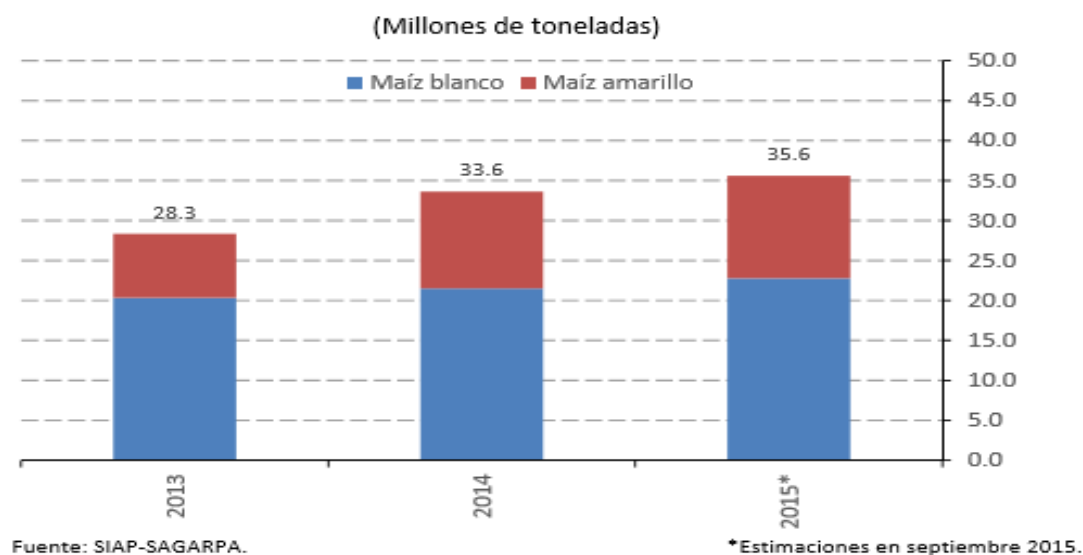
La demanda de maíz de China, segundo consumidor mundial, durante el ciclo comercial 2014/2015 se colocó en 217.0 millones de toneladas, de los cuales 72.4 por ciento corresponde a consumo forrajero mientras que el restante 27.6 por ciento corresponde a consumo humano e industrial. Las expectativas para el 2015/2016 estiman un crecimiento de 0.9 por ciento en la demanda de China lo cual representa un volumen de consumo de 219.0 millones de toneladas de maíz. Dicho incremento es motivado por incrementos en el consumo humano e industrial, toda vez que el consumo forrajero permanecerá sin cambios ante un descenso en la demanda del grano para alimentación animal para producción de carne, provocado a su vez por los altos costos de alimentación y la desaceleración de la economía china (FIRA, 2015).

Las estimaciones 2015/2016 para la Unión Europea ubican el consumo en un volumen de 76.5 millones de toneladas, una reducción de 2.5 por ciento en relación a 2014/2015. Esto ante una reducción de 3.4 por ciento en la demanda forrajera del grano, mientras que el consumo humano e industrial permanecerá sin cambios en relación al ciclo comercial anterior (FIRA, 2015).

1.1.9. Consumo nacional

Al igual que la producción nacional, el consumo doméstico de maíz grano presenta una recuperación durante los últimos tres años comerciales. Así, de acuerdo con estimaciones de SAGARPA, durante 2014 el consumo de maíz (figura 14) grano en nuestro país creció 18.7 por ciento a tasa anual para ubicarse en 33.6 millones de toneladas, de los cuales 63.9 por ciento, o 21.5 millones de toneladas, corresponde a maíz blanco y el restante 36.1 por ciento, 12.1 millones de toneladas, corresponde a maíz amarillo (FIRA, 2015).

Las estimaciones 2015 de SAGARPA estiman un crecimiento de 5.8 por ciento en el consumo de maíz grano, impulsado por incrementos de 5.9 y 5.8 por ciento en el consumo de maíz blanco y maíz amarillo, respectivamente. SAGARPA estima que el volumen total de consumo se ubique en 35.6 millones de toneladas de maíz (FIRA, 2015).



*Figura 14 Consumo de maíz grano en México, 2013-2015**

Al desagregar el consumo por tipo de maíz, es posible observar que durante los últimos años el principal uso del maíz blanco es el consumo humano (figura 15i), el cual se estima representa el 53.1 del consumo total de maíz blanco en 2015, seguido

por el autoconsumo y finalmente el consumo pecuario. Por otro lado, el principal uso del maíz amarillo (figura 15j) en el país es el consumo pecuario, pues en 2015 representa 74.0 por ciento del total consumido. El segundo principal uso del maíz amarillo, que captura el 19.5 por ciento del total consumido, es la industria almidonera para la producción de fécula. Cabe señalar que durante 2015 se estima que todos los tipos de consumo, tanto para maíz blanco como amarillo, crezcan en relación a 2014 (FIRA, 2015).

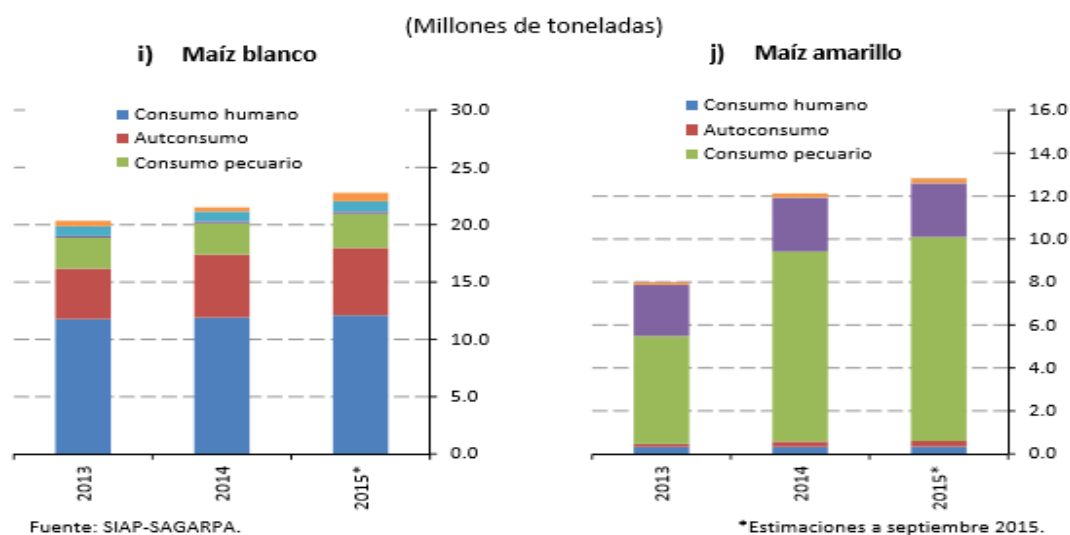


Figura 15 Consumo de maíz grano en México por tipo; i) Maíz blanco, j) Maíz amarillo

1.1.10. Importancia del maíz en el mundo

En el año 2009, en una superficie de 158 millones de hectáreas, la producción mundial de maíz (de 818 millones de toneladas) superó a la de arroz y de trigo en 133 millones de toneladas (figura 16).



Figura 16 Producción mundial de cereales

(Preciado, et al., 2013)

1.2. Hongos y enfermedades que atacan al maíz

El hongo *Fusarium* es uno de los principales patógenos de maíz y causa grandes pérdidas económicas por pudrición de la mazorca, pero además de ello este hongo produce toxinas que pueden causar daños a los animales en granjas porcícolas, avícolas y especialmente en los equinos, que es el animal más sensible.

La pudrición causada por los hongos del genero *Fusarium* comprende varias especies; las principales son: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, antes llamado *F.moniliforme*.

Aunque otras especies de *Fusarium* spp. producen fumonisinas, tales como *Fusarium proliferatum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini* y *Fusarium nygamai*, *Fusarium verticillioides* es la especie más aislada de maíz (De León y Rodríguez, 2010).

Fusarium no es un patógeno exclusivo del maíz, ataca a 81 de 101 especies comerciales, como el jitomate, la piña y los pinos (Moretti , 2009). En países

desarrollados, La fusariosis puede disminuir el rendimiento de las plantas en 40% (CONACYT, 2014) (Quintero-Benitez & Apodoca-Sánchez, 2008).

1.2.1. Enfermedades en las hojas

❖ *Helminthosporium turcicum*

Se presenta sobre las hojas de las plantas tiernas o en estado de floración en épocas húmedas de la costa y sierra. Se le conoce por la presencia en las hojas inferiores de manchas alargadas, elípticas, de color verde grisáceo que llegan a invadir por completo las hojas y pancas de la mazorca (Rimache Artica , 2008).

❖ Mancha gris de la hoja

Causado por *Cercospora Zeae- maydis*, produce manchas alargadas y angostas de color marrón gris, limitadas por las nervaduras de las hojas. Las manchas pueden unirse y matar la hoja. El hongo también es favorecido por las condiciones de alta humedad relativa y se encuentra en los rastrojos (Rimache Artica , 2008).

❖ Roya

Causada por *Puccinia sorghi*, se caracteriza por la formación de pústulas alargadas de color marrón rojizo, tanto en el haz como en el envés de la hoja, las que se rompen y liberan un polvillo marrón oscuro. Esta enfermedad se presenta en condiciones de invierno atacando a plantas muy jóvenes. Las plantas adultas adquieren resistencia (Rimache Artica , 2008).

❖ Mancha negra de la hoja

Causada por *Phyllachora maydis*, ocasiona manchas o lesiones casi circulares, pequeñas, de color negro brillante. Frecuente en condiciones de inviernos húmedos y fríos. Las plantas son más susceptibles después de la floración (Rimache Artica , 2008).

❖ **Carbón de maíz**

Ustilago maydis, Se presenta en tiempo seco y en suelos ricos en nitrógeno especialmente los abonado con estiércol intensivamente. Se llama carbón de la panoja a la infección que produce en la inflorescencia masculina el *Sphalotheca reiliana*, que provoca un desarrollo excesivo de la espiga y de las hojas, produciendo frondosidades, masas negras de esporas (Rimache Artica , 2008).

1.2.2. Enfermedades en el tallo y mazorcas

❖ **Pudrición por *Diplodia* en tallo**

Diplodia maydis, se caracteriza por la presencia de una decoloración en los tallos, seguida de una desintegración de la medula dejando intacto los vasos, lo cual hace los tallos sean fofos y débiles y se quiebren fácilmente con el viento y la lluvia. Se presenta con un aspecto seco de coloración café en los entrenudos inferiores (Rimache Artica , 2008).

❖ **Pudrición por *Gibberella* en tallo**

(*Gibberella Zeae*) Produce en las plántalas el llamado tizón, se caracteriza porque las plantas atacadas presentan una coloración verde grisácea en las hojas, después de la floración; le sigue el enriamiento y destrucción de la medula del tallo. En la zona de rotura, el tallo presenta una coloración rojiza (Rimache Artica , 2008).

❖ **Podredumbre por *Diplodia* en mazorca (*Diplodia Zeae*, *Diplodia maydis*)**

Se produce como consecuencias de la pudrición del tallo, la que avanza a las pancas mostrando estas únalas coloración blanquecina, que corresponden a un moho, mientras que la mazorca empieza a tomar una coloración pardo-grisácea por la base que llega a invadirla completamente. Las mazorcas permanecen rectas y en sus pancas (Rimache Artica , 2008).

❖ **Podredumbre de la coronta o tusa “mazorca” (*Nigrospora oryzae*)**

Se caracteriza por que las mazorcas presentan poco peso y los granos son ligeramente blanquecinos, mal desarrollados y pegados a la coronta. El pedúnculo y base de la mazorca presentan un fuerte enriamiento. En el interior de las tusas enriadas se encuentran esparcidas los hongos en forma de pequeñas masas negras y adheridas al pedicelo del grano. Esta enfermedad es más frecuente en nuestro medio y se recomienda el uso de híbridos resistentes a podredumbre del tallo y tizón de la hoja (Rimache Artica , 2008).

❖ **Podredumbre gris de la mazorca (*Physalospora zeae*)**

La podredumbre es muy parecida a la producida por el diplodia y se diferencia por presentar en las pancas fuertemente adheridas a la mazorca, un color gris apizarrado. Los granos presentan estrías o pequeñas manchas negras debajo del pericarpio. Debe su nombre a la coloración gris apizarrado que adquieren las pancas (Rimache Artica , 2008).

❖ **Pudrición por fusarium (*Fusarium verticillioides*)**

Los síntomas de la pudrición de fusarium inician con la alteración de la coloración externa de la base del tallo, siendo que las plantas infectadas presentan la médula de color blanco-rosada a rosa-salmón. Cuando la infección fuera severa puede ocurrir la esporulación del patógeno, en la parte externa del tejido afectado, en la forma de una masa de esporas de color rosa-salmón. La pudrición afecta las raíces, base de la planta y los entrenudos inferiores, pudiendo llevar al quebrado del tallo y a madurez prematura. La pudrición por fusarium puede ser diagnosticada por la ausencia de peritecios sobre la superficie del tejido afectado, lo que no ocurre con la pudrición de *Gibberella*. La enfermedad inicia comúnmente luego de la polinización y se torna más severa a medida que la planta se acerca a la maduración (Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, 2016).

1.3 Hongo *Fusarium verticillioides*

1.3.1. Taxonomía y morfología de *Fusarium verticillioides*

Las características y la morfología de la colonia de esta especie varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en agar papa-dextrosa el micelio es blanco, al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta (Fig. 17C y 15D). En cambio, en algunos cultivos ya envejecidos, la hifa del hongo produce melanina para conformar estructuras llamadas esclerocios.

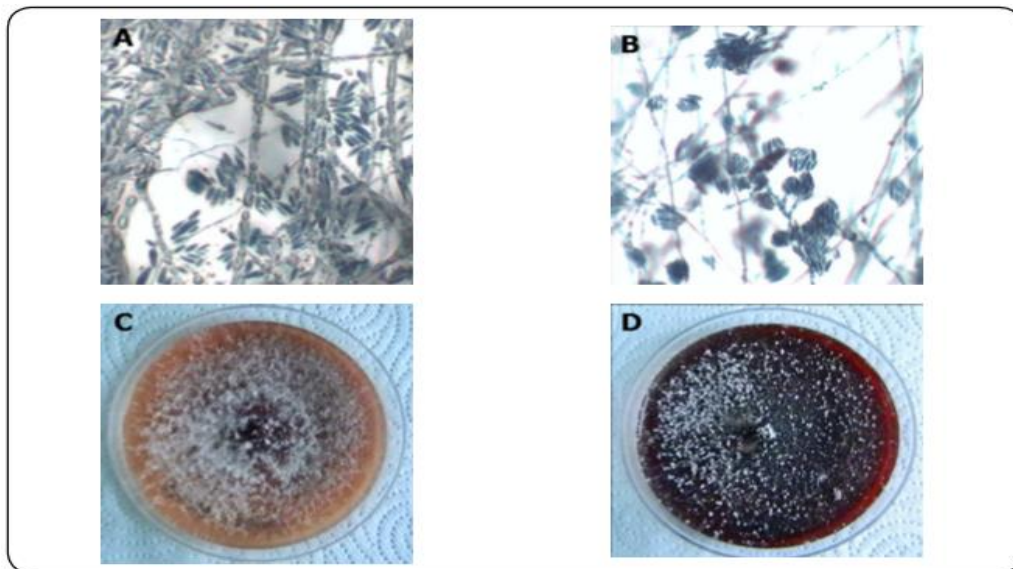


Figura 17 *Fusarium verticillioides*, a) Microconidias de *F. verticillioides* producidas en esporadoquios, b) y en cadenas. (c-d) cultivos en agar papa-dextrosa

La taxonomía de *Fusarium* es sumamente compleja. De ahí que haya sido tema de debate durante muchos años, porque el concepto de especies ha cambiado dentro de un género, dependiendo de los grupos de investigadores.

La especie *F. verticillioides* se distribuye por todo el mundo, y con alta frecuencia es aislada del maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido

hospedero y, luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. (De la torre et al., 2014).

Fusarium verticillioides (anamorfo) fase asexual, pertenece al Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Tuberculariaceae. Mientras que la fase sexual es *Gibberella Fujikuroi* Sawada (teleomorfo), se ubica en la subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Subclase Pyrenomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae (Herrera & Ulloa, 1990). La taxonomía de *Fusarium* es confusa, debido a que se aplican diversos sistemas taxonómicos. El sistema propuesto por Nelson et al. (1983) establece 12 secciones, entre las que se encuentra la sección Liseola, a la cual pertenece *F. verticillioides* (Nelson et al., 1994).

1.3.2. Temperatura y humedad para el crecimiento óptimo

El *F. verticillioides* crece en un amplio rango de condiciones de temperatura (20°C a 37°C) y humedad (actividad de agua de 0.90 a 0.94). Las condiciones óptimas para la germinación de conidias son una temperatura de 30°C y actividad de agua de 0.96 a 0.98 (Leslie JF, 2006). A mayor disponibilidad de agua se tiene un mayor crecimiento de *F. verticillioides* y una mayor producción de fumonisinas. Las condiciones óptimas de producción de fumonisinas son 0.97- 0.98 de actividad de agua y temperaturas de 20°C a 30°C (Marin s, 1999).

1.3.3. Rutas de entrada y colonización del patógeno

Uno de los aspectos que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides*

en el maíz es que el hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (Figura 18). A continuación se describen las principales rutas de infección:

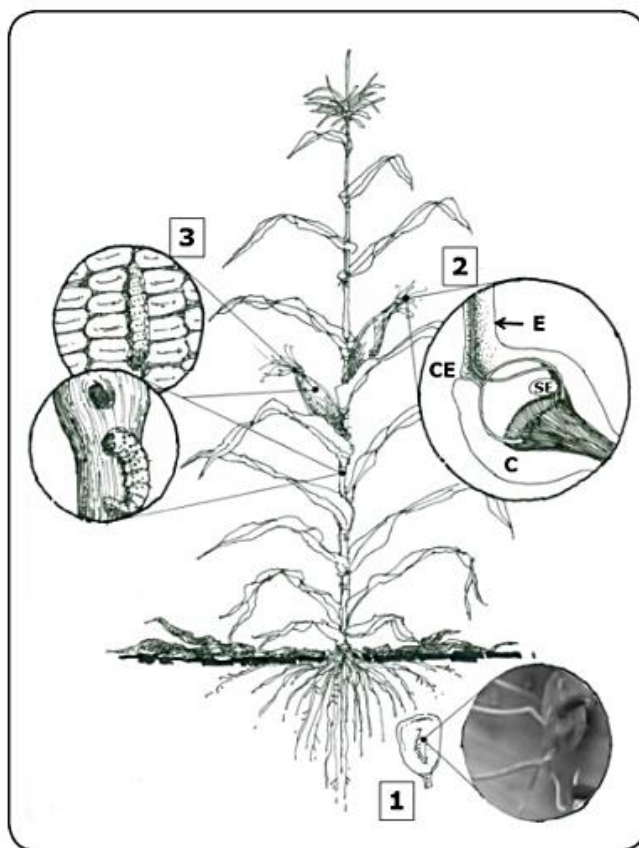


Figura 18 Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta del maíz.

I. Infección sistémica de las plántulas:

Ocurre durante y desde la germinación de la semilla, y a lo largo del establecimiento de la plántula. Como el hongo sobrevive –ya sea en la semilla o en el suelo–, se encuentra estratégicamente posicionado para infectar a la planta. *F. verticillioides* penetra de forma directa el pericarpio y a las células de la epidermis de la raíz tres días después de que se siembran las semillas inoculadas.

II. Infección de la mazorca por medio del estigma:

La vía más común para que *F. verticillioides* infecte a la mazorca es a través del

estigma. Lo anterior sucede cuando el inóculo aéreo y las conidias transportadas por el agua de lluvia se depositan en el estigma. De esa forma se facilita el acceso a las células del pericarpio y la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula para poder acceder al grano, a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas.

III. Infección del tallo y la mazorca por daño mecánico:

Al alimentarse, varios insectos –plagas del maíz– horadan las mazorcas y los tallos de la planta. Este daño mecánico funciona como ruta de entrada para las conidias de *F. verticillioides*. Además, hay insectos que actúan como vectores del hongo, ya sea dispersándolo a lo largo de la superficie de la planta hacia los granos –como *Ostrinia spp.*, el gusano barrenador– o, bien, transportándolo a través de grandes distancias. Otros vectores descritos son el gusano elotero –en sus fases de larva y de adulto–, los trips y los gorgojos. La función de vector se apoya en el hecho de que el hongo sobrevive en los órganos externos de los insectos mencionados. Otras evidencias que favorecen el papel de los insectos en la incidencia y severidad de la infección por *F. verticillioides* son: 1) el control de trips con insecticida, que reduce la población de insectos y la enfermedad; 2) el maíz genéticamente modificado, que produce la proteína CryIa(b)–la cual confiere resistencia al gusano barrenador europeo–, tiene menor incidencia y severidad de pudrición de la mazorca provocado por *F. verticillioides*.

(De la torre et al., 2014).

1.3.4. Fumonisinas

Definición

La palabra “fumonisina” viene de Fu= *Fusarium*, moni= moniliforme y sina= toxina es la toxina del hongo *Fusarium moniliforme*, nombre anterior del actual *Fusarium verticillioides*.

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas producidas por *Fusarium*

verticillioides fueron descubiertas en 1988.

Estructura química de las fumonisinas

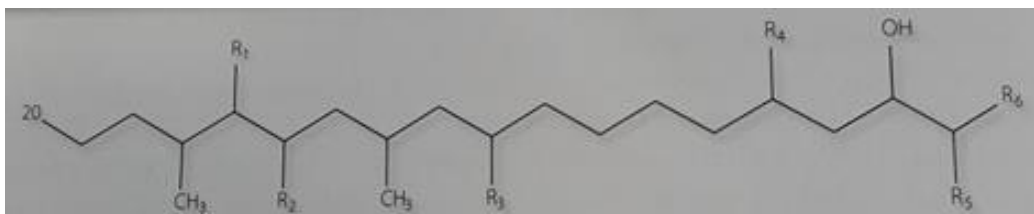


Figura 19 Estructura química de las fumonisinas

Gelderblom *et al.* (1993) (Gelderblom, Cawood, Snyman, Vleggaar, & Marasas, 1993) caracterizaron por primera vez la estructura de las fumonisinas como diésteres de ácido tricarbóxico y amino-alcoholes de 22 carbonos con peso molecular de 721. De 13 fumonisinas caracterizadas químicamente, las FB₁, FB₂ y FB₃ se caracterizan de mayor interés por su actividad promotora de cáncer.

Hasta ahora se han reportado al menos 28 fumonisinas diferentes, aunque únicamente FB₁, FB₂ y FB₃, se encuentran en alimentos contaminados naturalmente.

(De León & Rodríguez Montessoro, 2010).

1.3.5. Producción de fumonisinas

A diferencia de otros hongos que son estrictamente biotrofos, *F. verticillioides* no genera estructuras especializadas que faciliten la entrada al tejido y a las células. Sin embargo, es capaz de producir cantidades importantes de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso infeccioso. Entre las micotoxinas que sintetiza la especie se hallan el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la moniliformina y las fumonisinas. Estas últimas son las más abundantes. La presencia de esos compuestos en productos agrícolas causa gran preocupación, debido a los efectos que ocasionan cuando animales y humanos los consumen. Lo anterior ha fomentado la investigación en torno a los efectos, el modo de acción y el metabolismo de esta micotoxina, así

como al desarrollo de métodos analíticos para su detección y cuantificación en maíz y productos derivados de éste (De la torre et al., 2014).

Dentro de las especies de hongos productores de micotoxinas sobresale *Fusarium verticillioides* de distribución mundial, que se ha aislado principalmente en cereales como maíz, sorgo, trigo y avena (De León y Rodríguez, 2010).

El maíz es el que presenta la mayor tasa de contaminación por causa de estos compuestos, los cuales se han detectado en derivados de maíz, como hojuelas, pan molido, harinas, palomitas, etc. (Tsung-Che & Chen-Yi, 1997).

1.3.6. Daño que produce en humanos, plantas y animales

Efectos en humanos

Las vías oral y por inhalación son las formas de exposición a fumonisinas más importantes por el consumo de alimentos contaminados que a su vez producen micotoxinas.

Se ha comprobado su efecto cancerígeno en animales pero no en el hombre, parece que son metabolitos promotores del cáncer más que cancerígenos en sí mismos.

IARC (2002) situó a la fumonisina B₁ dentro del grupo 2B como posible cancerígeno a humanos.

Las fumonisinas son las micotoxinas más abundantes en maíz y tortillas, y existen reportes que indican que están relacionados con cáncer esofágico y con defectos en el cierre del tubo neural en ratas y humanos. En algunos países está estrechamente relacionadas con la alta incidencia de cáncer esofágico humano y de defectos en el tubo neural de niños recién nacidos que estas toxinas disminuyen los niveles de ácido fólico. Estas micotoxinas también pueden llegar al humano de manera indirecta a través del consumo de productos de origen animal contaminados.

Se han encontrado fumonisinas en harinas de maíz comercial de muestras obtenidas en Canadá, Egipto, Perú, EE. UU. y Sudáfrica (De León y Rodríguez, 2010).

Efectos en plantas

La pudrición causada por *Fusarium* spp. Comienza inmediatamente después de la polinización y afecta raíces, base de la planta y entrenudos bajos; la enfermedad progresa a medida que la planta madura, los tallos se rompen y ocurre una maduración prematura como en otras pudriciones.

Evidencias experimentales indican que *Fusarium verticillioides* es el agente causal de la “Germinación prematura del maíz” y de la “Pudrición de la mazorca”.

Fusarium verticillioides afecta a mazorca, raíz y tallo y aparece en todos los estadios de desarrollo de la planta; así, la semilla nace y el hongo se transmite de la está a la planta colonizando su desarrollo sistemáticamente sin presentar ningún síntoma conspicuo, hasta alcanzar al grano. Aun cuando la raíz no es visible, el hongo puede estar creciendo y produciendo fumonisinas y otras toxinas, reduciendo el valor del grano. (De León y Rodríguez, 2010).

Efectos en animales

La fumonisina B₁ (FB₁) se ha probado como cancerígeno, por administración oral en ratas en dos estudios de machos y hembras. En ratas hembras causa incrementación en adenomas y carcinomas hepatocelulares. En machos aumentaron los colangiocarcinomas y carcinomas hepatocelulares. En otro estudio con las ratas indujo carcinomas de tubo renal, la mitad de los cuales se clasificaron como una variedad altamente maligna. (Engelhardt et al.1989; Gelderblom et al., 1991).

Las fumonisinas se absorben con dificultad, se excretan con rapidez y no se metabolizan en los animales. La vida media para su eliminación en especies de animales se relaciona directamente con el promedio del peso corporal de cada especie, sugiriendo que la vida media en los humanos será más larga que la determinada para ratas y otros animales (Haschek et al., 1993).

En animales, por ejemplo en caballos, la exposición a fumonisina produce leucoencefalomalacia, una enfermedad caracterizada por necrosis, licuefacción de la materia blanca del cerebro, pérdida de apetito, hígado pequeño, cojera, perturbación del sistema nervioso, parálisis facial y oral. Se atribuyeron a la exposición de FB1 (Marasas , 2001).

Otros daños observados principalmente en roedores son la toxicidad hepática y renal, ambos con marcadas diferencias de acuerdo al sexo (Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008).

En cerdos alimentados con maíz contaminado con FB1, la manifestación relevante es un cuadro de edema pulmonar, los síntomas incluían dificultad respiratoria, debilidad aborto y acumulación de un fluido amarillento en la cavidad torácica; atribuido a la acción tóxica de la fumonisina sobre la célula pulmonar, pero también a una alteración en los canales de calcio de las células del miocardio y a una disminución en la eficiencia del ventrículo izquierdo (Constable, 2000).

La FB₁ es hepatotóxica y nefrotóxica en todas las especies de animales probados. El incremento de la apoptosis, seguida de degeneración en la proliferación celular es el primer cambio que aparece en hígado o riñón en los animales tratados con fumonisinas. Aun cuando la toxicidad aguda de la fumonisina es baja, es la causa conocida de las enfermedades en animales domésticos: la leucoencefalomalacia equina y el síndrome de edema pulmonar porcino (Harrison et al., 1990). Ambas enfermedades involucran alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos y disfunción cardiovascular (De León y Rodríguez, 2010).

1.4.Técnicas para la identificación morfológica de los hongos

A través de la experiencia de algunos investigadores, así como experiencias propias, se han venido probando diferentes medios y técnicas para aislar e identificar a los hongos que comúnmente invaden a estos productos y que son causa de su deterioro físico, químico y sanitario (Christensen & Meronuck, 1976) (Tuite, 1982). A

continuación se describe el medio y las técnicas de los que se consideran más adecuados para un laboratorio de control de calidad.

1.4.1. Medio de cultivo

Papa Dextrosa Agar (PDA): es un medio que se puede preparar con papas naturales o con el producto comercial deshidratado manufacturado por diferentes marcas, entre ellas Difco; en este último caso solo hay que seguir las instrucciones del frasco.

Para preparar el medio a partir de papas naturales se procede de la siguiente manera. Se lava de 200 a 300 gramos de papas, se rebanan y hierven hasta que estén suaves, y se exprimen a través de dos a tres capas de manta delgada (gasa). El filtrado se pone en un matraz, añada 20g de dextrosa y 20g de agar, afore a un litro. Esterilice los medios 20 minutos a 15 libras de presión. Cuando el medio este casi frio ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) viértalo en las cajas Petri. En este medio de cultivo ciertos hongos, como *Neurospora*, *Mucor* y *Rhizopus*, que frecuentemente son contaminantes en los laboratorios, crecen rápidamente y enmascaran el desarrollo de otros hongos más lentos (Moreno Martinez, 1998).

1.4.2. Técnica para granos enteros

De una muestra representativa del lote de grano por estudiar se toman aproximadamente 100 granos que se desinfectan superficialmente agitándolos por 1 o 2 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, enseguida se enjuagan en agua estéril, una vez que se ha quitado, por decantación el exceso de agua, se siembran 50 en las cajas de Petri conteniendo al medio de cultivo que se ha seleccionado para aislar la micoflora presente en los granos. Si son granos grandes como maíz, se siembran 25 por caja de Petri, si son pequeñas como el sorgo, se pueden sembrar 50.

El número de granos por caja Petri depende del tamaño del grano, de la habilidad del laboratorista para contar e identificar rápidamente los hongos, ya que a mayor tiempo de incubación mayor será el crecimiento de las colonias y estas se juntaran dificultando esta tarea. Además, si se ponen pocos granos mayor será el número de

cajas Petri y mayor el costo económico por muestra. Los granos en las cajas de Petri se incuban a 25°C, hasta que las colonias puedan ser contadas e identificadas, normalmente se requieren siete días (Moreno Martinez, 1998).

La desinfección superficial con hipoclorito no siempre es cien por ciento efectiva, ya que en ocasiones los granos presentan daño físico, ocasionado en la cosecha, secado o transporte, y en las fisuras se alojan esporas que no son alcanzadas por la solución de hipoclorito y cuando se enjugan con agua estéril y esta operación no se hace rápido, las esporas salen de la fisura y el agua las distribuye sobre la superficie de los demás granos (Moreno Martinez, 1998).

En algunos laboratorios eliminan el enjuagado con agua estéril y solamente quitan el exceso de hipoclorito de sodio colocando los granos sobre toallas de papel estéril, asumiendo que el cloro es volátil y que también se diluye en el agua del medio de cultivo, sin afectar en el desarrollo de los hongos que se encuentran en el interior de los granos (Moreno Martinez, 1998).

El método de arriba descrito es muy útil para conocer la condición del grano en cuanto a su potencial de almacenaje o “almacenabilidad”; ya que grano que esté libre de hongos de almacén puede ser almacenado con seguridad y el grano parcial o severamente invadido por estos hongos tiene un mayor riesgo de deterioro en el subsecuente almacenaje (Moreno Martinez, 1998).

1.5. Técnicas moleculares para la detección de hongos

El diagnóstico molecular se basa principalmente en dos grandes pilares: la hibridación de los ácidos nucleicos y los métodos de amplificación de los mismos. Estos métodos permiten aumentar la sensibilidad y la rapidez de la detección fúngica y, además, identificar al patógeno sin necesidad de cultivarlo. Las técnicas de Biología Molecular basadas en detección de ácidos nucleicos, dispone de pocos

protocolos estandarizados con el aval de un uso amplio y contrastado (Palomares & Cuenca, 2007).

Tradicionalmente, la identificación del género *Fusarium* está basada en las características morfológicas, incluyendo características distintivas como forma, tamaño y septación de los conidios, clamidosporas: así como, la evaluación de características adicionales del crecimiento de micelio como el color, la abundancia y el color del que se torna el medio de cultivo en el cual ha crecido. En general, los miembros del género *Fusarium* son difíciles de identificar a nivel especie basándose únicamente en las características microscópicas. Los métodos aplicados para la identificación de especies de *Fusarium* basados en el ADN incluyen: PCR con “Primers” específicos de las especies así como la secuenciación y comparación de regiones conservadas de ADN y el uso de PCR-RFLP. La aplicación de PCR con “Primers” específicos de las especies es confiable en las interacciones hospedero-patógeno previamente caracterizadas pero de uso limitado cuando es necesario diferenciar múltiples especies. En consecuencia, es necesario un método rápido que sea capaz de distinguir diferentes especies de *Fusarium* (Nitschke *et al.*, 2009).

1.5.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa

En 1985, el químico Kary Mullis desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método permite la amplificación exponencial de una molécula de ADN, generando millones de copias de un fragmento.

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

1.5.1.2. Fundamento de la PCR

Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inicia la síntesis de fragmentos de ADN. Usa uno o dos oligonucleótidos sintéticos (Primers o cebadores) según la técnica, generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco diseñadas para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización de ADN, la unión del cebador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del cebador, de una doble cadena mediante la acción de polimerasa. Lo anterior resulta una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente mediante técnicas electroforéticas, obteniendo un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos, especies animales o vegetales (Innis, 2010).

1.5.1.3. Etapas de la PCR

Cada ciclo de una reacción de PCR consta de tres etapas:

Etapas 1 “Desnaturalización”: Fase en la que el ADN se somete a altas temperaturas (aproximadamente 95°C), de 15 a 40 segundos dependiendo del tamaño del genoma con la finalidad de que se separe y resulte en cadenas sencillas (Erlich & Arnheim, 1992). Consiste en la ruptura de los puentes de hidrogeno del DNA, para así separarlo en dos cadenas y sirva como molde para la amplificación (Surzycki, 2000).

Etapas 2 “Hibridación”: La mezcla de la reacción se enfría (aproximadamente 60°C) dando lugar al reconocimiento de segmentos específicos de la cadena diana de ADN por los Primers, un primer se une a un extremo y el otro a la complementariedad,

recordando que los sitios de hibridación se eligen de acuerdo a la región de interés, mientras que la temperatura y el tiempo varían entre cada pareja de cebadores (Erlich & Arnheim, 1992).

Etapas 3 “Extensión o elongación”: La enzima Taq Polimerasa es la encargada de leer la secuencia complementaria así como de sintetizar los nucleótidos faltantes durante x número de ciclos, para la obtención de gran cantidad de copias del fragmento de ADN deseado. La temperatura es de aproximadamente 70°C, con tiempo de 90 segundos, que en ocasiones puede variar según sea necesario (Erlich & Arnheim, 1992). Al final del proceso de extensión se generan dos nuevas moléculas de DNA de cadena doble idénticas a la secuencia original (Surzycki, 2000).

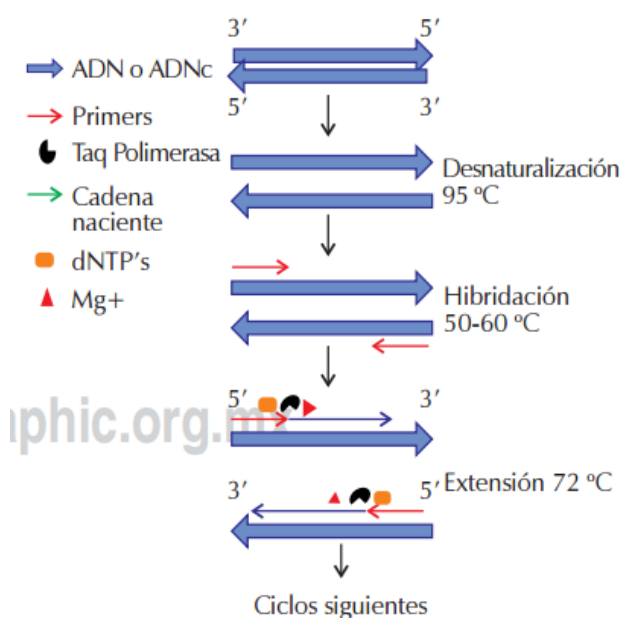


Figura 20 Pasos de un ciclo de la PCR

(De Dios T, *et al.*, 2013).

En un ciclo se llevan a cabo las tres etapas anteriormente descritas. El número de ciclos en una PCR estándar varía desde 20 a 45 ciclos resultando en una acumulación del fragmento del DNA, cada ciclo duplica el número de copias de la secuencia amplificada llamada Amplicón o diana. Para obtener 1000 millones de copias es

necesario programar una PCR de 30 ciclos, lo cual es suficiente para visualizarse por electroforesis. En la actualidad las PCR se encuentran totalmente automatizadas por termocicladores.

Para llevar a cabo una PCR es necesario contar con Primers u oligonucleótidos. El oligonucleótido forward o frontal deberá tener la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas de DNA, mientras que el oligonucleótido reverse o reverso deberá llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento de DNA que se quiere amplificar. El número de copias conforme actúe la Taq Polimerasa aumentará de forma exponencial. Después de cada ciclo (Figura 21), la cantidad de DNA es dos veces la anterior. Así después de N ciclos tendremos 2^N .

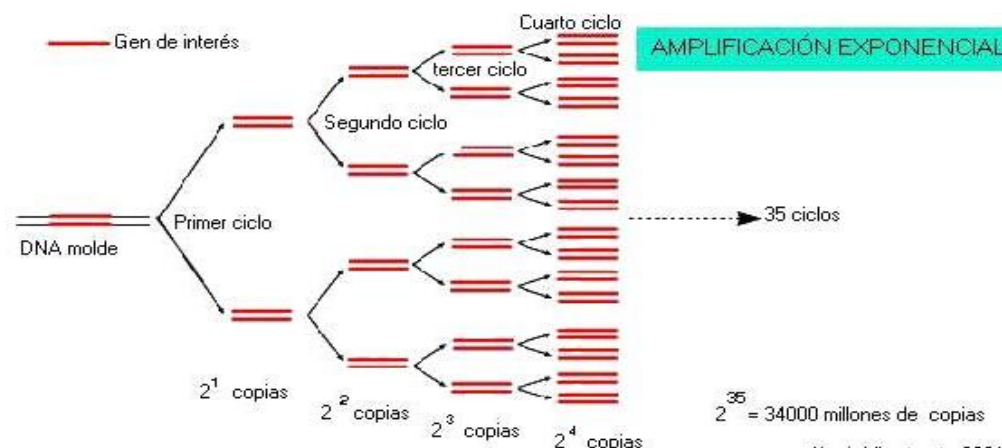


Figura 21 Amplificación exponencial del PCR

(Poza, y otros, 2001).

1.5.1.4. Ventajas y desventajas

Ventajas

- ✓ El producto se puede utilizar para clonar, secuenciar y analizar
- ✓ Se puede amplificar DNA de cualquier organismo, vivo o muerto.
- ✓ Sus aplicaciones son múltiples: medicina forense, diagnóstico, análisis prenatales, identificación de especies y discriminación, etc.
- ✓ Cuenta con alta sensibilidad

- ✓ La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde (Shibata et al. 1988).
- ✓ Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleotidos (en este caso de los iniciadores) de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios (Mullis , 1990).

Desventajas

- × La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso.
- × Susceptible a la contaminación, dependiendo la concentración y pureza del DNA extraído, así como de aditivos y metabolitos presentes en la muestra.
- × Se necesitan Primers específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar.
- × Su aplicación no es todavía de rutina en los grandes laboratorios de diagnóstico. Las precauciones son importantes en el desarrollo de esta técnica. Debido a su elevada sensibilidad, es esencial evitar contaminaciones por ADN extraño que pudieran interpretarse en resultados falsos positivos (Bolívar, 2013).
- × Produce una alta tasa de errores en la incorporación de dNTP's; la polimerasa *Taq*, carece de actividad exonucleasa 3' a 5' y por lo tanto, de la capacidad para la revisión del nucleótido incorporado y en su caso, para la degradación y sustitución por el correcto. Esto provoca la incorporación de errores con una frecuencia de alrededor de 1×10^{-4} por ciclo (Perera, et al, 2002).

1.5.2. Electroforesis

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas, La separación tiene debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas

cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato (White, 1982).

La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución.

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa (Fierro Fierro, 2014).

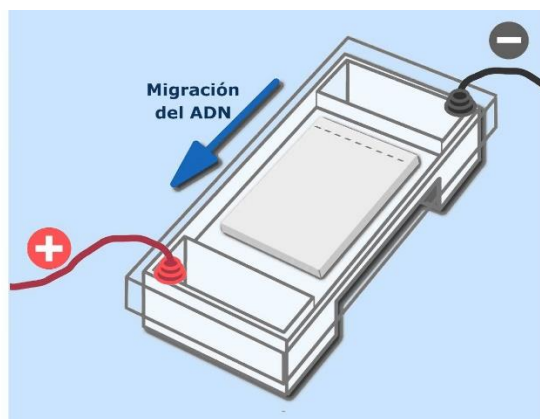


Figura 22 Electroforesis

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

2.1. Justificación

En la canasta básica de México, el maíz es uno de los granos básicos en ella. El cual se siembra desde hace cientos de años, también es la materia prima de varios productos para consumo humano, consumo animal y productos industriales (aceites).

Fusarium verticillioides es el principal hongo patógeno que afecta la productividad del maíz en el Mundo. Este hongo penetra a la planta por distintas rutas e infecta raíces, tallo y mazorca. El patógeno produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo que disminuye su calidad (De la torre et al, (2014).

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas que contaminan al maíz y son producidas principalmente por los hongos *F. moniliforme* y el *F. proliferatum*, durante el cultivo y almacenamiento del grano.

El hongo principalmente involucrado en la producción de fumonisina en México es el *F. moniliforme* (~75%) (También conocido como *F. verticillioides*).

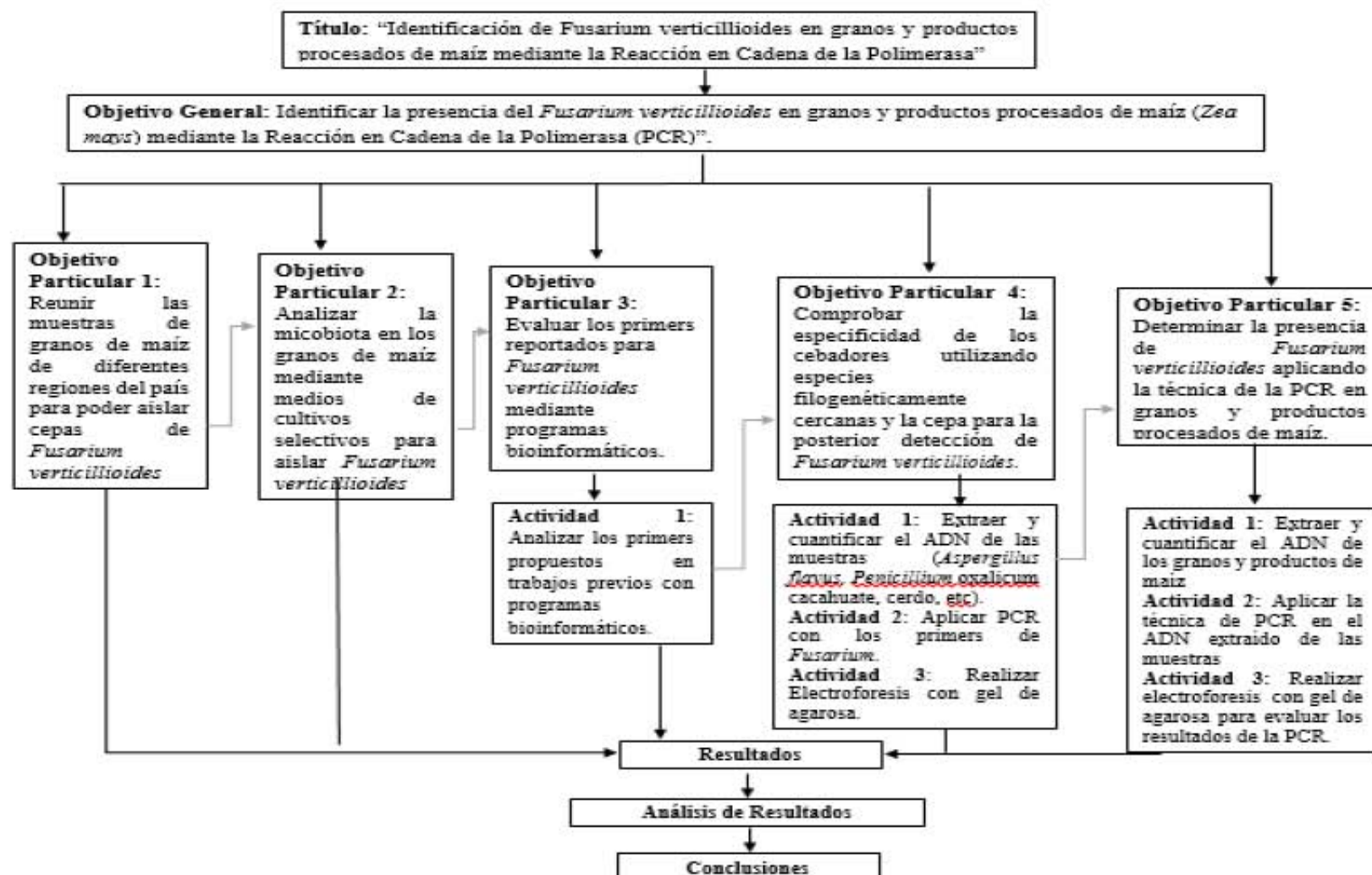
Estudios ecológicos realizados principalmente en Sudáfrica y China, en los que compararon la concentración de fumonisina presente en el maíz entre zonas de alta y baja incidencia de cáncer esofágico, sugieren que éste podría ser uno de los daños a la salud relacionados con la exposición a fumonisina.

Un estudio de casos y controles donde la exposición a fumonisina durante el primer trimestre del embarazo las mujeres que reportaron comer tortillas hechas en casa presentaron un incremento significativo de tres veces más riesgo de tener un niño con DTN (defectos del tubo neural), comparado con las que consumieron tortillas de origen comercial (Torres Sanchez & Lopez Carrillo , 2010).

Por estas incidencias que se han comentan anteriormente, es importante detectar al

hongo *Fusarium verticillioides* en maíz por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ya que tiene una eficiencia excelente y nos es posible identificar la presencia del *Fusarium* por medio del ADN.

2.2. Cuadro metodológico



2.3. Objetivo general

Identificar la presencia del *Fusarium verticillioides* en granos y productos procesados de maíz (*Zea mays*) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)”.

2.3.1. Objetivo Particular 1

Reunir las muestras de granos de maíz de diferentes regiones del país para poder aislar cepas de *Fusarium verticillioides*.

2.3.2. Objetivo Particular 2

Analizar la micobiota en los granos de maíz mediante medios de cultivo selectivos para aislar *Fusarium verticillioides*.

2.3.3. Objetivo Particular 3

Evaluar los primers reportados para *Fusarium verticillioides* mediante programas bioinformáticos.

Actividad 1: Seleccionar los primers reportados en trabajos previos.

Actividad 2: Buscar la secuencia de los primers con los programas bioinformáticos (Sequencher y GenBank).

2.3.4. Objetivo Particular 4

Comprobar la especificidad de los cebadores utilizando especies filogenéticamente cercanas y la cepa para la posterior detección de *Fusarium verticillioides*.

Actividad 1: Extraer y cuantificar el ADN de las muestras (*Aspergillus flavus*, *Penicillium oxalicum* cacahuete, cerdo, calabaza).

Actividad 2: Aplicar PCR con los primers de fusarium.

Actividad 3: Realizar Electroforesis con gel de agarosa.

2.3.5. Objetivo Particular 5

Determinar la presencia de *Fusarium verticillioides* aplicando la técnica de la PCR en granos y productos procesados de maíz.

Actividad 1: Extraer y cuantificar el ADN de los granos y productos de maíz.

Actividad 2: Aplicar la técnica de PCR en el ADN extraído de las muestras.

Actividad 3: Realizar electroforesis con gel de agarosa para evaluar los resultados de la PCR.

2.4. Métodos y materiales

2.4.1. Materiales Biológicos

Cuadro 2 Muestras de los granos de maíz

Muestra	Origen
Maíz 1	Celaya, Gto. Maíz blanco
Maíz 2	Criollo de San Mateo. Maíz blanco
Maíz 3	Bajío Guanajuato. Maíz blanco
Maíz 4	Celaya, Gto. Maíz blanco
Maíz 5	Almacenadora, localizada en Cuautitlán, Estado de México. Maíz blanco
Maíz 6	Celaya, Gto. Maíz blanco
Maíz 7	UNIGRAS, Maíz blanco
Maíz 8	Tamaulipas. Maíz blanco
Maíz 9	Puebla. Maíz blanco
Maíz 10	Tamaulipas. Maíz blanco
Maíz 11	Coahuila. Maíz blanco
Maíz 12	Atlacomulco, maíz blanco
Maíz 13	Celaya, Gto. Maíz colorado
Maíz 14	Celaya, Gto. Maíz bola chica
Maíz 15	Oaxaca
Maíz 16	Xhala, Cuautitlán Izcalli, maíz Peruano
Maíz 17	Calvillo, Aguascalientes. Maíz blanco
Maíz 18	Pueblo de Axotlan, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Maíz blanco

Cuadro 3 Muestras de los productos procesados de maíz

Muestras	Productos procesados
M.1	Tortilla amarilla (tortillería comercial cofradía 3, Cuautitlán Izcalli)
M.2	Tortilla empaquetada
M.3	Tostada de maíz blanco horneadas, “Salmas”
M.4	Totopos (tienda)
M.5	Churros de maíz, “comercial”
M.6	Hojuelas de maíz (mercado, Cuautitlán Izcalli)
M.7	Hojuelas de maíz “Zucaritas”
M.8	Tortilla azul “Comercial”
M.9	Harina “maseca”
M.10	Harina de maíz nixtamalizado “Omali”

2.4.2. Medio de cultivo

Para preparar 1 L se lavan 250 g de papas naturales, rebanarlas y hervirlas hasta que estén cocidas y suaves. Colarlas y recuperar el agua de cocción, agregar 20 g de dextrosa y 20 g de agar, aforar a 1 L con agua destilada. Posteriormente se esterilizó por autoclave (20 minutos, 1.5 kg/cm² y 120°C). El medio se dejó enfriar a 40°C aproximadamente y se vació en cajas petri estériles y se dejó solidificar y secar en la campana. Una vez solidificados las cajas se dejan en incubación durante 48 hrs para asegurar que no esté contaminado el medio y después se guardaron a 4°C hasta su utilización.

2.4.3. Determinación de micobiota

Se aislaron los hongos presentes en los granos de maíz usando la técnica de siembra en placa de agar, con el medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA), para el aislamiento de hongos de campo. Previamente los granos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% durante 2 minutos, enseguida se

procede al secado del grano con toallas de papel esterilizadas. Se hicieron 4 repeticiones por cada muestra con 15 granos en cada caja de Petri, fueron incubadas a una temperatura de 25°C en oscuridad por un periodo de 5 días.

2.4.4 Análisis de la micobiota

Con los datos obtenidos se procedió a calcular la frecuencia de aislamiento y la densidad relativa de los géneros presentes, con las fórmulas empleadas por (González, 1997).

Fórmula para frecuencia de aislamiento

$$A = (\beta / \gamma) \times 100$$

En donde A= Frecuencia de aislamiento expresada en porcentaje

β = Ocurrencia del número de muestras de un genero

γ = Número total del genero

Fórmula para la densidad relativa

$$A = (\beta / \gamma) \times 100$$

En donde A= Densidad relativa expresada en porcentaje

β = Número de aislamientos de un género o especie

γ = Número total de hongos o géneros aislados

2.4.5. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se empleó el Kit Wizard Magnetic DNA Purification System for Food. Está diseñado para la purificación de ADN de una gran variedad de alimentos tanto naturales como procesados. Este sistema de purificación utiliza perlas magnéticas que facilitan la unión de los ácidos nucleicos y la eliminación de contaminantes, aumentando la pureza del ADN. La metodología utilizada se describe

a continuación:

Materiales Biológicos

Reactivos

- Partículas paramagnéticas MagneSil
- Solución de lisis Buffer A
- Solución de lisis Buffer B
- Solución de precipitación
- Solución de RNAsa A
- Agua libre de nucleasas

Materiales de Laboratorio

- Tubos Eppendorff
- Gradilla

Equipos

- Juego de Micropipetas, Rainin® SL-XLS, California, Estados Unidos.
- Agitador vortex, Scientific Industries, Genie K-55- G, Estados Unidos.
- Microcentrífuga Eppendorf Mminispin plus 1400rpm, Estados Unidos.
- Purificador de Agua EASYpure II RF/W ultrapure water system Equipar

Metodología

- ➔ Se adicionaron 500 μ L de Solución de lisis Buffer A, 5 μ L de RNAsa A y 250 μ L de Solución de lisis Buffer B y se colocó el tubo en el vórtex por un tiempo de 10-15 segundos. Se incubó 20 minutos a 22-25°C (temperatura ambiente).
- ➔ Se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm.
- ➔ Se adicionaron 750 μ L de solución de precipitación. Se agitó vigorosamente con el vórtex.
- ➔ Se mezcló la botella de Magnesil TM PMPs para que estuviera homogéneo, antes de ser utilizado.
- ➔ Se adicionaron 50 μ L del reactivo Magnesil TM PMPs a la muestra. Se agitó vigorosamente con el vórtex.
- ➔ Se adicionaron 0.8 de volumen de Isopropanol. Se invirtió el tubo 15 veces.

Se incubo por 5 minutos a temperatura ambiente.

- ➔ Se colocaron los tubos en la gradilla magnética por 1 minuto y se removio la fase liquida.
- ➔ Se removió el tubo de la gradilla magnética y se le adicionaron 250 µL de solución de lisis Buffer B, se invirtió el tubo 3 veces y regresar a la gradilla magnética. Se dejó por 1 minuto y se removió la fase liquida.
- ➔ Se adiciono 1 ml de Etanol al 70%, se colocó el tubo en la gradilla por 1 minuto y se desechó el líquido remanente.
- ➔ Se secaron las partículas de 14-30 minutos a temperatura ambiente.
- ➔ Se adicionaron 50 µL de agua libre de nucleasas, se mezcló en el vórtex y se incubo a 65°C por 5 minutos. Se colocó en la gradilla magnética y se removió el agua libre de nucleasas con el ADN.

2.4.6. Cuantificación de ADN

La cuantificación se realizó con el Nano espectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-1000. La relación 260/280nm se utiliza para la prueba de contaminación de una preparación de ADN y también te da la pureza de los ácidos nucleicos. La lectura 260nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra.

Materiales Biológicos

- ADN extraído del grano de maíz
- ADN extraído de las muestras
- ADN extraído de la cepa de *Fusarium verticillioides*

Reactivos

- Agua libre de nucleasas

Materiales de Laboratorio

- Juego de micropipetas
- Pañuelo para limpiar el sensor

- Parafilm

Equipos

- Nano espectrofotómetro, Accesolab Nano Drop ND-1000

Metodología

- ➔ Se encendió el Nano Drop.
- ➔ En la computadora se abrió el programa Nano Drop, entrar a la opción de ácidos nucleicos.
- ➔ Se colocaron 2μL de agua libre de nucleasas para iniciar el equipo, opción OK.
- ➔ Se limpió el sensor y colocó 2μL de agua libre de nucleasas en el sensor para el blanco “blank”.
- ➔ Se puso 2μL de la muestra que se desea cuantificar y seleccionar “measure”.
- ➔ Se registraron los valores de la relación 260/280 y los ng/μL de ADN de la muestra.

2.4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Amplifica un fragmento de ADN mil millones de veces en pocas horas. La PCR se lleva a cabo en una solución de 25μL con los reactivos mencionados en el cuadro 2:

Cuadro 4 Componentes de la PCR

Componente	Porción
Kit Master mix	12.5μL
Primer Frontal	0.5μL
Primer Reverso	0.5μL
ADN Molde	2μL
Agua libre de nucleasas	10.5μL

2.4.8. Primers

Para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa se utilizaron los primers específicos reportados bibliográficamente junto con sus condiciones reportadas por Bertechini F. C., (2012) para *Fusarium verticillioides*, los primers se muestran en el cuadro siguiente:

Cuadro 5 Primers para Fusarium verticillioides

ESPECIE	GEN	CEBADOR	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL AMPLIFICADO
<i>Fusarium verticillioides</i>	GaoB (galactosa oxidasa)	Frontal	CACTGGTGGTAACGATG CG	371 pb
		Reverso	CACCCTGAGTGCCCTTGGTG	

2.4.9. Reacción en cadena de la polimerasa

Programando las siguientes condiciones en el termociclador con 35 ciclos:

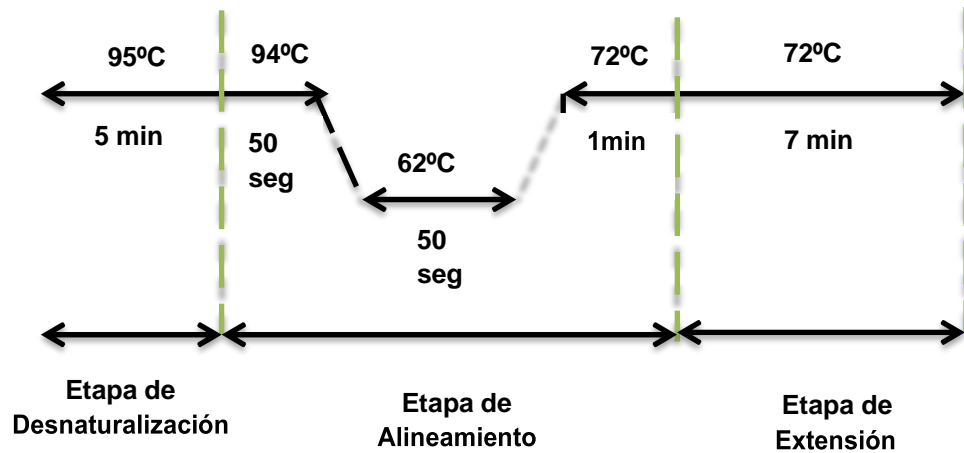


Figura 23 Programa de la PCR para el termociclador

2.4.10. Electroforesis

Técnica que se usa para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos por medio el movimiento de un campo eléctrico. Se realizó un análisis para las muestras resultantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante electroforesis en gel de agarosa.

Materiales Biológicos

- Muestras producto de la PCR

Reactivos

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

Materiales de Laboratorio

- Juego de micropipetas
- Parafilm
- Matraz Erlenmeyer

Equipos

- Cámara y cassette de electroforesis, Apollo® 75.710

- Transluminador Clavel Scientific LTD
- Cámara fotográfica Kodak digital Science®

Metodología

Preparación de 50 ml de gel de agarosa al 1 %

- ➔ Se pesó 0.5 g de agarosa.
- ➔ Disolviéndolo en 50 ml de TAE IX.
- ➔ Se calentó la disolución en un horno de microondas aproximadamente por 1 min por fracciones de 20 segundos.
- ➔ Se dejó que disminuyera su temperatura y se le agrego 1 gota de BRET.
- ➔ Se vertió la mezcla en el soporte cuidando que no se formaran burbujas, se colocaron los peines.
- ➔ Se esperó a que gelificara la solución.
- ➔ Se retiraron los peines y se colocó el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
- ➔ Se agregó TAE IX a la cámara, dejando al gel cubierto.

Carga y corrida del gel

- ➔ Se puso en un trozo de parafin 3µL de BRET, 3µL de colorante Blue/Orange y 5µL de la muestra obtenida de la cuantificación del ADN.
- ➔ Se cargó en los orificios hechos por el cepillo, la solución compuesta en el paso anterior.
- ➔ Se activó el campo eléctrico a 90 V.
- ➔ La corrida duro hasta que el colorante se visualizó cerca del extremo opuesto, aprox. 40 min.

Visualización de los fragmentos

- ➔ Se colocó el gel dentro del transluminador.
- ➔ Se centró el gel y se encendió el transluminador.

Se encendió la cámara y se fotografió el gel.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados del objetivo 1

*“Reunir las muestras de granos de maíz de diferentes regiones del país para poder aislar las cepas de *Fusarium verticillioides*”.*

Se obtuvieron 18 muestras de granos de maíz y 10 de productos procesados de maíz, para esta experimentación y se encuentran en los cuadros 2 y 3.

3.2. Resultados del objetivo 2

*“Analizar la micobiota en los granos de maíz mediante medios selectivos para aislar *Fusarium verticillioides*”*

En los cuadros siguientes (cuadros 6, 7 y 8) se encuentra la micobiota que estuvo presente en los granos de maíz realizadas en medio de cultivo PDA.

En las 18 muestras analizadas se observa que la especie que predominó fue *Fusarium verticillioides* con mayor número de aislamientos en cada muestra, en algunas siendo el único hongo presente (muestra 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 16 y 17). Excepto la muestra 12 de Atlacomulco en el que predominó el *Rizopus* con 27 aislamientos, 100% de

frecuencia de aislamientos y densidad relativa de 60%.

La muestra que tuvo mayor presencia de *Fusarium verticillioides* fue en la 17 de Calvillo, Aguascalientes con 59 aislamientos, 12% de frecuencia de aislamientos y 100% de densidad relativa; la que tuvo menor presencia de *Fusarium verticillioides* fue la muestra 3 con 0.4% de frecuencia de aislamientos y 100% de densidad relativa.

Con respecto a *Penicillium* la muestra con mayor presencia fue la 2 con 12 aislamientos, 34% de frecuencia de aislamientos y 22% de densidad relativa; con menor presencia fue la 14 y 15 con un aislamiento, 2.86% de frecuencia de aislamientos respectivamente, 3.85% de densidad relativa para la muestra 14 y 2.13% de densidad relativa para la muestra 15.

Las muestras 14 (Celaya, Guanajuato) y 15 (Oaxaca) fueron las únicas que presentaron *Eurotium* con 2 aislamientos, 50% de frecuencia de aislamientos respectivamente y 7.69% de densidad relativa en la 14 y 4.26% en la muestra 15.

Con respecto a la presencia de *Aspergillus flavus* fueron únicamente las muestras 14 y 15 con un aislamiento, 50% de frecuencia de aislamiento y con 3.85%, 2.13% de densidad relativa, respectivamente.

Aspergillus candidus esta especie se presentó en la muestra 15 con dos aislamientos, 100% de frecuencia de aislamientos y 4.26% de densidad relativa.

La especie *Aspergillus niger* solo tuvo presencia en la muestra 14 de Celaya, Guanajuato con un aislamiento, 100% de frecuencia de aislamientos y 3.85% de densidad relativa.

Las muestras que más especies de géneros presentaron fueron la 14 y 15.

Cuadro 6 Número de aislamientos

	No. De aislamientos																		
MUESTRAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Tot
GENERO																			
<i>F. verticillioides</i>	7	43	2	6	11	34	12	28	25	34	50	18	28	21	41	48	59	24	491
<i>Penicillium</i>	0	12	0	0	0	0	0	6	0	3	10	0	0	1	1	0	0	2	35

<i>Eurotium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	4
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
<i>Aspergillus candidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
<i>Rizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	27
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Libres	53	5	58	54	49	26	48	26	25	23	0	15	32	34	13	12	1	34	508
TOTAL	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	

Cuadro 7 Cálculo de la frecuencia de aislamiento

	Frecuencia de aislamientos (%)																		
MUESTRAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Tot
GENERO																			
<i>F. verticillioides</i>	1.4	8.8	0.4	1.2	2.2	6.9	2.4	5.7	5.1	6.92	10.2	3.67	5.7	4.28	8.35	9.776	12	4.89	100
<i>Penicillium</i>	0	34	0	0	0	0	0	17	0	8.57	28.6	0	0	2.86	2.86	0	0	5.71	100
<i>Eurotium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	0	0	0	100
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	0	0	0	100
<i>Aspergillus candidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	100
<i>Rizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100

Cuadro 8 Cálculo de la densidad relativa

	Densidad relativa (%)																		
MUESTRAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
GENERO																			
<i>F. verticillioides</i>	100	78	100	100	100	100	100	82	100	91.9	83.3	40	100	80.8	87.2	100	100	92.3	
<i>Penicillium</i>	0	22	0	0	0	0	0	18	0	8.11	16.7	0	0	3.85	2.13	0	0	7.69	
<i>Eurotium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.69	4.26	0	0	0	
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.85	2.13	0	0	0	
<i>Aspergillus candidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.26	0	0	0	
<i>Rizopus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.85	0	0	0	0	
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

3.3. Resultados del objetivo 3

“Evaluar los primers reportados para Fusarium verticillioides mediante programas bioinformáticos.”

Se evaluaron las siguientes secuencias del cuadro 4 de los primers reportados en el artículo Bertechini F. C., (2012).

Cuadro 9 Primers seleccionados

Primers	Secuencia
Frontal	5'-CACTGGTGGTAACGATGCG
Reverso	5'-CACCTGAGTGCCCTTGGTG

En el programa bioinformático GenBank para conocer la secuencia del gen “*GaoB* de *Fusarium verticillioides*” para su posterior uso en “Sequencher”. Esto se muestra en el Anexo 1.

Se encontró que en el artículo reporta que el amplificado es de 370 pb, pero evaluándolos en el Sequencher se encontró que el amplificado es de 371 pb ocupando las secuencias ya mencionadas anteriormente en la tabla 4, encontrando un error en el artículo Bertechini F. C., (2012).

El artículo reporta una temperatura de hibridación de 64°C y la temperatura calculada dependiendo de los primers es de 57°C (anexo 2).

3.4 Resultados del objetivo 4

“Comprobar la especificidad de los cebadores utilizando especies filogenéticamente cercanas y la cepa para la posterior detección de Fusarium verticillioides.”

En la figura 24 se muestra el gel de agarosa de la muestra control de una cepa de *Fusarium verticillioides* al 1% que se corrió a 90V. En el carril 1 se encuentra el

marcador de peso molecular de 100 pb, el carril 2 es el “blanco” no amplificó demostrando que la PCR no fue contaminada, carril 3 amplificó demostrando que los primers para la especie *Fusarium verticillioides* del gen GaoB (galactosa oxidasa) es de 371 pb.

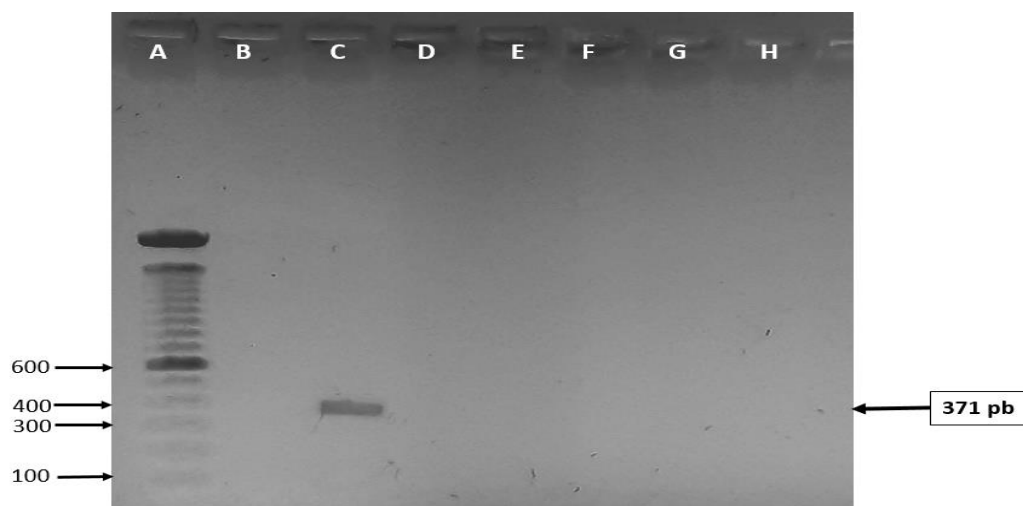


Figura 24 Gel de agarosa de muestra control de FV al 1% corrido a 90V. A) Marcador de peso molecular de 100 pb; B) Blanco; C) Cepa de *Fusarium verticillioides*

En la figura 25 se puede apreciar el análisis electroforético de la PCR con los primers de *Fusarium verticillioides* del gen GaoB (galactosa oxidasa). En el gel se observó el amplificado en el carril 3 y 4 que corresponden a las muestras de *Fusarium verticillioides* con el amplificado de 371 pb, así cumpliendo con el objetivo de ser unos primers específicos solo amplificando en la zona de interés hibridando únicamente con la especie de *F. verticillioides*, apreciando también que en los demás carriles no hubo interacción con las demás especies que se analizaron que fueron: *Aspergillus flavus*, *Penicillium oxalicum*, cerdo, cacahuete y calabaza.

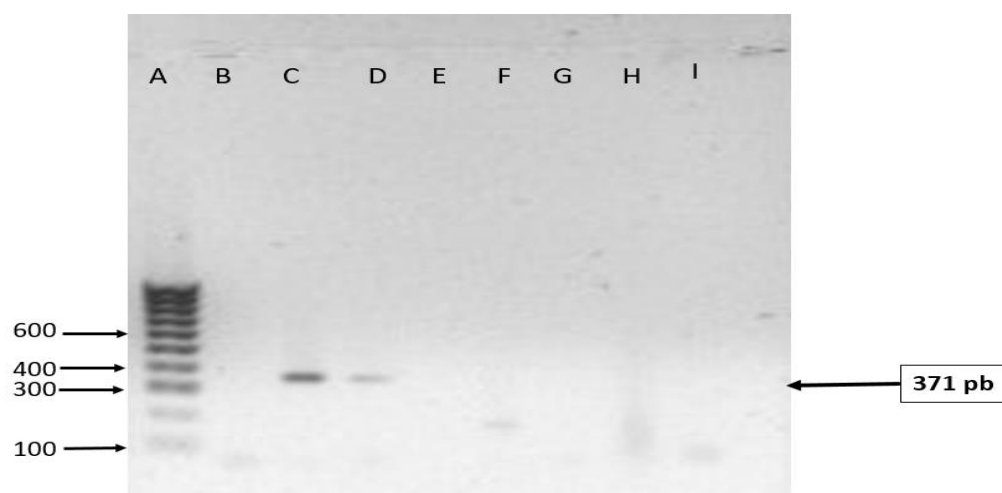


Figura 25 Gel de especificidad de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C-D) *Fusarium verticillioides*; E) *Aspergillus flavus*; F) *Penicillium oxalicum*; G) Cerdo; H) Cacahuate; I) Calabaza.

3.4 Resultados del objetivo 5

“Detección de *Fusarium verticillioides* aplicando la técnica de la PCR en granos y productos procesados de maíz.”

❖ Granos de maíz

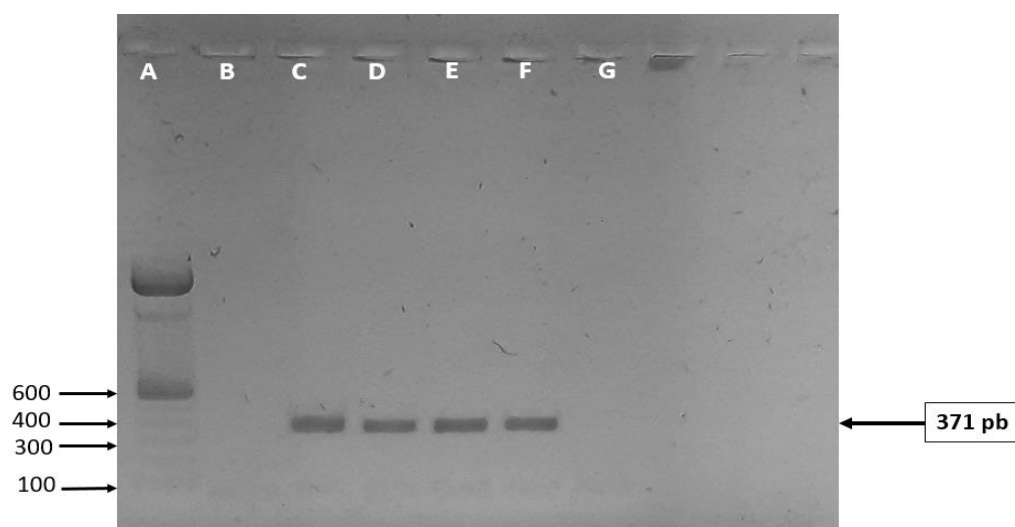


Figura 26 Gel de agarosa al 1% A) Marcador de molecular; B) Blanco; C) Maíz 1; D) Maíz 2; E) Maíz 3; F) Maíz 4; G) Maíz 5.

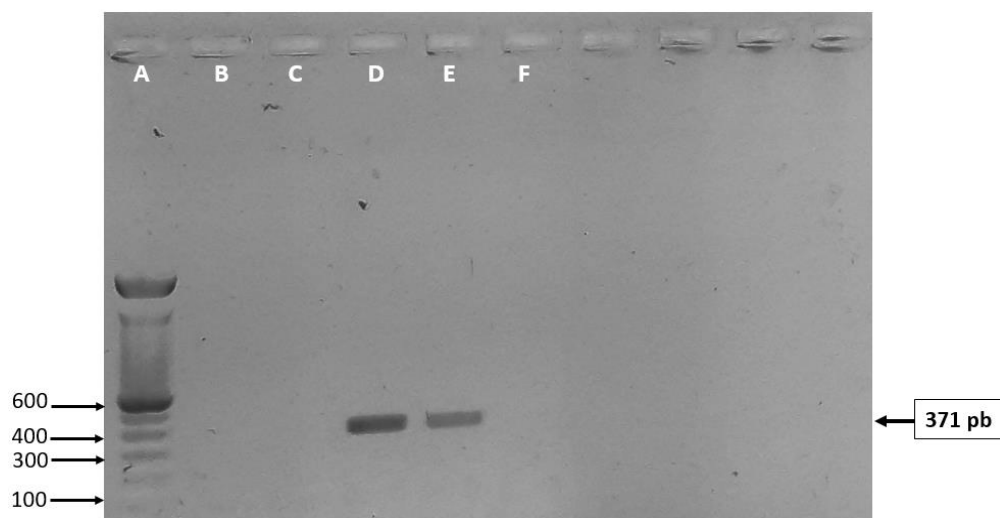


Figura 27 Gel de agarosa al 1% A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Maíz 6; D) Maíz 7; E) Maíz 8; F) Maíz 9.

En la figura 26 y 27 se observa la electroforesis de la PCR realizada de manera correcta, ya que no existió una hibridación específica en la muestra del blanco, quedando vacía demostrando que la PCR no está contaminada. Se evaluaron en este gel de agarosa las muestras 1 a la 9 de los granos de maíz, observando que las muestras 1 de Celaya, 2 de San Mateo, 3 del Bajío de Guanajuato, 4 de Celaya, 7 maíz blanco y 8 de Tamaulipas tienen un amplificado de 371 pb así demostrando que estas muestras están contaminadas con la especie del hongo *Fusarium verticillioides*.

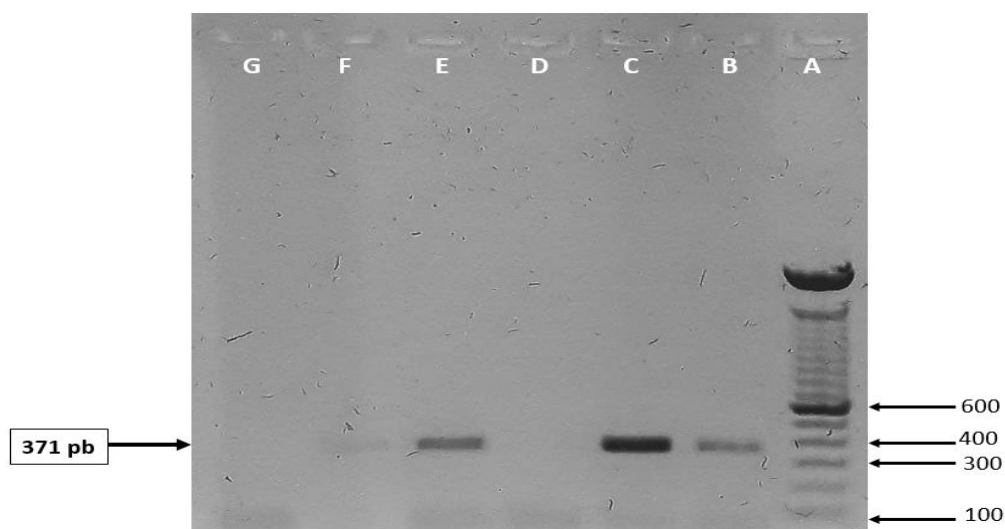


Figura 28 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Maíz 10; C) Maíz 11; D) Maíz 12; E) Maíz 13; F) Maíz 14; G) Blanco.

En la figura 28 y 29 nuevamente se observa la electroforesis de la PCR realizada para la identificación del *Fusarium verticillioides* en algunos granos de maíz, observando que el carril del Blanco no está ningún amplificado demostrando que la PCR se llevó acabo correctamente sin contaminarse. Las muestras evaluadas fueron de la 10 a la 18. Concluyendo que las muestras 10 de Tamaulipas, 11 de Coahuila, 13 de Celaya, 14 de Celaya, 15 de Oaxaca, 16 de especie peruano y 18 de Axotlan está presente el hongo *Fusarium verticillioides* ya que se muestra el amplificado de 371 pb en cada carril correspondiente. Las muestras 12 de Atlacomulco y 17 de Aguascalientes no se detectó la presencia de *Fusarium verticillioides*.

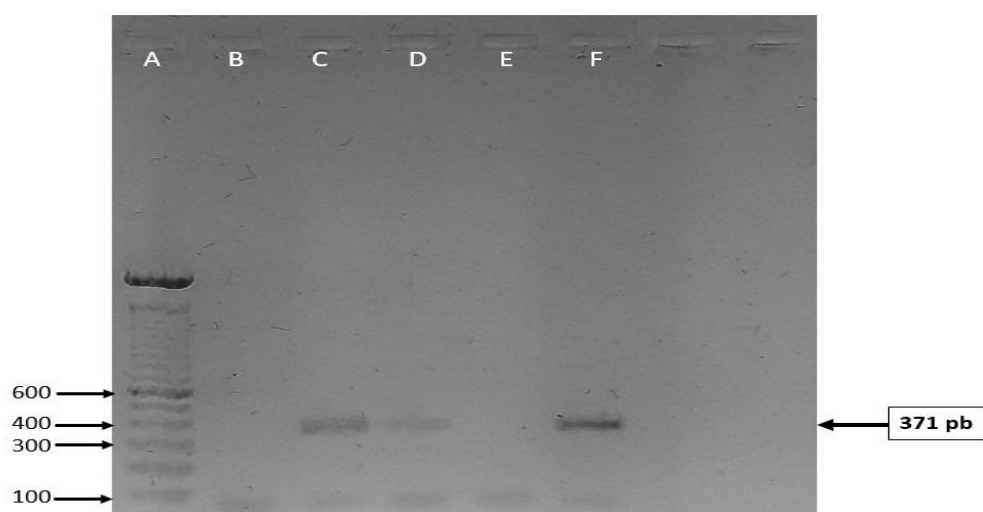


Figura 29 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Maíz 15; D) Maíz 16; E) Maíz 17; F) Maíz 18.

❖ Productos procesados de maíz

En la figura 30 se observa el gel de electroforesis de la PCR que se realizó para la identificación de *F. verticillioides* en productos procesados de maíz, las muestras se repitieron por duplicado, en carril 2 no se muestra ningún amplificado demostrando que la PCR se realizó correctamente, ya que también amplifico en carril 3 que es el control positivo. En los demás carriles no se muestra ningún amplificado eso demuestra que las muestras; 1 (Tortilla local), 2 (Tortilla empaquetada) y 3 (Tostadas de maiz “salmas”) no están contaminadas de *F. verticillioides*.



Figura 30 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Control positivo; D-E) M 1; F-G) M 2; H-I) M 3

En la figura 31 se muestra una electroforesis de la PCR realizada correctamente ya que no se muestra ningún amplificado en el carril 2 y un amplificado en el carril 3 del control positivo. En los carriles de las muestras 4 (Totopos comerciales), 5 (Churros) y 6 (Hojuelas) no se observa ningún amplificado, demostrando que no existe contaminación alguna de *F. verticillioides*.

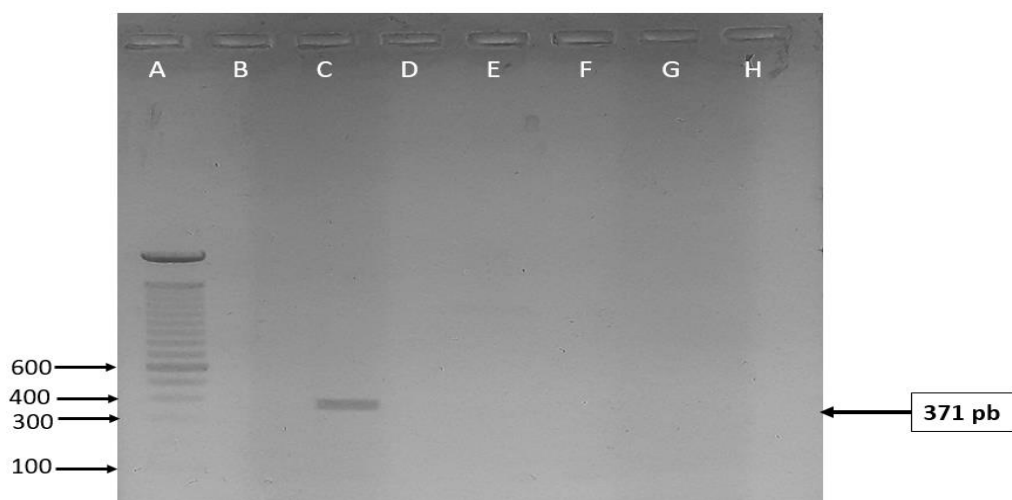


Figura 31 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Control positivo; D-E) M 4; F) M 5; G-H) M 6.

El la figura 32 se muestra un gel de electroforesis de la PCR para las muestras 7 (Hojuelas “Zucaritas”) y 8 (Tortilla azul) de los productos procesados, observando

que no existe contaminación de *F. verticillioides* en esas muestras. En el carril del blanco se muestra limpio y el carril 3 del control positivo muestra un amplificado, demostrando que se realizó correctamente la PCR.

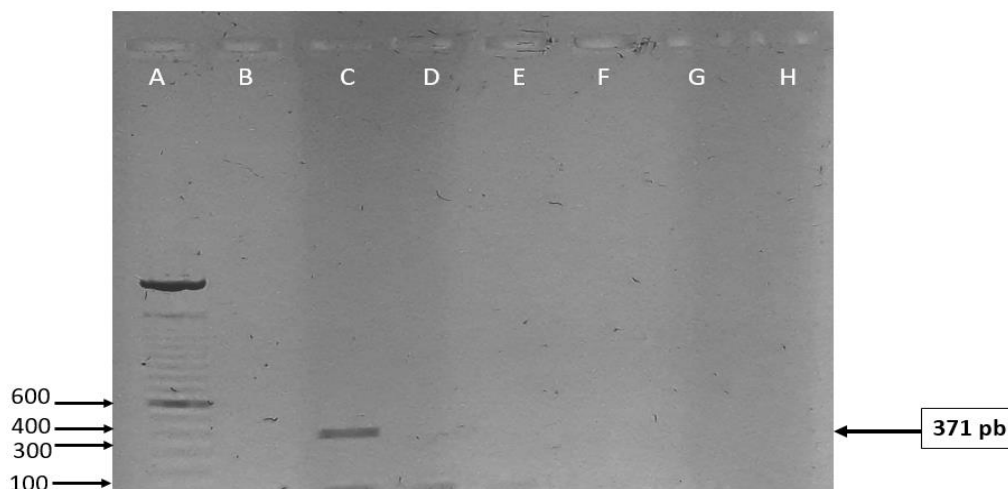


Figura 32 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C) Control positivo; D-E) M 7; F-G) M 8

En la figura 33 se observa la electroforesis de la PCR realizada de manera correcta, ya que no existió una hibridación específica en la muestra del blanco, quedando vacía demostrando que la PCR no está contaminada y demostrando un amplificado en el carril 3 y 4 que son el control positivo. Los carriles de las muestras 9 (Harina “maseca”) y 10 (Harina “omalli”) no se muestra ningún amplificado, demostrando que no hay presencia de *F. verticillioides*.

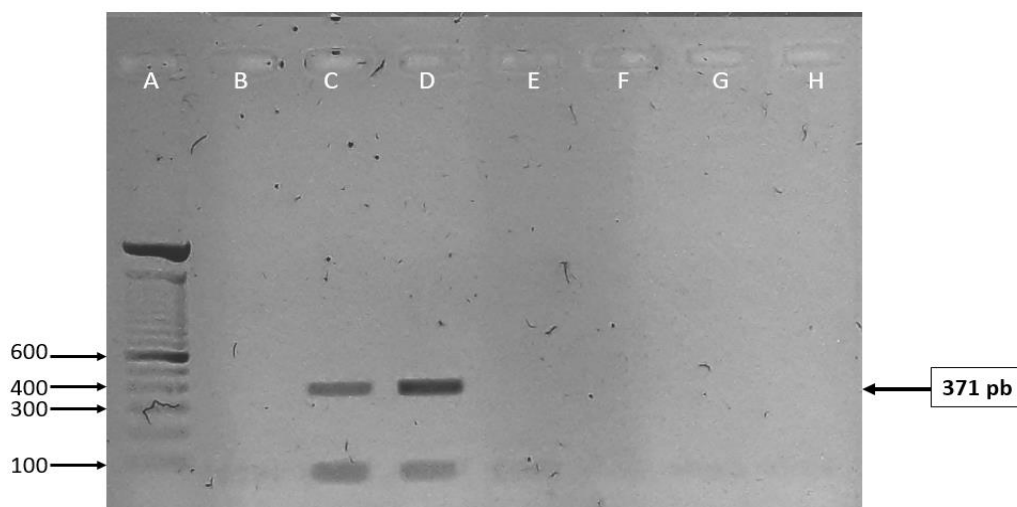


Figura 33 Gel de agarosa al 1%; A) Marcador de peso molecular; B) Blanco; C-D) Control positivo; E-F) M 9; G-H) M 10

En las muestras de productos procesados de maíz, no se detectó por biología molecular la especie de *F. verticillioides*, probablemente porque que no estaba presente esta especie en las muestras analizadas o porque con el maíz con el que se realizan esos productos fue inducido a procesos térmicos en los cuales es posible que haya degradado el ADN de los microorganismos.

CONCLUSIONES

- © Se obtuvieron 18 muestras de granos de maíz de diferentes regiones de la República Mexicana; como Oaxaca, Guanajuato, Tamaulipas, Puebla, Coahuila y Estado de México.
- © En la micobiota que se realizó, todas las muestras analizadas tenían *Fusarium verticillioides*, es el hongo que tuvo mayor presencia en esta experimentación ya que es la especie que más se encuentra en el maíz. Otras especies de hongos que se encontraron fueron el *Penicillium* y *Rizopus*.
- © Los primers seleccionados para *Fusarium verticillioides* se analizaron con los programas bioinformáticos Sequencher y GenBank confirmando que el amplificado es de 371 pb, detectando correctamente la presencia del hongo.
- © Los primers fueron específicos ya que solo amplificó para la especie de *Fusarium verticillioides* y no para las otras especies filogenéticamente cercanas y lejanas.
- © Se identificó *Fusarium verticillioides* por medio de PCR en los granos de

maíz de diferentes estados, aunque no hubo presencia en los maíces 5, 6, 9, 12, y 17.

- © En las muestras analizadas de los productos procesados de maíz no se identificó *Fusarium verticillioides*, no se obtuvo ningún amplificado de 371 pb.
- © La reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Fusarium verticillioides* es de gran ayuda, ya que es un método rápido, eficiente y confiable.
- © La identificación de *Fusarium verticillioides* es de gran importancia en el maíz ya que este hongo es productor de fumonisinas (FB₁) y de acuerdo a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) la situó como posibles cancerígenos (esofágico), también es un riesgo de enfermedades cardiovasculares, defectos del tubo neural, alteraciones neurológicas, preeclampsia y aborto espontáneo para humanos; en animales la leucoencefalomalacia equina y el síndrome de edema pulmonar porcino

RECOMENDACIONES

- ® Realizar una determinación de fumonisinas en las muestras que se analizaron anteriormente porque aunque no se haya detectado la presencia del hongo, pueden estar presentes las fumonisinas debido a que son termoestables y puede ser que no se hayan eliminado en las muestras, es de suma importancia porque las fumonisinas causan un gran daño al humano y animales.
- ® Se puede analizar para la detección de *F. verticillioides* en otros tipos de productos elaborados a base de maíz, en diferentes tortillerías, en botanas, etc.
- ® Realizar una investigación con otras especies productoras de fumonisinas que pueden estar presentes en el maíz y sus productos.
- ® Hacer una campaña de conciencia a las empresas y agricultores sobre las consecuencias sobre el consumo humano y animal del maíz contaminado de fumonisinas producidas por *F. verticillioides*.

BIBLIOGRAFÍA

- (s.f.).
- Beable, G. (1938). Teosintle and the origin of maize. *Journal of Heredity* 30, 245-247.
- Beable, G. (1980). The ancestry of corn. *Scientific American* 242, 112-119.
- Bertechini, F., Lumi, A., Novais, S., Tessmann, D., & Parra, B. (2012). New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* and other species of the *Gibberella fujikuroi* Complex. *International Journal of Molecular Sciences. Brazil* 13:, 115-132.
- Bolivar, A. (2013). Reacción en Cadena de la Polimerasa como alternativa diagnóstica para *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium paratuberculosis*. *Revista Electrónica de Veterinaria España REDVET*, 14 (3):1-13.
- Buckler, E., & N.M., S. (2005). Maize origins, domestication, an selection. *Chapter 4. Columbia University Press. New York*, 67-90.
- Bush, B., Carson, M., Cubeta, M., Hagler, W., & Payn, G. (2004). Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* 94:, 93-99.
- Christensen, C., & Meronuck, R. (1976). *Manual of Fungi in Feeds, Foods and Cereal Grains*. Univ. Minn. Press: Minneapolis.
- CONACYT. (2014). *Ciencia y desarrollo*. Obtenido de Mejoramiento del maíz el caso de la fusariosis: <http://www.cienciaydesarrollo.mx/?p=articulo&id=102>
- Constable, P., Smith, G., Rottinghaus, G., & Haschek, W. (2000). Ingestion of fumonisin B1-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicol Appl Pharmacol* 162:, 151-160.
- De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en discapacidad*, 70-78.
- De la Torre H., M., Sanchez R., D., Galeana S., E., & Plasencia de la P., J. (2014). Fumonisinas-Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-Maíz.

- Revista Especializada en Ciencias Quimica-Biologicas*, 77-91.
- De León , C., & Rodríguez Montessoro, R. (2010). *El cultivo del maíz-Temas selectos II*. México, D.F.: Mundi-Prensa.
- Doebley , J., & H.H., I. (1980). Taxonomy of Zea (Gramineae) I.A subgeneric classification with key to taxa. *American Journal of Botany* 67 (6), 982-993.
- Doebley, J. (1983). The taxonomy and evolution of Tripsacum and teosinte, the closet relative of maize . *Proceedings of the Internacional Maize Virus Disease Colloquium and Worksho: The ohio Stete University* , 15-28.
- Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annual Reviw of Genetics* 38, 37-59.
- Doebley, J., M.M., G., & C.W., S. (1987). Patterns of variation between maize and Mexican annual teosinte. *Economic Botany* 41, 234-246.
- Engelhardt, J., Carlton, W., & Tuite, J. (1989). Toxicity of Fusarium moniliforme var. subglutinans for chicks, duckling and turkey poults. *Avian Disease* 33, 357-360.
- Erlich , H. A., & Arnheim, N. (1992). *Genetic analysis usin Polymerase Chain Reaction* . USA: Ann. Rev. Genet.
- Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. (2016). *Herbario Virtual*. Obtenido de <http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar>
- FAO . (2001). *El maíz en los tropicos mejoramiento y produccion* . Roma : Coleccion FAO: produccion y proteccion vegetal .
- FAO. (1993). Obtenido de El maíz en la nutricion humana: [http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm#Capitulo 1](http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm#Capitulo%201) Introducción
- Fideicomisos Instituidos en la Relacion con la Agricultura FIRA. (Octubre de 2015). *Panorama Agroalimentario* . Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf
- Fierro Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecologia*, 27-50.
- Fukanga, K., J., H., Y., V., Y., M., J.Sanchez, G., K., L., . . . J., D. (2005). Genetic diversity and population structure of tosinte. *Genetics* 169, 2241-2254.
- Galinat, W. (1971). The origen of maize. *Annual Review og Genetics* 5, 447-478.
- Galinat, W. (1995). The origen of maize, grain of humanity. *Economy Botany* 49(1), 447-478.
- Galinat, W. (2001). A reconstruction of the possible role of critical observations leading to a rapid domstic transformation of wild teosinteinto first maize. *Economy Botany* 55, 570-574.
- Gelderblom , W., Kriek, N., Marasas, W., & Thiel, P. (1991). Toxicity and carcinogenicity of the Fusarium moniliforme meabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis* 12, 1247-1251.
- Gelderblom, W., Cawood, M., Snyman, S., Vleggaar, R., & Marasas, W. (1993). Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis ans citotoxicity assays. *Journal Food Protecton*, 57(6): 522-527.
- Gonzales Arguinzones, U. (2009). *El maíz y los productos de su industrializacion*. Mexico : trillas .
- González, H. M. (1997). Fungi associated with sorghum grain from Argentina . *Mycopathologia* 139 , 35-41.
- Harrison, L., Colvin, B., Greene, J., Newman, L., & Cole , R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of fusarium moniliforme. *J. Vet. Diagn: invest* , 2: 271-221.
- Haschek , W., Kim, H.-M., Motelin, G., Stair , E., Beasley , W., Chamberlain, W., & Riley , R. (1993). Pure fumonisin B1, as well as fumonisin-contaminated feed, alters swine serum and tissue sphinganine and shingonise levels, biomarkers of exposure. *Toxicologist*, 13: 232-236.

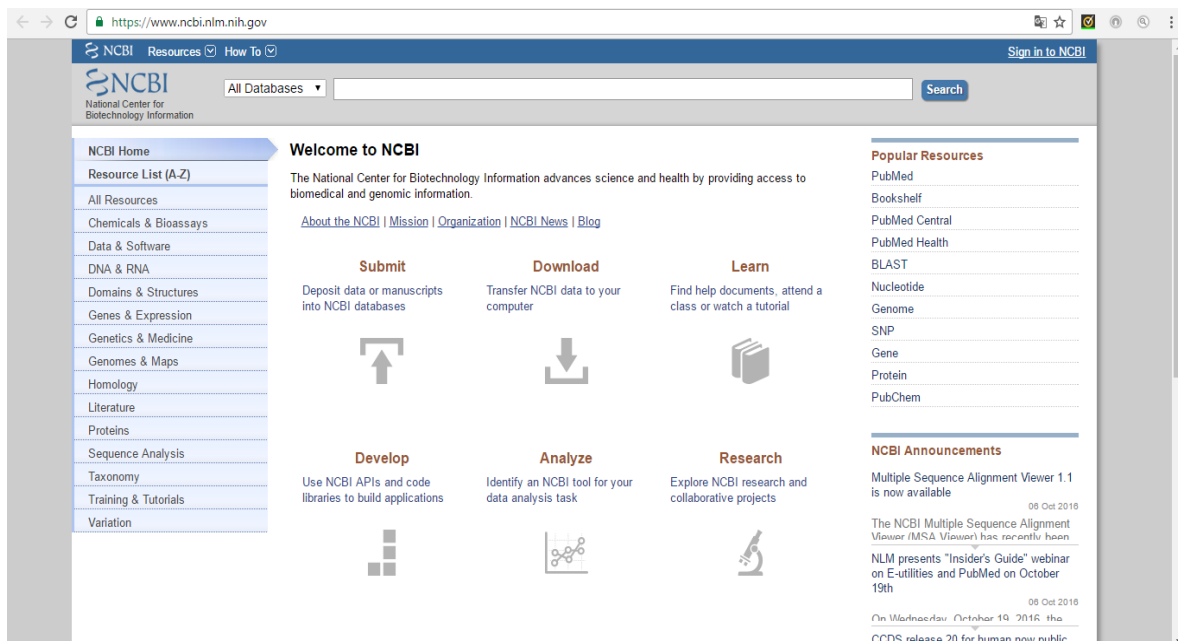
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. UNAM y Fondo de Cultura Económica, 552.
- IARC Monographs . (2002). *Evaluation of carcinogenic risks to humans Volumen 82*. Francia: IARC.
- Ilitis, H. (1983). From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science* 222, 886-894.
- Innis, M. (2010). *Amplificación de DNA in vitro por PCR*. Puerto Rico.
- Kato, Y., & T., A. (1984). Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evolutionary Biology Volume 17*, 219-253.
- Kato, Y., & T., A. (1976). Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea mexicana* Schrader Kuntze) in relation to their origin in evolution . *Massachusetts Agricultural Experiment Station Bulletin* 635, 1-185.
- Leslie JF, S. B. (2006). The Fusarium Laboratory Manual . *Blackwell Publishing. USA.*, 388.
- Levin, L., Ridao, A., & Castaño, F. (2003). Fusariosis de la espiga en el maíz. *INTA: 20a Jornada de actualización profesional en cultivos de verano*, 165.
- Marasas , W. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ Health Perspect* 09 Suppl 2, 239-243.
- Marin s, S. V. (1999). Environmental factors, in vitro interactions, an niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize. *Mycol, Res* 102: 831-837.
- Martinez, M., Palacios , N., & Ortiz, R. (2009). Caracterización nutricional del grano de 50 accesiones de maíz cubano, cultivos tropicales. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas* 30(2):, 80-88.
- Matsuoka, Y., Y., V., M.M., G., J. Sanchez, G., E.S., B., & J.F., G. (2002). a single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *PNAS* 99, 6080-6084.
- Moreno Martinez, E. (1998). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. Ciudad Universitaria, México DF: Impresos De Alba.
- Moretti , A. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: A Continuous Fight between Lumpers and Splitters. *Institute of Sciences of Food Production* , 7-13 .
- Mullis , K. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, 579-582.
- Nelson , P., Toussoun, T., & Marasas, W. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. *The Pennsylvania State University, USA*, 128-131.
- Nelson, P., Dignami, M., & Anaissie , E. (1994). Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology. Review* 7(4), 479-504.
- Nitschke , E., Nihlgard, M., & Varrelmann, M. (2009). Differentiation of even *Fusarium* spp. Isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of polymerase chain reaction-amplified translation elongation factor 1 α gene fragment . *Mycology* 99 (8), 921-929.
- Palomares, J., & Cuenca, M. (2007). *Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular* . Revista Iberoamericana de Micología .
- Pamplona Roger, J. D. (2008). *Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo*. Madrid, España: SAFELIZ, S.L.
- Perera , J., Tormo , A., & García , J. (2002). *Ingeniería Genética*. España : Editorial Síntesis .
- Poza, J., Ciriza , J., Zaragoza, P., Mas, E., Osta, R., & Rodellar, C. (15 de Noviembre de 2001). *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Obtenido de Revista aquatic: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>
- Preciado Ortiz, R. E., Guerrero Herrera, M. d., & Ortega Corona, A. (2013). *Diversidad y distribución del maíz nativo y sus parientes silvestres en México*. México, D.F.: bba.
- Quintero-Benitez , J., & Apodoca-Sánchez, M. (2008). Pudrición de la mazorca. Manejo

- sustentable del maíz. *Fundacion Produce Sinaloa, Sagarpa*, 71-78.
- Reyes Castañeda, P. (1990). *El maíz y su cultivo*. México, D.F.: A.G.T. Editor, S.A.
- Rimache Artica, M. (2008). *Cultivo del Maíz*. Macro.
- Schulthess, K., Cardwell, K., & Gounou, S. (2002). The effect of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. *Phytopathology* 92:2:, 121-128.
- SE (Secretaría de Economía). (2012). Analisis de cadena de valor de maíz-tortilla: situación actual y factores de competencia local.
- Shibata, D., W.J., M., & N., A. (1988). Analysis of DNA Sequences in Forty-Year-Old Paraffin-embedded Thin-Tissue. *Cancer Research* 48, 4564-4566.
- SIAP. (2014). Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K. (2008). Review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Hum Exp Toxicol* 27, 799-809.
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in molecular Biology (Vol.8)*. Indiana, USA.
- Sylvester, A., P.S., S., & R., M. (2009). The maize genome poster. *Science AAAS*.
- Torres S., L., & Lopez C., L. (2010). Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud publica* 52, 461-467.
- Torres Sanchez, L., & Lopez Carrillo, L. (2010). Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud Pública de México*, 461-467.
- Tsung-Che, T., & Chen-Yi, L. (1997). Occurrence of Fumonisin B1 and B2 in Corn-Based Foodstuffs. *Taiwan Mycopathologia*, 57-61.
- Tuite, J. (1982). *Examining and identifying fungal cultures growing out from corn kernels*. Dept. of Plant Path. Univ. Purdue, Indiana.
- Vera Cortés, J. L., Lopez Aguilar, F., Anguiano Fernández, M., & Lizárraga Cruchaga, X. (2014). *Temas de la antropología mexicana vol.II*. Academia Mexicana de Ciencias Antropológicas, A.C.
- White, A. (1982). *Principios de Bioquímica*. México: Ed. Mc Graw Hill.

ANEXOS

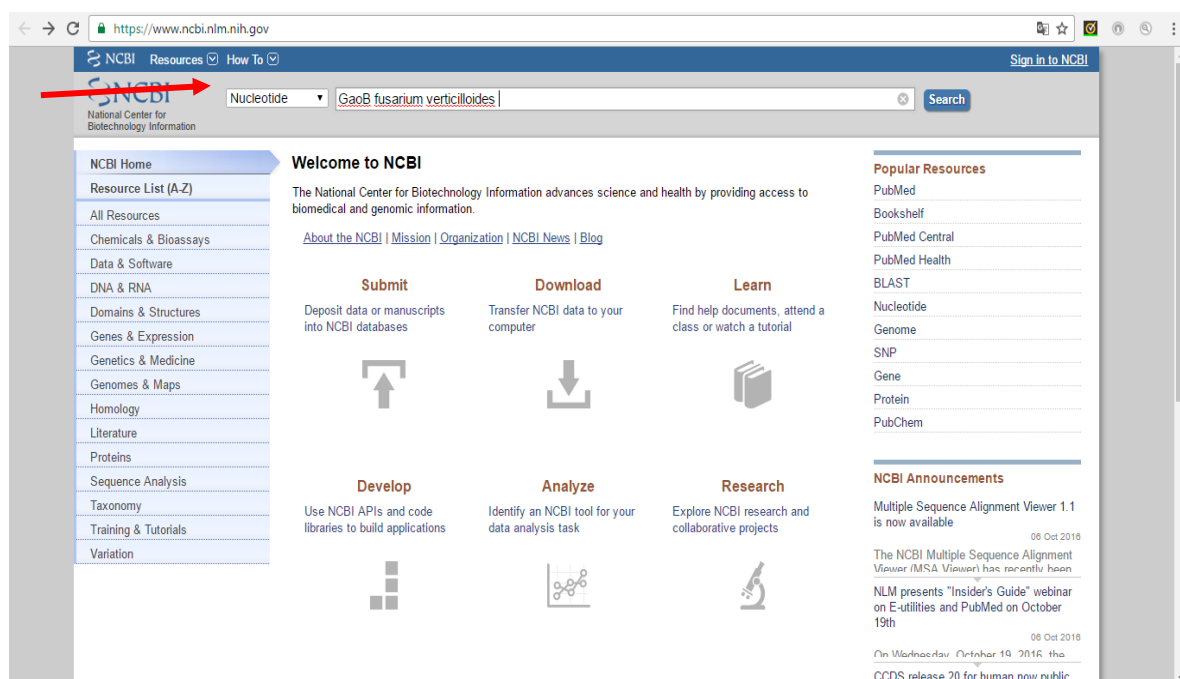
Anexo 1. Evaluación de los primers

Se comprobaron los primers reportados en los artículos científicos encontrados. Se ingresó a la página www.ncbi.nlm.nih.gov/

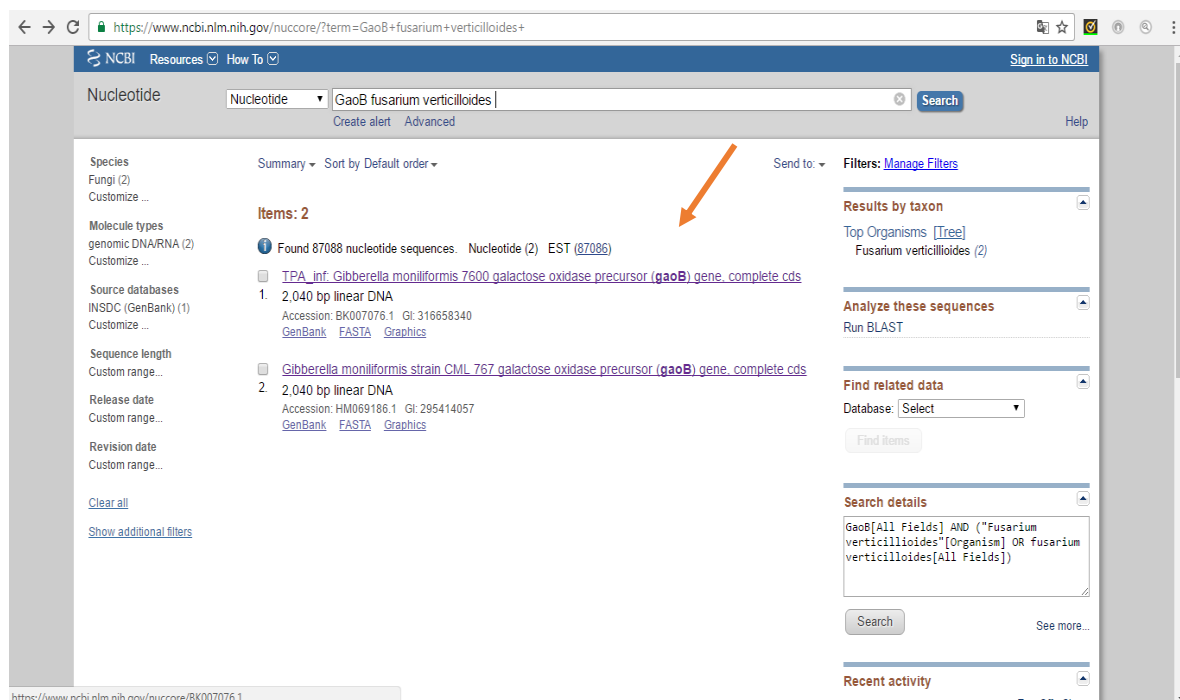


Seleccionamos la opción de “nucleótidos” y se coloca el gen “gaoB *Fusarium*

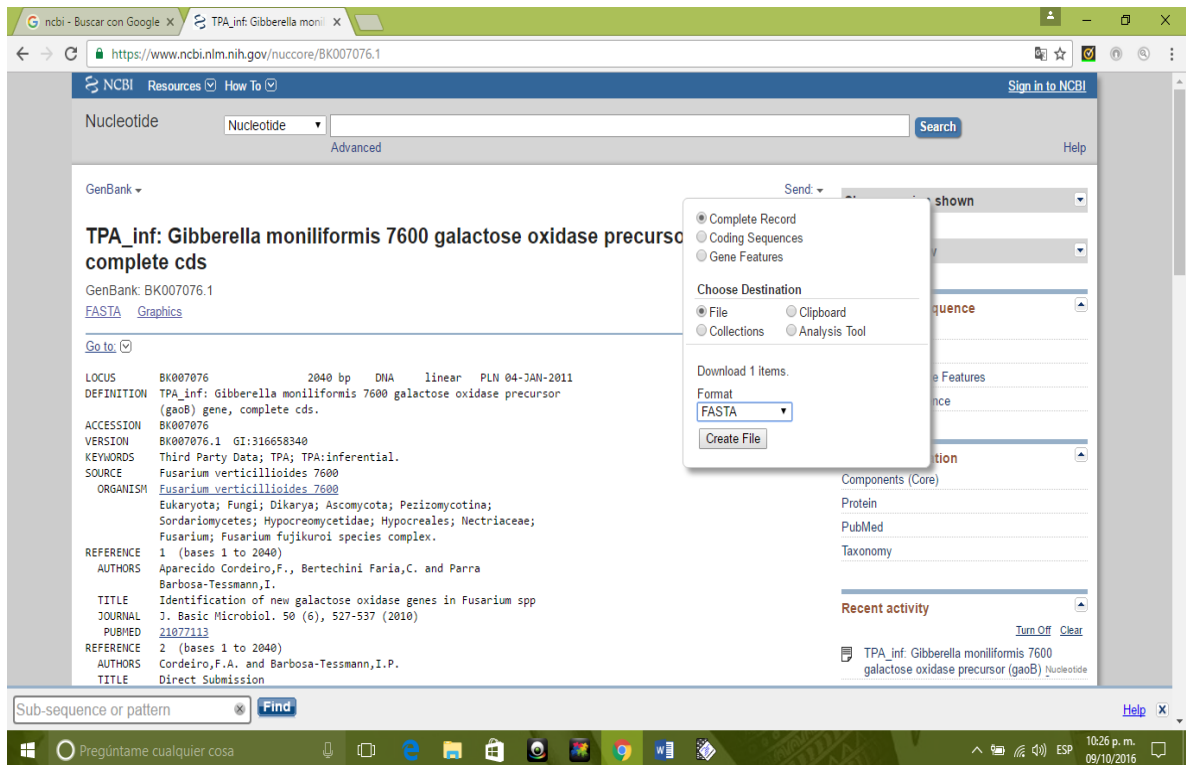
verticillioides”.



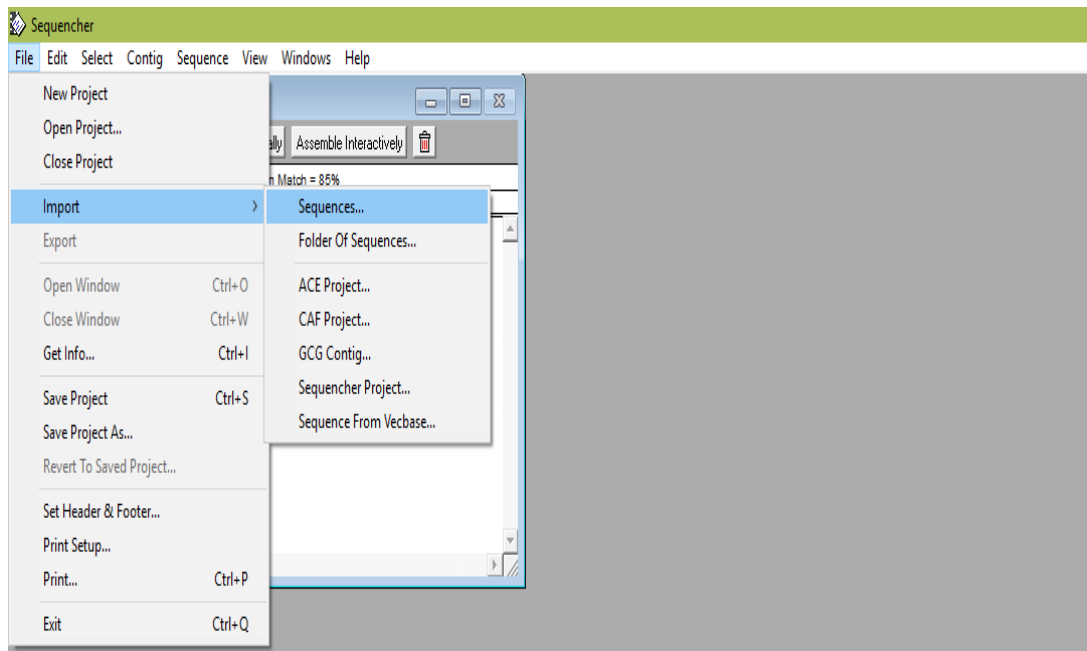
Se selecciona la primera secuencia del gen.



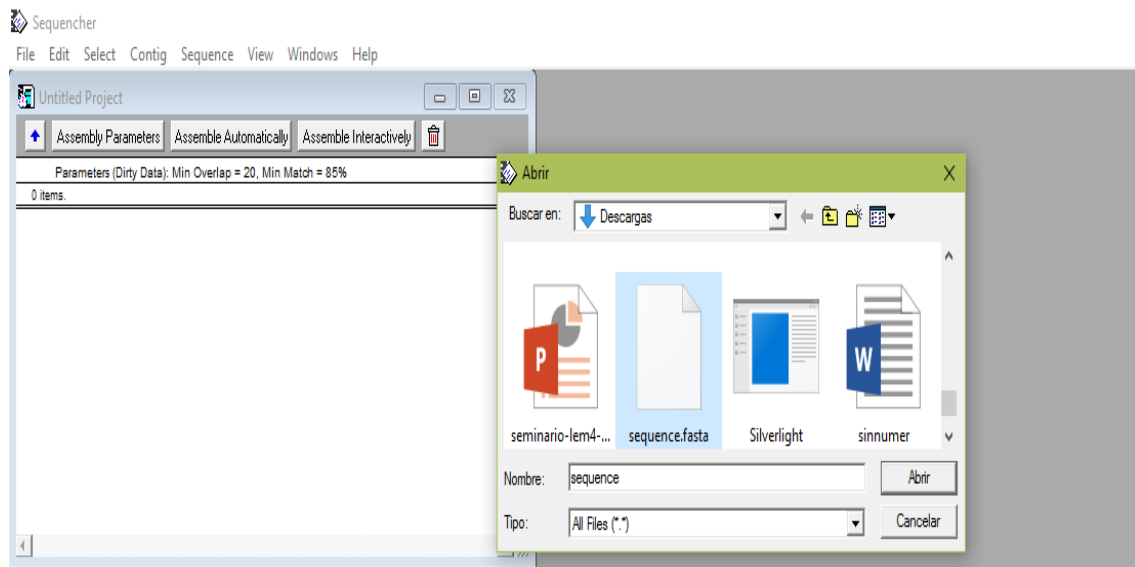
Seleccionamos la opción “Send” seguido de “File” y seleccionar el formato “Fasta” y se le da clic a “Create File” para posteriormente ocuparlo en el programa “Sequencher”.



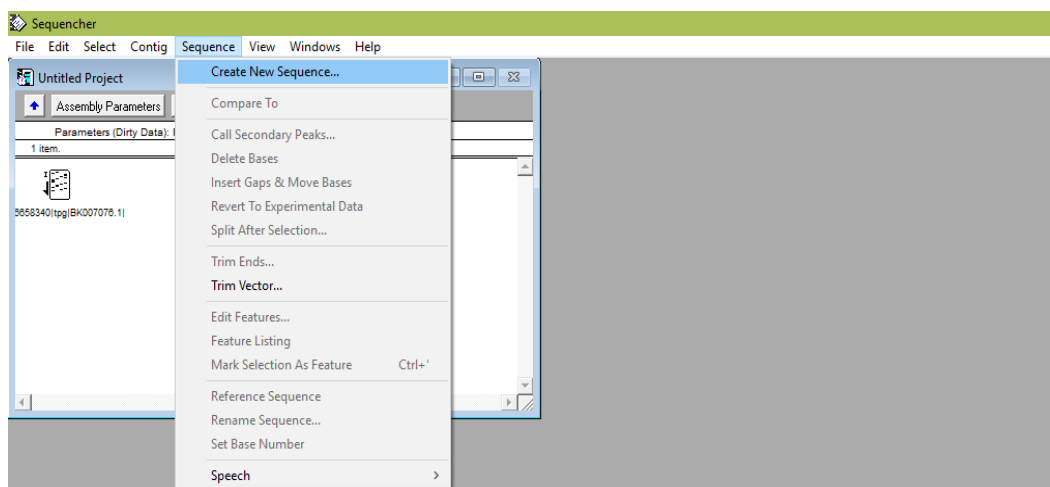
Seleccionamos “File” seguido de “import” y luego “Sequences...” para agregar la secuencia del gen que descargamos anteriormente.



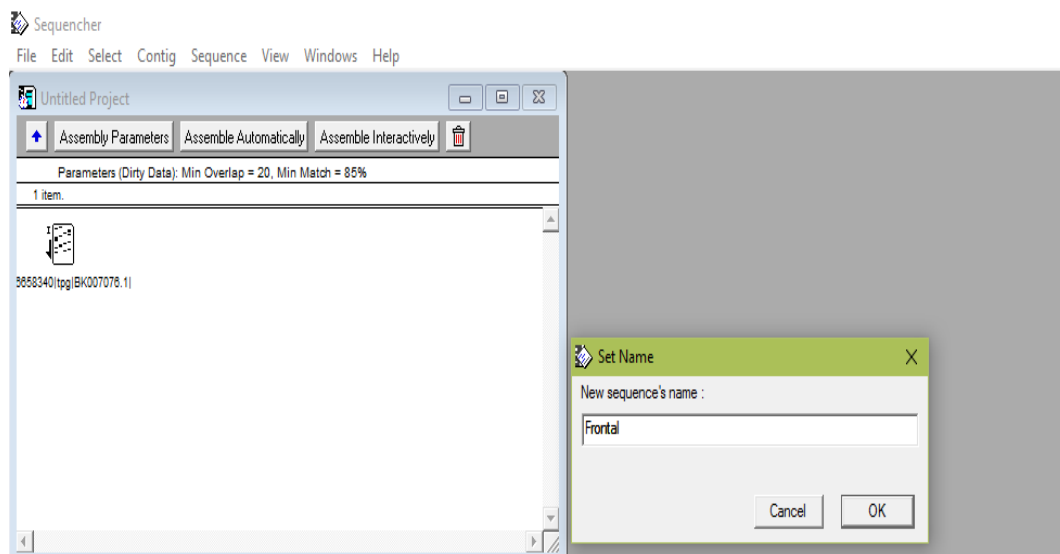
Seleccionamos la secuencia y se le da clic en “Abrir”.



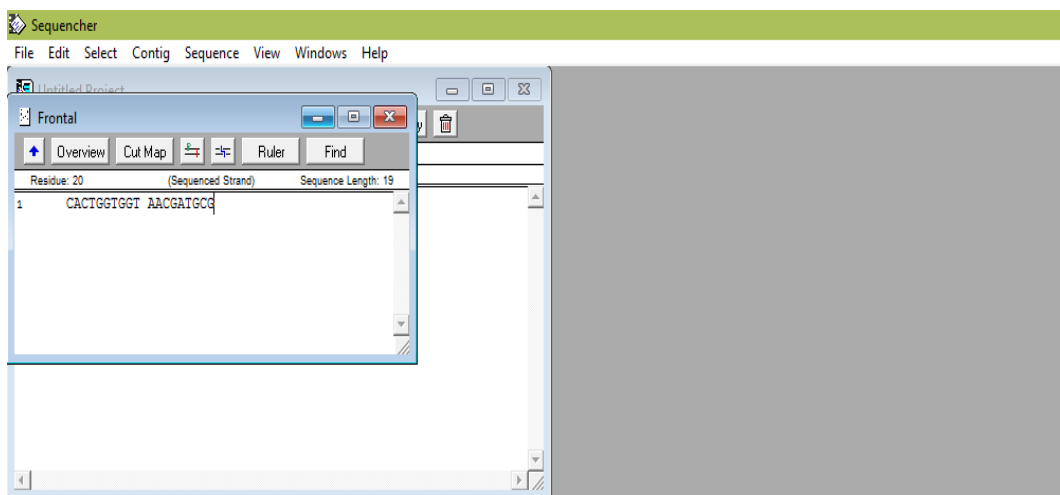
Se da clic en “Sequence” seguido de “Create new sequence...”



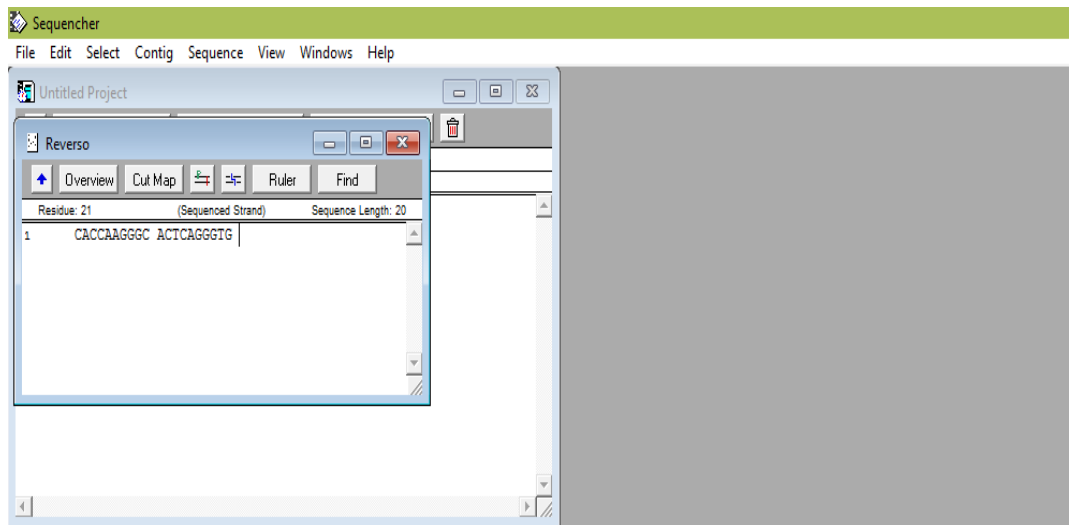
Se le coloca el nombre de primers que se desea buscar (frontal o reverso).



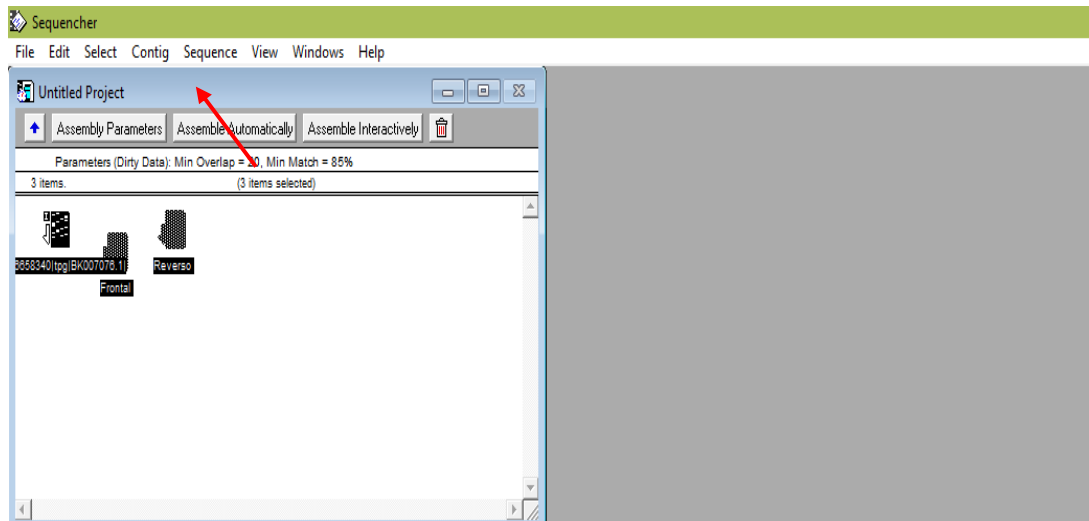
Se escribe la secuencia del primer frontal y se minimiza la ventana.



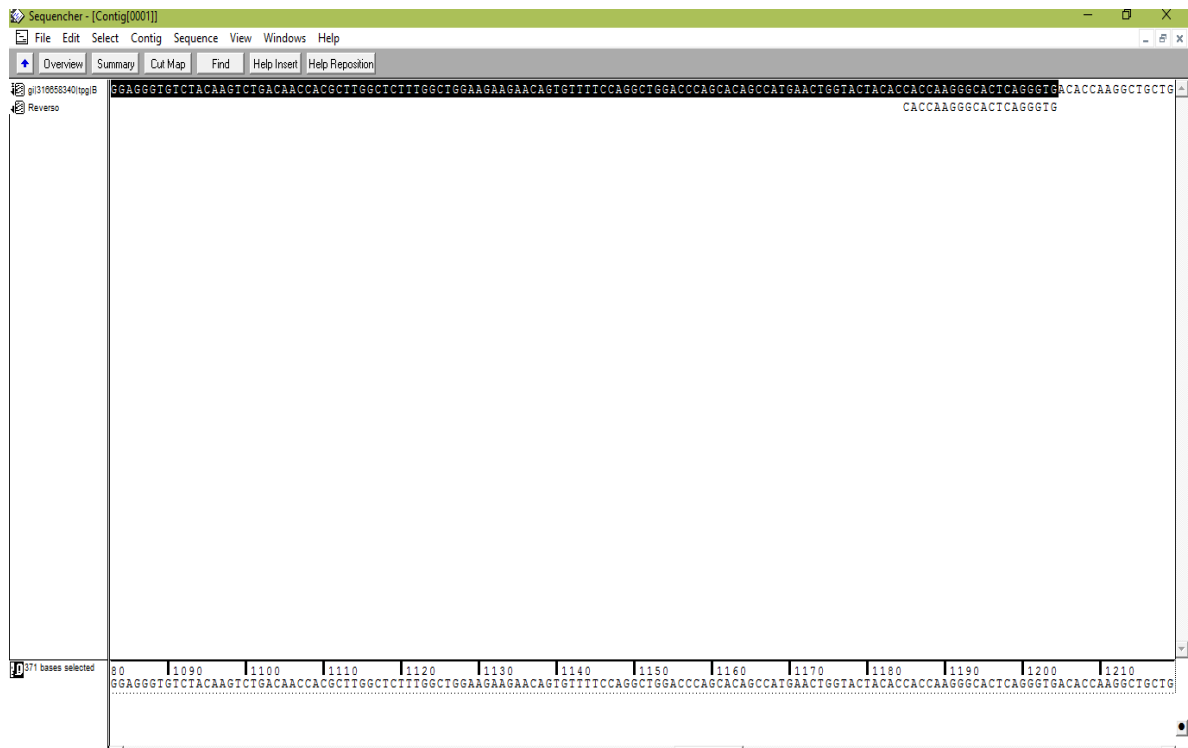
Después se escribe la secuencia del primer reverso y se minimiza la ventana.



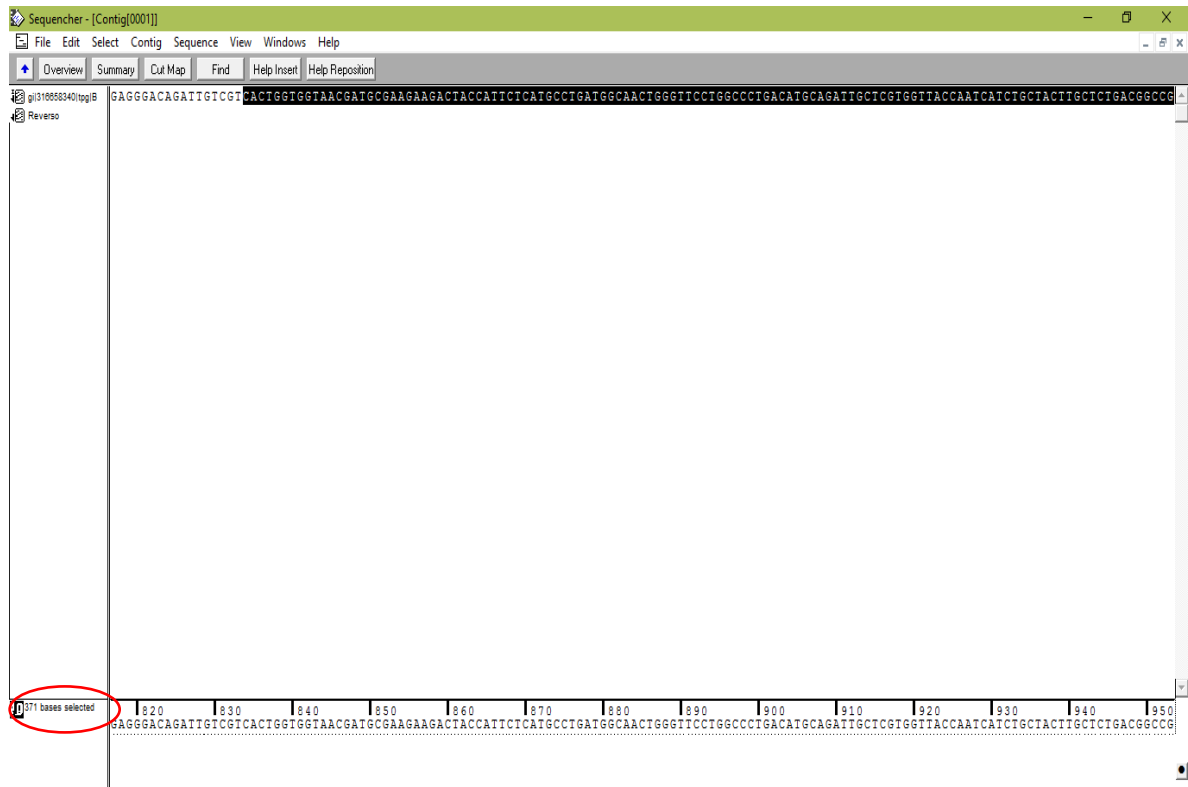
Se seleccionan las tres carpetas y se da clic en “Assemble Automatically” y “ok”



No reconoce el frontal ya que se abre la secuencia para ver cuál es el error. Se busca el primer reverso y se recorre 370 pb hacia la izquierda ya que es el valor del amplificado



Observando que la secuencia Frontal si esta pero aparece en 371 pb.



Anexo 2. Calculo de Tm

Primer	Secuencia	# de C	# de G	# de A	# de T
Frontal	CACTGGTGGTAACGATGCG	4	7	4	4
Reverso	CACCCTGAGTGCCCTTGGTG	7	6	2	5

Con la fórmula

$$T_m = (G+C)4 + (A+T)2 - 5$$

Primer	Sustitución	Resultado
Frontal	$(7+4)4 + (4+4)2 - 5$	55
Reverso	$(6+7)4 + (2+4)2 - 5$	59
	Promedio	57