



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TEZIUTLÁN



Tesis

“Identificación molecular de hongos provenientes de
maíces con síntomas de fusariosis”

PRESENTA:

**NORMA CECILIA HERNÁNDEZ
MILLÁN**

CON NÚMERO DE CONTROL
19TE0702

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

CLAVE DEL PROGRAMA ACADÉMICO
IIAL-2010-219

DIRECTOR (A) DE TESIS:
**MBP. JACQUELIN LEÓN BAÉZ
(ITS)**

“ La Juventud de hoy, Tecnología del Mañana ”

TEZIUTLÁN, PUEBLA, ENERO 2024



PRELIMINARES

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios por permitirme alcanzar mi posición actual, agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, quienes superaron desafíos económicos para llegar hasta donde estoy, por permitirme ser yo misma. A mi hermana, gracias por no dejarme sola y compartir momentos felices en días tristes.

Un agradecimiento especial a tío Eusebio y tía Dalia por su apoyo emocional y económico durante mi tiempo lejos de casa, haciéndome sentir parte de su orgullo. Al Dr. Francisco Roberto Quiroz, agradezco la oportunidad de ser su tesista en el CIIDIR, inspirándome a buscar soluciones, ver lo positivo y disfrutar de la vida, por permitirme conocer más de lo conocido, viviré agradecida con él.

A la Dra. Jacquelin León Báez, gracias por confiar en mí y motivarme a alcanzar mis metas.

A mis amigos, en especial a Ángel, por ser mi mayor apoyo emocional y vivir aventuras juntos.

A Moc, Dani, Cat, Ary y Sofi quienes han estado a mi lado desde el primer semestre, demostrando que la verdadera amistad supera cualquier obstáculo. Agradezco sinceramente a quienes se fueron y a quienes llegaron, enseñándome que siempre se puede salir adelante a pesar de las adversidades.

Dedicatoria

A mi madre

Imelda Millan quien ha sido mi guía, fuente de inspiración y mayor apoyo.

A mi padre

Gume por estar siempre presente para mí.

A mi hermana

Cris por ser mi compañía día a día y compartir conmigo su vida.

A Víctor Millán

Por motivarme a ser mejor persona y emprender mi viaje en solitario.

A mis mascotas

Mieth, Simón, Krebs, Luna y Elioth, por su amor incondicional durante mis desvelos.

Reconocimientos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fitomejoramiento Molecular perteneciente al Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional y parcialmente financiado por el programa Secretaría de Investigación y Posgrado titulado "Aislamiento, genómica y sistema lítico de hongos causantes de Fusariosis en cultivos estratégicos de alto consumo: hortaliza (Tomate) y gramínea (maíz)I" con No. 20230074, del proyecto de Infraestructura Insignia-IPN "Mejoramiento genómico de Maíz para el desarrollo de híbridos tolerantes a la Fusariosis usando tecnologías de última generación" y Fronteras de la Ciencia-Conacyt (no. 1070) del cual el Dr. Francisco Roberto Quiroz Figueroa fue responsable técnico de estos.

Dirección de contacto:

Dr. Francisco Roberto Quiroz Figueroa.

Laboratorio de Fitomejoramiento Molecular

Depto. de Biotecnología Agrícola

CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa

Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes #250

Guasave, Sinaloa, C.P. 81101

Tel. (687)872 9625 ext. 87659

labfitomol@hotmail.com

fquiroz@ipn.mx

Resumen

Fusarium spp es causante de enfermedades en diferentes partes de la planta, afectando desde su siembra hasta su recolección, abarcando desde las raíces, hojas e incluyendo la mazorca.

En la actualidad, sigue siendo una problemática con poco o nulo control hacia este género, con diferentes especies o complejos con comportamientos diferentes, no solo en el maíz, sino que en diferentes especies de plantas de interés comercial.

En este trabajo de investigación se identificaron diferentes especies con la técnica molecular de PCR, en la cual se utilizaron cebadores en genes de ITS-1 y ITS-4 donde los resultados obtenidos de la PCR se secuenciaron y con ayuda del identificador de genes "NCBI" se identificó una especie por parte de *Fusarium spp* la cual fue *Fusarium nygamai* provenientes de una zona maicera de Guasave, Sinaloa. La investigación se realizó en Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR Unidad Sinaloa).

Palabras claves: *Fusarium spp*, maíz, Técnicas moleculares, PCR, ITS, NCBI y *Fusarium Nygamai*.

Abstract

Fusarium spp causes diseases in different parts of the plant, affecting from sowing to harvesting, ranging from the roots, leaves and including the cob.

Currently, it continues to be a problem with little or no control towards this genus, with different species or complexes with different behaviors, not only in corn, but in different species of plants of commercial interest.

In this research work, different species were identified with the molecular technique of PCR, in which primers in ITS-1 and ITS-4 genes were used where the results obtained from the PCR were sequenced and with the help of the "NCBI" gene identifier. "A species of *Fusarium spp* was identified, which was *Fusarium nygamai* from a corn-growing area of Guasave, Sinaloa. The research was carried out at the Interdisciplinary Research Center for Regional Comprehensive Development Unidad Sinaloa belonging to the National Polytechnic Institute (CIIDIR Unidad Sinaloa).

Keywords: *Fusarium spp, corn, Molecular techniques, PCR, ITS, NCBI and Fusarium nygamai.*

Introducción

El maíz es un cultivo prioritario y estratégico para México con impacto económico, social y cultural. Su producción comercial es conocido principalmente por dos tipos; el maíz blanco y amarillo, el maíz blanco se suele caracterizar por el consumo humano, a comparación del maíz amarillo que suele ser distinguido en la industria o por su elaboración de alimentos para consumo de la sociedad (Gobierno de México, 2018).

Algunos de los principales estados con mayor producción son Sinaloa (22%), Jalisco (14%), México (8%), Michoacán (7%), Guanajuato (6%), Guerrero (5%), Veracruz (5%), Chiapas (5%), Chihuahua (4%), Puebla (4%) y el resto de los Estados representan el 20% de la producción, el maíz es fundamental para la preparación de diferentes platillos, que suele resaltar tradiciones mexicanas (Agropecuarios, 2018).

Actualmente existen algunos factores bióticos que impiden llevar un buen control en el maíz, mermando la productividad debido a las plagas y/o enfermedades, *Fusarium sp* es uno de los hongos que suele ser encontrado en diferentes especies de plantas, los cereales suelen ser afectado que algunas especies producen toxinas que llegan a afectar a los consumidores, inclusive pueden ser patógenos oportunistas en humanos, su impacto se ha considerado relevante debido a su efecto en la agricultura, la salud humana y animal, es un gran reto para los cultivadores generar estrategias que no permitan el avance de este hongo, debido al tiempo de atención que se necesita para dar tratamientos a los problemas que genera (Sáez Gómez, 2018).

El avance y los descubrimientos del ADN, permitieron el desarrollo de técnicas en biología molecular, usadas para conocer la evolución y distribución, en este caso de algunos patógenos. Se han implementado variadas estrategias moleculares que permiten dar un diagnóstico confiable para la identificación de microorganismos de

diferentes especies y su distribución (O'Donnell et al., 1998; Leslie et al., 2006; Gómez-López, 2008; Aoki et al., 2014).

Índice General

PRELIMINARES	1
Agradecimientos	2
Dedicatoria.....	3
Reconocimientos.....	4
Resumen.....	5
Abstract	6
Introducción	7
CAPITULO I.	14
Generalidades del proyecto.....	14
1.1 Datos generales de la empresa.	15
1.2 Antecedentes de la empresa	15
1.3 Objetivo general	16
1.3.1 Objetivos específicos	16
1.4 Problemas de investigación a resolver	16
1.5 Preguntas de investigación	17
1.6 Justificación de la investigación.....	17
1.7 Macro-localización, micro localización y ubicación.....	19
1.7.1 Macro-localización	19
1.7.2 Micro-localización	20
1.7.3 Ubicación.....	21
Capítulo II.....	22
Marco Teórico.....	22

2.1 Antecedentes.....	23
2.1.1 Identificación molecular de <i>Fusarium spp</i> , aislados en maíz en Sinaloa, México.	23
2.1.2 Identificación de especies de <i>Fusarium</i> en semilla de ajo en Aguascalientes, México.	23
Ochoa Cerna (2012)	23
2.1.4 Identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia.....	23
2.2 Marco Teórico.....	25
2.2.1 Maíz	25
2.2.2 Taxonomía del Maíz.....	26
2.2.3 Características generales	26
2.3 Hongo	27
2.3.1 Hongo Filamentosos	27
2.4 <i>Fusarium spp</i>	27
2.4.1 Taxonomía de <i>Fusarium spp</i>	29
2.4.2 Problemas causantes de <i>Fusarium spp</i>	30
2.5 Medio de Cultivo	30
2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i>	30
2.6 Identificación Molecular	31
2.6.1 Ácidos Nucleicos.....	31
2.6.2 ADN	31
2.6.3 ARN	32
2.7. Electroforesis.	32
2.8 Espectrofotometría	33

2.9.1 Reacción de la cadena de la polimerasa "PCR"	33
2.9.2 Desnaturalización	35
2.9.3 Hibridación	35
2.9.4 Extensión.....	35
2.9.5 Extensión final	36
2.9.6. Ciclos de PCR.....	36
2.9.8 ITS.....	37
Capítulo III	38
Desarrollo y Metodología	38
3.1 Desarrollo y metodología	39
3.2 Preparación de medios semisólidos de cultivo	40
3.3 Resiembra en medio PDA y Sabouraud de <i>Fusarium spp.</i>	40
3.4 Monitoreo de crecimiento	41
3.5 Crecimiento de hongo de <i>Fusarium spp.</i>	41
3.6 Recolección de micelio para extracción de ADN.....	42
3.7 Preparación del amortiguador CTAB	43
3.8 Extracción de ADN por el método CTAB.....	43
3.9 Técnica de PCR: Reacción de la cadena de la Polimerasa.....	47
3.10 Electroforesis para PCR.....	48
3. 12 Secuenciación por Sanger	49
3.13 Hipótesis.....	49
Capítulo IV	50
Resultados.....	50

4.1 Monitoreo y crecimiento de hongo de plantas	51
4.2 PDA y Sabouraud	51
4.2 Curva de crecimiento de PDA y Sabouraud	52
4.3 Identificación morfológica.....	54
4.4 Morfología microscópica de los aislados de Fp.....	61
4.5 Extracción de ADN	63
4.5 Cuantificación de ADN	64
4.5.1 Concentración y pureza ADN.....	64
4.6 Reacción de la cadena de la polimerasa "PCR"	66
4.7 Espectrofotometría de PCR.	68
Concentración y Pureza de ADN en PCR.	68
4.7.2 Secuenciación de los amplicones ITS.	70
4.8 Vista microscópica final de <i>Fusarium spp</i>	75
Capítulo V	77
Conclusiones.....	77
5.1 Conclusiones del proyecto, recomendaciones, experiencia profesional y personal adquirida	78
5.2 Conclusiones relativas a los objetivos específicos	78
5.4 Aportaciones originales.....	78
5.5 Limitaciones del modelo planteado.....	79
5.6 Recomendaciones	79
Capítulo VI.....	80
Competencias desarrolladas.....	80

6.1 Competencias desarrolladas y/o aplicadas	81
CAPÍTULO VII	82
Fuentes de información	82
7.1 Fuentes de Información.....	83
CAPÍTULO VIII	88
Anexos	88

CAPITULO I.

Generalidades del proyecto

1.1 Datos generales de la empresa.

El CIIDIR Unidad Sinaloa, conocido como un centro de investigación dependiente de Instituto Politécnico Nacional (IPN). La investigación se desarrolló dentro del Laboratorio de Fitomejoramiento Molecular (FitoMol).

Se encuentra ubicado dentro del estado de Sinaloa con dirección, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes número 250, Colonia San Juachin, cp 81101, Guasave.

1.2 Antecedentes de la empresa

La institución se dedicada desde el 24 de junio de 1997, en parte a la investigación y la docencia en el campo en desarrollo sustentable, medio ambiente, recursos naturales, desarrollo tecnológico, biotecnológico y acuacultura.

Una de las principales razones por las cuales se fundó este centro de investigación, fue por la necesidad de enseñar e incrementar tecnologías de aprendizajes básicos y aplicados en la región.

La mayor parte de los investigadores del CIIDIR llevan desarrollando proyectos a base de líneas de investigación con el programa de la institución comprometiéndose por parte a la docencia y a enseñar, siendo titulares o apoyando en las diferentes asignaturas que brinda el programa de Maestrías en Ciencias y Doctorados.

Últimamente se han ejecutado más de diferentes proyectos de investigación estratégicos con recursos por parte del gobierno del estado de Sinaloa (Fundación Produce Sinaloa, Ayuntamientos, FOMIX y CECyT), así como con dependencias del gobierno federal por parte de becas (CONABIO, SEMARNAT, SAGARPA y CONACYT) e internacional (EcoHealth Alliance y USDA-APHIS), por más de 103 millones de pesos. Los proyectos establecidos han tenido gran impacto en demandas en sectores sociales y privados.

1.3 Objetivo general

Identificar especies de *Fusarium spp* proveniente de maíces con síntomas de Fusariosis por técnicas clásicas de microbiología y secuenciación de genes “housekeeping”.

1.3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar cepas putativas de *Fusarium spp* aisladas en maíces con Fusariosis usando las características macroscópicas como color, velocidad de crecimiento *in vitro* en medio PDA y Sabouraud.
- Caracterizar cepas putativas de *Fusarium* aisladas en maíces con Fusariosis usando las características microscópicas de los cultivos *in vitro* en medio de cultivo.
- Identificar por secuenciación molecular especies putativas de *Fusarium* aisladas en maíces con Fusariosis usando amplicones pertenecientes a “housekeeping” (ITS).

1.4 Problemas de investigación a resolver

Es un gran reto el poder entender el comportamiento de *Fusarium* por parte del maíz, ya que suele ser un problema día a día.

En este trabajo se tiene como propósito identificar la problemática que genera *Fusarium* presente en plagas de maíces a nivel agrícola, conocer el crecimiento de *Fusarium spp*, en diferentes medios de cultivo y poder identificar su comportamiento.

Conocer las técnicas de extracciones, como electroforesis y la reacción en cadena de polimerasa “PCR” que permitan amplificar el ADN, que logre detectar y lograr amplificaciones de secuencias del patógeno en plantas para diagnosticar con precisión las enfermedades.

1.5 Preguntas de investigación

¿Cuáles son las metodologías y técnicas aplicadas para la identificación molecular en hongos filamentosos?

¿Cuál es el periodo óptimo para extraer en ADN en hongos filamentosos?

¿Cuáles son las causas de enfermedades en cultivos agrícolas causados por hongo de tipo *Fusarium spp*?

¿Cuáles son las técnicas moleculares empleadas para la identificación de hongos filamentosos?

¿Cuáles genes son los recomendables implementados para la identificación de ADN?

1.6 Justificación de la investigación

Fusarium spp es un género de hongos que causa diversas enfermedades en una amplia gama de plantas hospedantes, hongo es conocido por su capacidad de ser transportando a través de suelo, aire y algunos residuos de las plantas, lo que lo convierte en un patógeno versátil que puede afectar a diferentes partes de la planta, desde las raíces hasta las flores (Mokobi, 2021).

El maíz es un cereal importante a nivel mundial, no solo suele ser una fuente nutritiva de alimento, tiene un papel importante en alimentación que representa en consumo a la sociedad y economía en diferentes aspectos (Conabio, 2024).

Su versatilidad y valor nutricional lo convierten en un alimento fundamental para muchas comunidades, la producción es esencial en la agricultura mexicana, ya que representa un porcentaje alto en producción de granos y oleaginosas (Conabio, 2024).

La producción de maíz agrícola va desde un 60 % de cultivos, desde 10 toneladas en promedios del 91 % en siembra, que aproximadamente aportan alrededor del 75 % en producción nacional de maíz (Rural, 2020).

Algunas enfermedades causadas por patógenos, como las del género *Fusarium spp*, pueden ser un factor limitante en el rendimiento de algunas plantas, incluyendo al maíz.

Estos patógenos pueden causar pudriciones en raíces y tallos, afectando de manera negativa la salud de la planta y su productividad, controlar estas enfermedades es crucial para garantizar cosechas exitosas para mantener la producción de maíz en niveles óptimos. Brown & Proctor (2013).

El proyecto de investigación realizado busca implementar una técnica que permita identificar morfológicamente así como el uso de técnicas de biología molecular para la obtención de los ácidos nucleicos que analicen y ayuden a describir y/o caracterizar a este hongo que hasta la actualidad genera una problemática en diferentes ámbitos, el *Fusarium* es un hongo que día a día, casi en los últimos 100 años, ha atraído una atención considerable de los científicos a medida que se hizo evidente el alcance de la diversidad de diferentes especies y el impacto en la agricultura y la salud humana.

1.7 Macro-localización, micro localización y ubicación

1.7.1 Macro-localización

El municipio de Guasave se localiza en la parte suroeste en el estado de Sinaloa con colindancias al noreste de Ahome y Los Mochis, al sur con Guamúchil y Culiacán, como se muestra en la Figura 1.

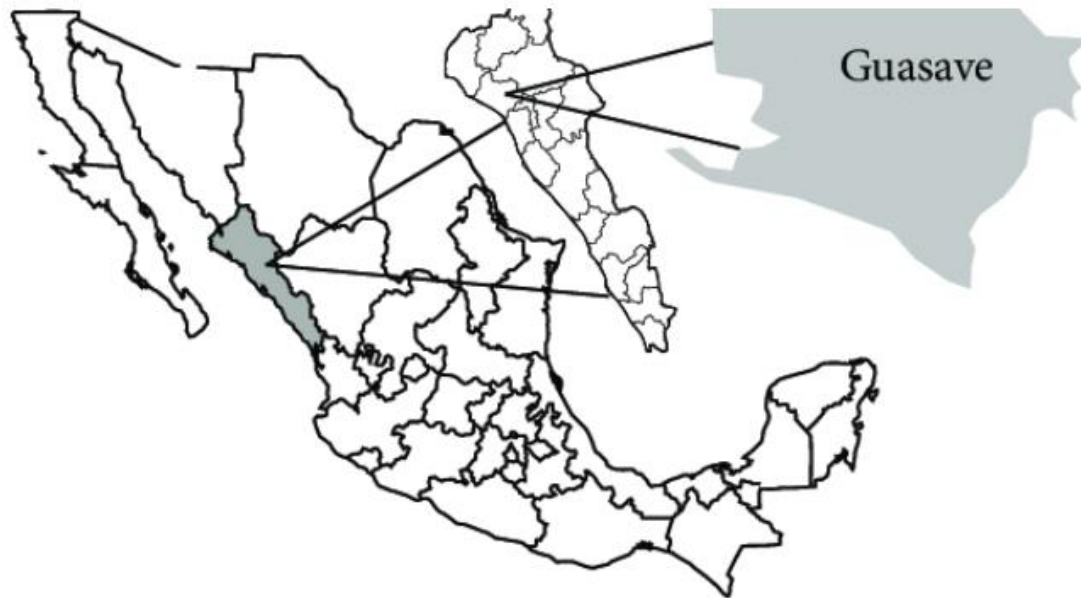


Figura 1. Territorial del área de estudio del municipio de Guasave, Sinaloa.

Fuente:(Inegi, 2018).

1.7.2 Micro-localización

Dentro del municipio de Guasave Sinaloa se encuentran las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR), como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Micro-localización del estado de Guasave. Fuente:(Inegi 2023).

1.7.3 Ubicación

El CIIDIR se encuentra ubicado en El Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes #250, Col. San Joachin en Guasave , Sinaloa , México. Figura 3.



Figura 3. Ubicación satelital. Fuente: (Google Maps, 2023).

Capítulo II.

Marco Teórico

2.1 Antecedentes

2.1.1 Identificación molecular de *Fusarium spp*, aislados en maíz en Sinaloa, México.

Velarde y Valdez (2020) Identificaron especies de *Fusarium* en el maíz, que suele ser una enfermedad causante de pudriciones de tallos, raíces y granos de mazorcas hasta el fin de la planta, realizaron técnicas moleculares para diversas especies del género *Fusarium* en el estado de Sinaloa, recolectando parte del tejido del tallo , parte de la raíz de diversas plantas tiernas y maduras, se lograron identificar mediante análisis de secuenciación enzimática especies de *F. verticilloides*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. nygamai*, *F. cf. bullatum* y *F. andiyazi*, en donde *F. verticilloides* fue una de las especies más predominantes , así también se reportó por primera vez la presencia en México de *Fusarium cf. Bullatum* causando daños en el maíz.

2.1.2 Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México.

Ochoa Cerna (2012) Identificaron especies durante los últimos ocho años, lograron asociar con la nueva sintomatología en los cultivares de ajo en las regiones de Aguascalientes y Zacatecas, con cultivos de pudrición. Dando relevancia a esta enfermedad de *Fusarium*, se identificó morfológica y molecularmente algunas de las especies de *Fusarium* en plantas con síntomas de enfermedad. Cuatro especies a saber: *Fusarium verticilloides*, *F. acuminatum*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

.

2.1.4 Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia

(Henao et al, 2018) Se eligieron y depuraron 8 muestras dentro del género de interés para cumplir la obtención de ADN y amplificación de la región TEF1 alfa. Los resultados de la PCR se secuenciaron y cotejaron con la base de datos de NCBI y Fusarium ID. Los géneros obtenidos corresponden a *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani*, siendo la primera especie la mas examinada frecuente. Se empleo el coeficiente de similitud del vecino próximo realizado con MEGA 6, demostrando variabilidad entre las muestras.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Maíz

Uno de los primeros cereales alimentarios conocidos, el maíz es un miembro de la familia *Poaceae* o *Gramineae*, es una planta domesticada con un alto nivel de productividad, incluso en términos de su valor nutricional, el hombre debe asumir toda la responsabilidad de su mantenimiento (Gobierno de México, 2023).



Figura 4. Maíz (Gobierno de México, 2018).

2.2.2 Taxonomía del Maíz

Clasificación Taxonómica	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Lilopsida</i>
Orden:	<i>Poales</i>
Familia:	<i>Poaceae</i>
Género:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>Zea mays</i>

Cuadro 4. Clasificación taxonómica del maíz. Fuente: (Acosta, R.2009).

2.2.3 Características generales

El maíz (*Zea mays L.*) es una planta anual con sistema radicular fibroso que pertenece las gramíneas, es una especie que suele reproducirse por polinización cruzada y la flor femenina (mazorca) y la masculina (espiga) encontrada en distintos lados de la planta (FAO, 1993).

2.3 Hongo

El reino Fungí (hongos) está formado por un grupo de organismos conocidos como hongos, cuya delimitación ha sido difícil de definir por su variabilidad en formas y características heterogéneas que no siempre muestran conexiones filogenéticas claras (Salmones & Mata, 2019).

2.3.1 Hongo Filamentosos

Son organismos multicelulares con un soma vegetativo, suelen ser encontrados en suelos en vegetación, son conocidos como mohos y su estructura en hifas, su aplicación biotecnológica es de gran impacto al ser beneficiarios encargados de nuevas alternativas (Suárez Contreras, y., & Peñaranda-Figueroa, 2022).

Los hongos están constituidos a base de hifas que son una serie de ramas tubulares, formadas por múltiples células. Así como colonia, talo y micelio que son un conjunto de desarrollo de un hongo (conjunto de hifas), se pueden identificar macroscópicamente como una masa cremosa, algodonosa, vellosa, etc.

Contienen un micelio vegetativo que destina a dar sostén, protección y nutrición al hongo, también de un micelio reproductivo que da hifas fértiles, nacen del micelio biológica y morfológicamente, sus esporas son células plurinulceadas en pigmentaciones (azul. Rojo. Negro) son las encargadas de dar color (San Emeterio & Andrés, 2002).

2.4 *Fusarium spp*

Grupo de hongos encontrados dispersamente en el suelo tal como plantas, con una capacidad de crecimiento a 37 °C, algunas especies de *Fusarium* suelen ser causantes de enfermedades y producir toxinas que afectan a los seres vivos, existen diferentes tipos de especies (Tapia & Amaro, 2014).

La taxonomía a lo largo del tiempo ha tenido modificaciones diversas desde las primeras escrituras en el año 1803. Su taxonomía clásica suele ser continua desde su composición molecular su taxonomía clásica continúa vigente que a lo largo de los estudios realizados cada vez se requieren puntos de observación diferentes (Tapia & Amaro,2014).

2.4.1 Taxonomía de *Fusarium spp.*

Clasificación Taxonómica	
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Nectriaceae</i>
Genero	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>Fusarium spp</i>
	<i>Fusarium equiseti</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Fusarium proliferatum</i>
	<i>Fusarium reticulatum</i>
	<i>Fusarium solani</i>
	<i>Fusarium subglutinans</i>

Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Fusarium spp.* Fuente: (EPPO, 2020).

2.4.2 Problemas causantes de *Fusarium spp.*

Suele infectar ampliamente a diversos cultivos, que suelen poner en debilidad a las plantas infectadas estresadas o lesionadas, en uno solo cultivo pueden existir diferentes especies y claro hasta los síntomas pueden ser de manera diferentes, suele estar en los suelos y residuos de plantas infectadas, es decir el micelio, el hongo de forma en crecimiento y causa marchites, desde el tallo y piel, causando lesiones en hojas que inclusive si esta no es detectada puede llegar a causar daños en consumo, algunas especies son capaces de causar simultáneamente síndromes de enfermedades múltiples o superpuestas dependiendo del huésped y el medio ambiente (Brown & Proctor, 2013).

2.5 Medio de Cultivo

Son técnicas dentro del laboratorio con el principal objetivo de lograr hacer el crecimiento de bacterias, microorganismos, virus y levaduras, son soluciones líquidas a semi-sólidas con nutrientes y condiciones en pH y temperatura para lograr su crecimiento, en una consistencia en agar gelificante que permite la adaptación el cual suele ser fácil de desechar (*Medios de cultivo*, 2023).

Hay diferentes medios de cultivo que permiten el crecimiento del hongo, algunos de ellos son el agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud, agar Clavel (CLA), agar de *Spezieller Nährstoff-farmer* (SNA) y agar avena. Los medios PDA y Sabouraud permiten observar diferencias en el diámetro, morfología y pigmentación (*Medios de cultivo*, 2023).

2.5.1 Cultivo *in vitro*

Es conocido como una técnica en la cual es tomada una parte de la muestra en este caso un vegetal, ya sea una parte de su tejido o células, es cultivado y es llevado a una incubación a un ambiente ampliamente controlado (Mroginski & Roca, 1991).

2.6 Identificación Molecular

Es basada en una estructura de los ácidos nucleicos, es un procedimiento de herramientas moleculares para la identificación de secuencias de ADN (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

2.6.1 Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos y se componen de la unión de una pentosa, una base nitrogenada y un ácido fosfórico. Los Ácidos Nucleicos son las biomoléculas que almacenan la información genética. Estas son biopolímeros con un peso molecular elevado, compuestos por unidades estructurales o monómeros llamados Nucleótidos. Químicamente hablando, los ácidos nucleicos son macromoléculas constituidas por polímeros lineales de nucleótidos, unidos por enlaces éster de fosfato, sin una periodicidad aparente. Coll, V. B. (2007).

2.6.2 ADN

El Ácido desoxirribonucleico, es una molécula suele encontrarse en células dentro de nuestro cuerpo con información genética en cada ser vivo, útil para su identificación en reconocimientos a organismos, dentro del ADN encontramos bases nitrogenadas de dos anillos (purinas) y de un anillo (pirimidinas); las purinas son la adenina (A), la guanina (G) y timina (T) y la citosina (C) (Pardo, 2004).

Un grupo fosfato, formado por dos azúcares y en conjunto a una de las bases nitrogenadas forman la unidad estructural de los ácidos nucleicos denominada nucleótido.

En ADN es un hecho histórico desde 1953, descubierto por su contenido de doble hélice de ácido desoxirribonucleico (ADN) por James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin y otros autores que dieron un gran paso a la biológica, que gracias a esto se permitió conocer más a fondo de las estructuras y funciones en biología molecular (Queredo, 2022).

2.6.3 ARN

El ARN se clasifica en ARN bicatenario (presente en reovirus) y ARN monocatenario, como el ARN de transferencia, mensajero, ribosómico y nucleolar. Las funciones de los ARN se resumen en tres: transmitir la información genética desde el ADN a los ribosomas, que corresponde a la síntesis de ARNm mediante transcripción; convertir la secuencia de ribonucleótidos de ARNm en una secuencia, proceso denominado traducción; y finalmente, almacenar la información genética, por ejemplo, en algunos virus. Coll, V. B. (2007).

2.7. Electroforesis.

Metodología implementada en técnicas dentro del laboratorio para poder dividir fragmentos de ADN y ARN dependiendo de su tamaño, con ayuda de una tinción que ayude a determinar el contenido de ácidos nucleicos de una posible muestra, se pueden extraer por parte del gel diferentes tamaños de fragmentos de ADN (Fierro, 2014).

La electroforesis en matrices de agarosa es el método convencional para disgregar y depurar segmentos de ADN cuando no requerimos una elevada capacidad de resolución. En contraste, la electroforesis en matrices de poliacrilamida, a pesar de presentar una limitación superior en relación con el tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), demuestra una capacidad de resolución sustancialmente superior, permitiendo la segregación de moléculas que difieren en solo un par de bases. Los matrices de poliacrilamida se llevan a cabo de manera vertical y tienen la desventaja de ser más complejos en su preparación y manejo, los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante (Fierro, 2014).

2.8 Espectrofotometría

Es encargada de medir la concentración e impurezas de muestras de ADN en contenido de la suficiencia de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. En este modo las concentraciones de la muestra de ADN se calculan tomando en cuenta el valor de absorbancia concentrada a una longitud de onda de 260nm. Mientras que la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 son implementadas para medir las impurezas del ADN, respectivamente (Programa de control de calidad de muestras de adn y arn, 2020).

2.9.1 Reacción de la cadena de la polimerasa “PCR”

Es unas herramientas tecnológicas más punteras disponibles para estudiar ácidos nucleicos, distinguida por producir resultados confiables de forma rápida y sencilla de análisis utilizando una técnica altamente sensible, eficiente y reproducible.

En una secuencia de ADN específica se puede amplificar millones de veces mediante el proceso enzimático *in vitro* conocido como reacción en cadena de la polimerasa mientras se copia con una alta precisión la secuencia objetivo. La reacción utiliza la capacidad de la enzima ADN polimerasa para sintetizar ADN en las células de forma natural para lograrlo (Tamay et al, 2013).

Es una de las técnicas utilizadas en el uso de moléculas de ADN , que permiten conocer miles de copias del material genético, que fue desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80 en donde realizo una aplicación en el año 1985 (Queredo, 2022).

Gracias a los hallazgos de Kary Mullis (1944-2019) la biología molecular logró demostrar la importancia de los ácidos nucleicos, que permiten ser los encargados de tener código genético del organismo controlando las síntesis de proteínas de la célula.

Los sucesos resaltados y reconocidos demostraron para Har Gabind (1992-2011) y Kjell Klepe (1934-1988), reconstruir nuevas estrategias, como el exponer a la molécula de ADN a niveles de temperaturas altos, las cadenas se rompen y se separan en 2 hebras, al añadir los bloques de nucleótidos (ADN), y gracias a la ayuda de la ADN polimerasa, cada cadena se empezaba a caracterizar para poder ser incorporada a una nueva y lograr sintetizar nuevo ADN desde la molécula original verdadera (Queredo, 2022).

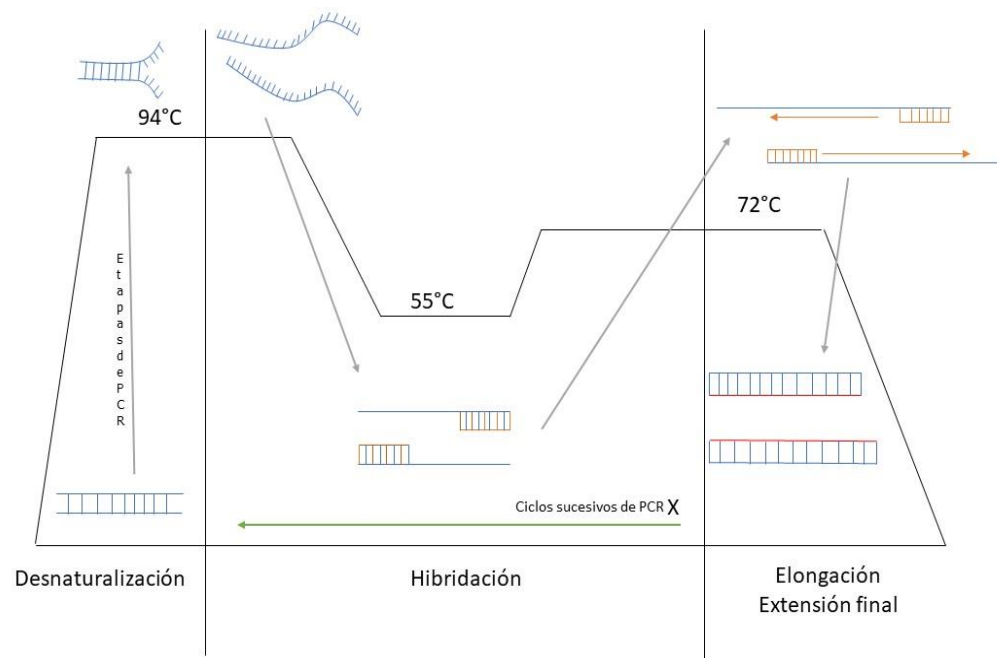


Figura 6. Ejemplo de gráfico del proceso en el termociclador para la técnica de PCR. (Fuente propia, 2023.)

Ahora se hace una breve descripción de lo que ocurre en la figura 6, en el proceso de la PCR (reacción de la cadena de la polimerasa).

2.9.2 Desnaturalización

Dentro de este apartado la PCR se implementa en los ciclos de desnaturalización, que ayudaron a separar la doble hélice para que los puentes de hidrogeno se rompan, las temperaturas y los tiempos son importantes dependiendo principalmente de las características del ADN y la polimerasa.

Es importante que el ADN quedara completamente desnaturalizado, a temperaturas de 94°C en 30 minutos a 1 minuto (Tamay de Dios et al, 2013).

2.9.3 Hibridación

En esta parte, los primers se formal en el extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con una secuencia completa. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la utilizada temperatura utilizada de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la adecuada en optimización ; que generalmente oscila entre 50-60 °C. El diseño de los primers debe ser el correcto , asi como la temperatura debe estar adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios et al, 2013).

2.9.4 Extensión

En esta parte, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y en donde empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura de optmización para la reacción es de 72 °C, esta es la temperatura de la enzima funcional. Al final del ciclo, se habrán se forman amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Tamay de Dios et al, 2013).

2.9.5 Extensión final

Dentro de esta etapa final se conoce la elongación, amplificación y polimerización, consistente de una nueva cadena de ADN.

Al finalizar, terminando los ciclos se realiza una última extensión de aproximando en tiempo de 5 minutos a 72°C que permitieron que la cadena de polimerasa sintetice finalmente los fragmentos que quedaron incompletos (Cornejo Romero et al, 2014).

2.9.6. Ciclos de PCR

En esta parte es necesario realizar ciclos sucesivos de desnaturalización-alineamiento, al bajar las temperaturas, los oligos se alinean y proceder posteriormente a la extensión, alcanzando una temperatura de los 55-60 °C.

La disminución de temperatura permite a los iniciadores la unión del ADN flanqueado al fragmento de amplificación, la temperatura y tiempo van a depender de 3 factores (Tamay de Dios et al, 2013).

2.9.7 Gen constitutivo -Housekeeping-

Los genes de expresión constitutiva o llamados housekeeping son genes utilizados para el mantenimiento del funcionamiento celulares sustanciales para la existencia de una célula, independientemente de su función específica por parte del tejido u organismo. En las células existe una expresión en condiciones particulares de la etapa de desarrollo, estado del ciclo celular o señal externa, sin embargo, al ser genes de función constitutiva su expresión no cambiará. Desde un punto de vista fundamental, la caracterización completa del conjunto mínimo de genes necesarios para sustentar la vida es de especial interés (Eisenberg & Levanon,2013).

2.9.8 ITS

Regiones espaciadoras internas transcritas (ITS) de ADN ribosomal en hongos (ADNr), son principales secuencias alternativas de gran valor e importancia para poder reconocer y distinguir diferentes especies de hongos mediante técnica molecular de PCR.

Suelen ser usados en múltiples conjuntos de cebadores para poder preparar una adaptabilidad de variedades del hongo de estudios, creando secuencias de hongos a más de un conjunto (Martin & Rygiewicz, 2005).

Capítulo III

Desarrollo y Metodología

3.1 Desarrollo y metodología

Para la obtención de resultados se siguió una estrategia experimental metodológica, la cual se observa en la Figura 6 basada.

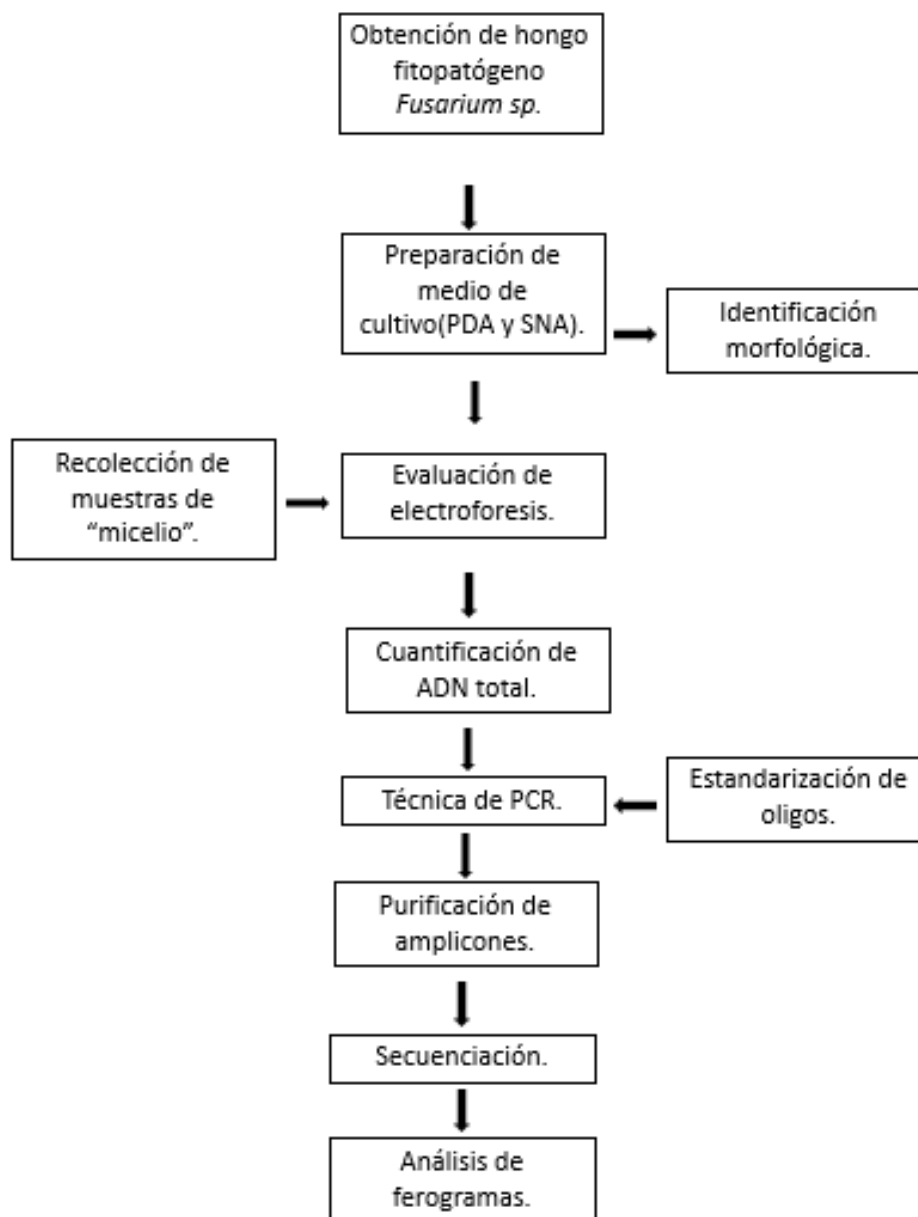


Figura 7. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.

3.2 Preparación de medios semisólidos de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo PDA (BB Bioxon) para 20 cajas Petri (10 cm de diámetro) desechables, se pesaron 19.5 g del reactivo para ser diluido en 500 ml de agua destilada, en cuanto al medio Sabouraud (MCD LAB) se pesaron 32.5 g del reactivo igual para ser diluidos en 500 ml de agua destilada, posteriormente se procedió a esterilizar los medios por autoclaveado a 121°C durante 15 minutos.

3.3 Resiembra en medio PDA y Sabouraud de *Fusarium spp.*

El hongo *Fusarium sp* una vez aislado en medios CLA, se resembraron en las cajas Petri con el medio semisólido, por cada cepa, nombrando "Fp" de *Fusarium sp*, se realizó una resiembra por triplicado en cada medio.

Cuadro 1. Cepas en orden por cada medio enlistadas proporcionadas dentro del laboratorio de Fitomejoramiento molecular.

PDA	Sabouraud
Fp1	Fp1
Fp2	Fp2
Fp3	Fp3
Fp4	Fp4
Fp5	Fp5
Fp6	Fp6
Fp7	Fp7
Fp8	Fp8
Fp11	Fp11

3.4 Monitoreo de crecimiento

Dentro de la campana de bioseguridad (ECOSHEL), se tomó parte del micelio tierno por cada una de las cepas para ser trasladada a una nueva, colocándola en el centro para que a partir de ahí el hongo creciera desde el centro en un tiempo de siete días.



Figura 8. a) Toma de punta para hacer el “plug” en la cepa y b) Recolección de muestra del hongo.

3.5 Crecimiento de hongo de *Fusarium spp*

Las cepas fueron monitoreadas cada 24 horas para reconocer el crecimiento radial del hongo, desde su crecimiento, en medios de PDA y Sabouraud. En el total de las cepas se promedió para graficar el crecimiento en cada una de ellas.

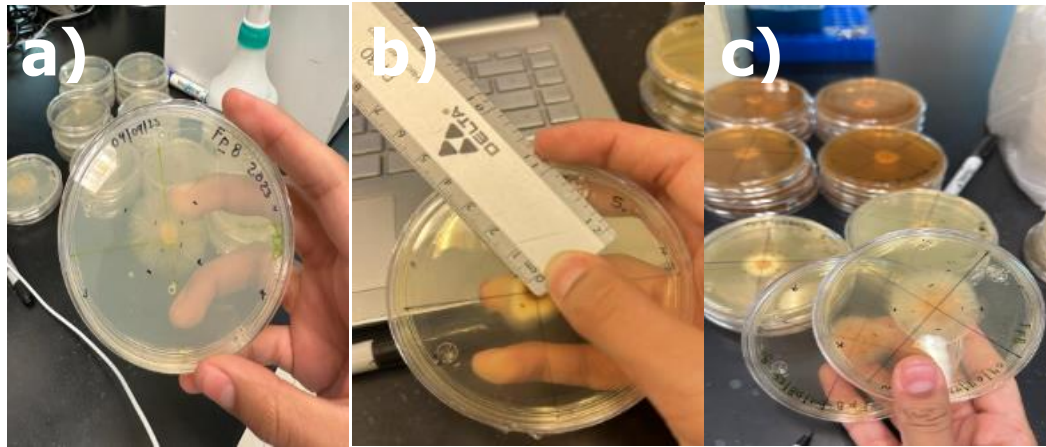


Figura 9. a) Marcador de los cuatro cuadrantes para crecimiento, b) Medición del crecimiento de hongo, c) Vista del crecimiento avanzado de hongos en PDA y Sabouraud.

3.6 Recolección de micelio para extracción de ADN

En tubos Eppendorf se tomaron pequeñas muestras del micelio de las cepas Fp1, Fp2, Fp3, Fp4, Fp5, Fp6, Fp7, Fp8 y Fp11. El micelio se tomó cuidadosamente para traer lo menos posible el agar de la placa, se rotularon cada uno de los tubos para cada muestra tomada, al finalizar se almacenaron dentro del ultracongelado de la marca ARTIKO a -86°C .

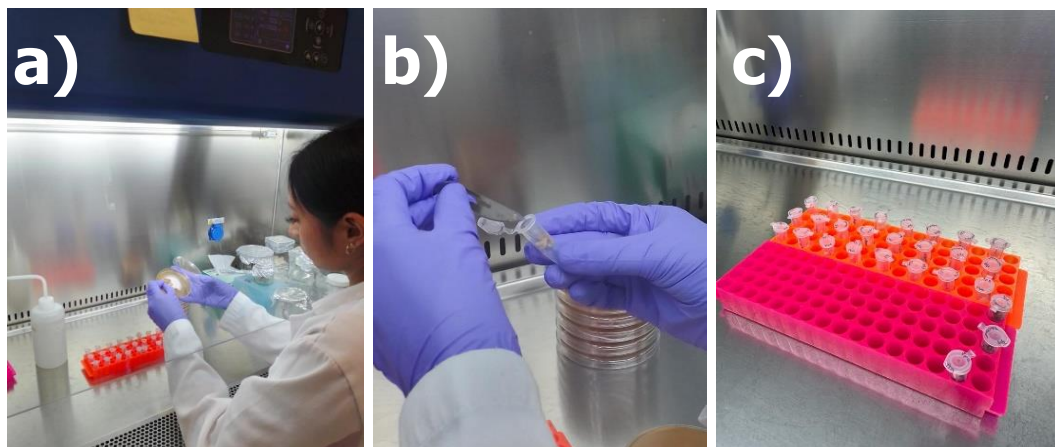


Figura 10. a) Raspamiento de micelio, b) Toma de muestra del hongo colocada en el tubo Eppendorf y c) Alineamiento de las muestras finales.

3.7 Preparación del amortiguador CTAB

Se prepararon soluciones requeridas para la extracción, tomando las cantidades específicas para 100 ml de solución. El EDTA a 20 mM se pesaron 0.742 gr, de Tris HCl en 100 mM se tomaron 1.57 gr, de NaCl en 1.4 mM se pesaron 8.18 g.

Para poder preparar el CTAB al 3% se diluyeron en 90 ml de agua destilada esterilizada, añadiendo poco a poco para lograr una dilución adecuada, empezando por el EDTA, Tris HCl y NaCl, al estar todo disuelto se procedió a ajustar el pH a un valor de 8 con ayuda de un potenciómetro, ácido (KOH) y una base (NaOH), una vez hecho se llevó a esterilizar a 121° C en 15 minutos.

De los 90 ml del CTAB, se tomaron 40 ml, para añadir el CTAB al 3% (1.2 gr), dentro de una estufa de secado a una temperatura de 60°C se dio paso a la preparación en calor del amortiguador añadiendo el CTAB. Una vez listo esto, se agregó el B-mercaptoetanol al 0.2 % (36 µL) en 18 ml realizándolo dentro de la campana de bioseguridad.

3.8 Extracción de ADN por el método CTAB

Siguiendo la metodología implementada dentro de nuestro proceso de extracción de los autores Zhang et al., (1998.) En cada uno de los tubos eppendorf frecuentados de 1.5 ml, se tomaron las muestras de micelio de *Fusarium* sembrado en Sabouraud y PDA de Fp.

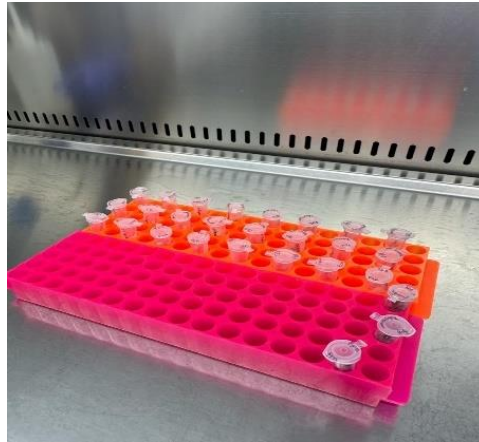


Figura 11. Micelio recogido en tubos eppendorf.

Se añadieron 200 μ L de amortiguador CTAB a cada una de las muestras, posteriormente se llevó a macerar con ayuda de unos balines en cada tubo ,durante 1 minuto a 13000 rpm, pasando esto se agregaron 600 μ L del amortiguador preparado con CTAB, B-mercaptohetanol.

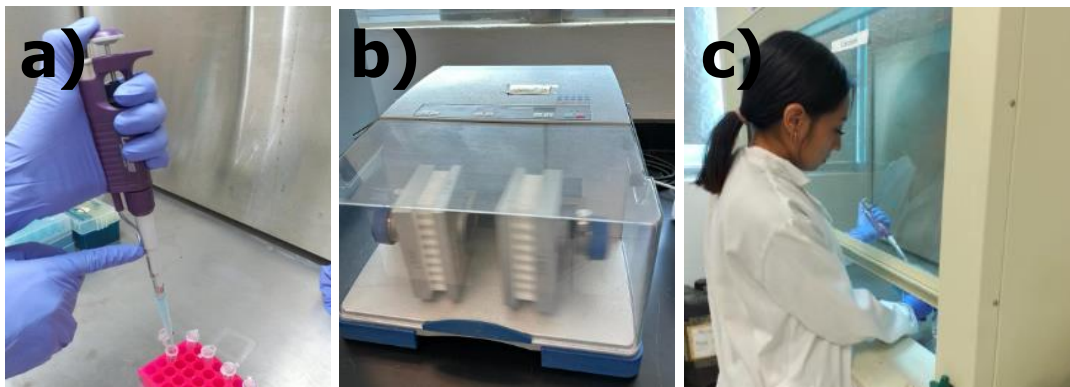


Figura 12. a) Adición de los 200 μ L del amortiguador CTAB ,b) Maceración de las muestras y c) Agregación de μ L del amortiguador.

Se realizó la incubación por 30 minutos a 60 $^{\circ}$ C agitando por inmersión, con ayuda de un vortex- Geniw 2, se agregaron 600 μ L de cloroformo Isoamílico 24:1 a cada muestra.

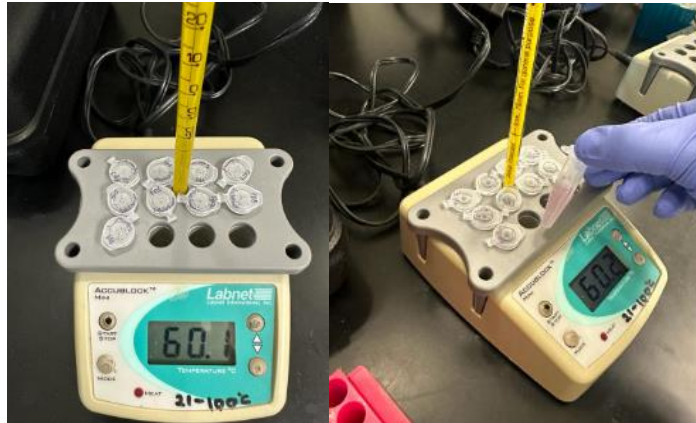


Figura 13. Incubación de las muestras de micelio para ADN.

Se agito vigorosamente por inmersión, se pasó a centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm. Una vez hecho esto se procedió a transferir la parte superior acuosa en un tubo eppendorf etiquetado, se adicionaron 20 μ L de RNAsa (1 μ g/ μ l), llevando a incubar por 30 minutos a 37°C.

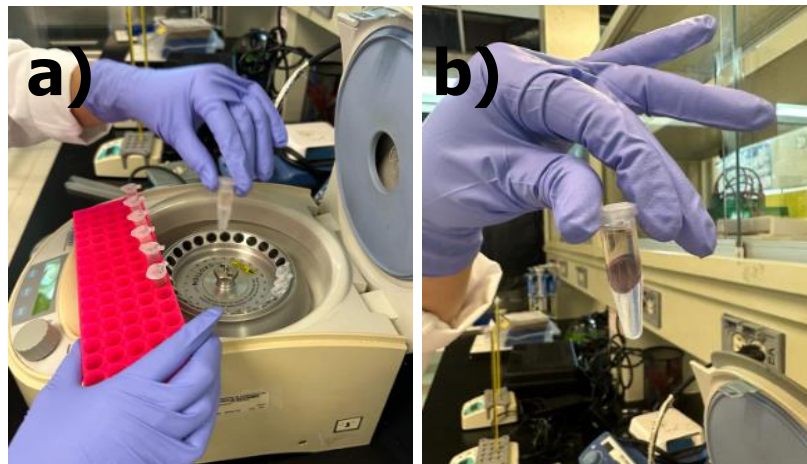


Figura 14. a) Centrifugación de las muestras y b) Parte acuosa superior de la muestra libre de impurezas inferior.

Posteriormente de la incubación se adicionaron 600 μ L de isopropanol al 100% a -20°C para precipitar el ADN, centrifugando por 8 minutos a 13,000 rpm.

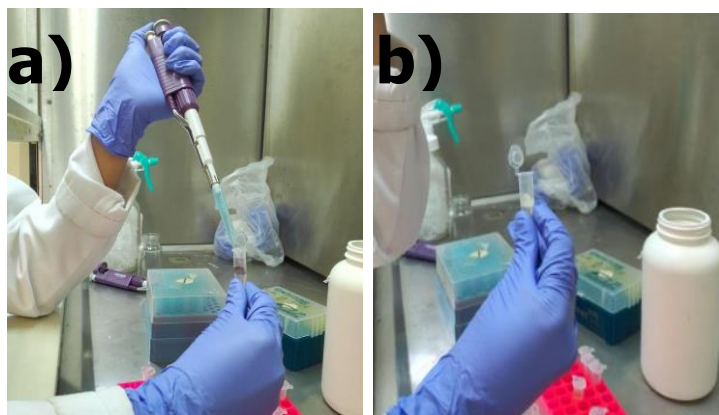


Figura 15. a) Parte acuosa siendo transferida a un nuevo tubo eppendorf y b) uso del isopropanol a las muestras.

Se decantó el sobrante ,dejando secar la pastilla con contenido de ADN, finalmente, se resuspendio en 30 μ L de agua bidestilada estéril. Se continuo a preparar el gel de agarosa al 1% en 30 ml con 3g, así mismo se procedió a preparar el colorante Blue/Orange.

Se midió la cantidad y pureza de las muestras de ADN a OD 260 nm, y OD 260 nm/280 nm respectivamente, usando el NanoDrop ND1000 UVeVis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

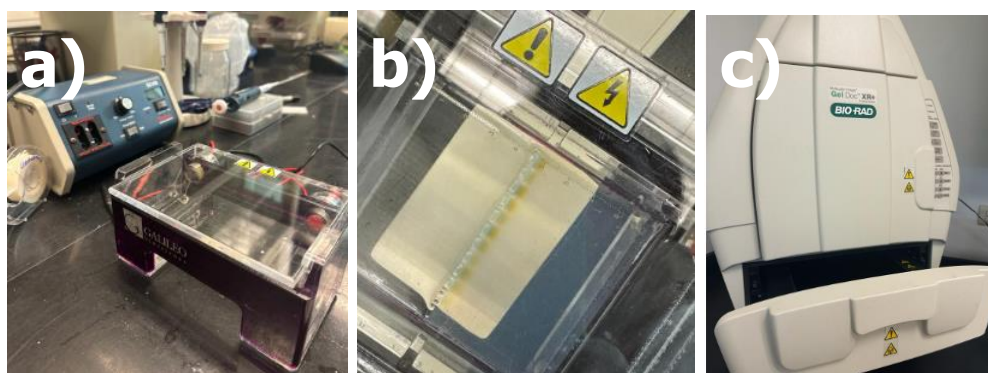


Figura 16. a) Técnica de electroforesis en gel de agarosa, b) Corrimiento del ADN con corrimiento Blue /Orange y c) Detección de posicionamiento del gel pasado por electroforesis en equipo de Molecular Imagen.

Se confirmó la calidad de las muestras de ADN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y visualizar mediante tinción con bromuro de etidio (2 mg/μL) bajo un transiluminador UV.

3.9 Técnica de PCR: Reacción de la cadena de la Polimerasa

Para llevar a cabo la técnica de PCR se tomaron las muestras por la extracción de ADN. Se prepararon las concentraciones adecuadas para llevar a cabo el PCR.

Cuadro2. Cantidades empleadas para PCR.

Condiciones para los gradientes de PCR	Cantidad (μL)
10x Tag buffer	5
dNTP 'S (10 uM)	1
Fw ITS-1 (10 uM)	1
Rv ITS-4 (10 uM)	1
MgCl ₂ (25 uM)	2.5
ADN (2 ng/uL)	5
Tag (5 U/L)	0.5
H ₂ O	34

Las muestras completaron un total de 50 μL , por cada una se distribuyó en un tubo nuevo rotulado en cantidades de 10 μL .

Una vez pasado esto las muestras fueron pasadas a un Termociclador (Marca: Bio Rad/ Modelo: C1000 Thermal Cycler).



Figura 17. Uso del termociclador a temperaturas de 95°C, 55°C y 72°C.

3.10 Electroforesis para PCR

Una vez pasadas en el termociclador durante 2 horas, las muestras fueron juntadas en un tubo eppendorf. Para las muestras del ADN pasando por PCR se les realizo una lectura en la técnica de PCR en las cuales se utilizaron las cantidades adecuadas para cargar el gel.

Cuadro 3. μL empleados para la reacción de la cadena de la polimerasa

	Cantidad
Agarosa	1.5 %
Marcador de peso 1Kb	1 μL
Amortiguador Blue/Orange	1 μL
PCR	1 μL

3. 12 Secuenciación por Sanger

La secuenciación de los amplicones fue realizado por el servicio externo en el laboratorio de genética para la biodiversidad (LanGeBio).

3.13 Hipótesis

El uso de técnicas moleculares permite la identificación precisa de géneros de *Fusarium spp.* en el maíz, proporcionando conocimiento de los diferentes géneros que afectan el cultivo

Capítulo IV

Resultados

4.1 Monitoreo y crecimiento de hongo de plantas

El crecimiento de hongos en las cepas de "*Fusarium*" en plantas de la resiembra en medio PDA y Sabouraud fue de aproximadamente 5-7 días, en donde se estuvieron evaluando y describiendo los comportamientos, cada hongo creció de manera diferente, unas más rápido que otras.

4.2 PDA y Sabouraud

Se tomaron los resultados del crecimiento del hongo en las cepas Fp, dando a un promedio realizando por triplicado establecido, con promedios de velocidad radial "Vr" como se muestra en los cuadros.

Cuadro 4. Monitoreo del crecimiento micelar de las cepas Fp en medio PDA.

Crecimiento (Días)	Cepas "Vr"								
	Fp1	Fp2	Fp3	Fp4	Fp5	Fp6	Fp7	Fp8	Fp11
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.13	0.26	0.27	0.08	0.08	0.03	0.00	0.44	0.05
2	0.71	0.67	0.70	0.41	0.45	0.61	0.62	1.34	0.39
3	1.27	1.09	1.14	0.74	0.77	1.02	1.20	2.14	0.78
4	1.78	1.54	1.52	1.26	1.09	1.57	1.78	3.09	1.23
7	3.04	2.87	2.65	2.39	2.58	2.52	2.90	4.00	2.53

Cuadro 5. Monitoreo del crecimiento micelar de las cepas Fp en medio PDA. Sabouraud.

Crecimiento (Días)	Cepas "Vr"								
	Fp1	Fp2	Fp3	Fp4	Fp5	Fp6	Fp7	Fp8	Fp11
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.18	0.22	0.21	0.21	0.33	0.29	0.34	0.48	0.27
2	0.62	0.65	0.59	0.68	0.73	0.80	0.90	1.29	0.79
3	1.32	1.12	1.16	1.07	1.19	1.35	1.28	1.69	1.27
4	1.77	1.53	1.69	1.07	1.60	1.81	1.28	1.94	1.58
7	2.78	2.37	2.53	1.39	3.38	2.91	1.95	2.22	2.37

4.2 Curva de crecimiento de PDA y Sabouraud

Una vez obtenidos los datos del triplicado por cada muestra el promedio se graficó y se obtuvieron variabilidades en el crecimiento de hongos como se muestra en la Figura 18 y 19.

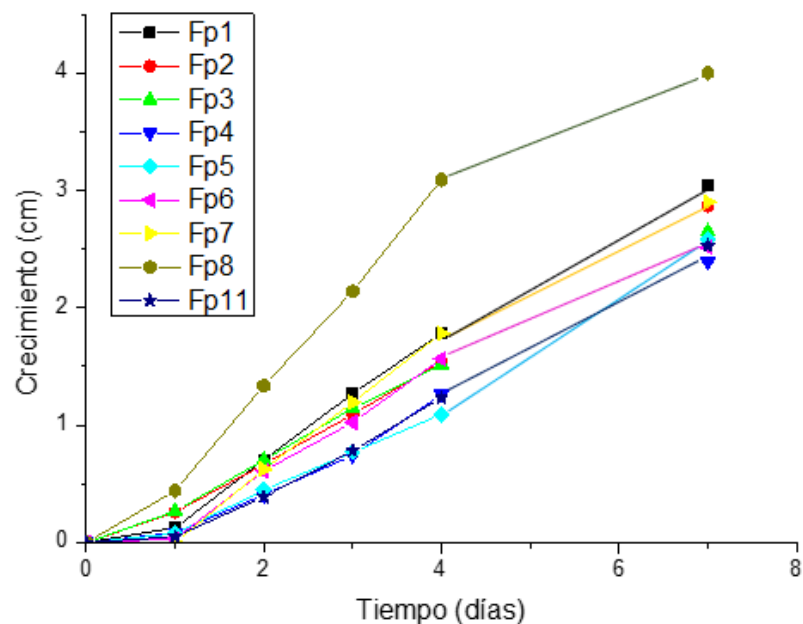


Figura 18. Dinámica de crecimiento de las cepas Fp del hongo *Fusarium sp*, en medio PDA, donde se muestra en tiempo (días) aproximadamente y el crecimiento (cm).

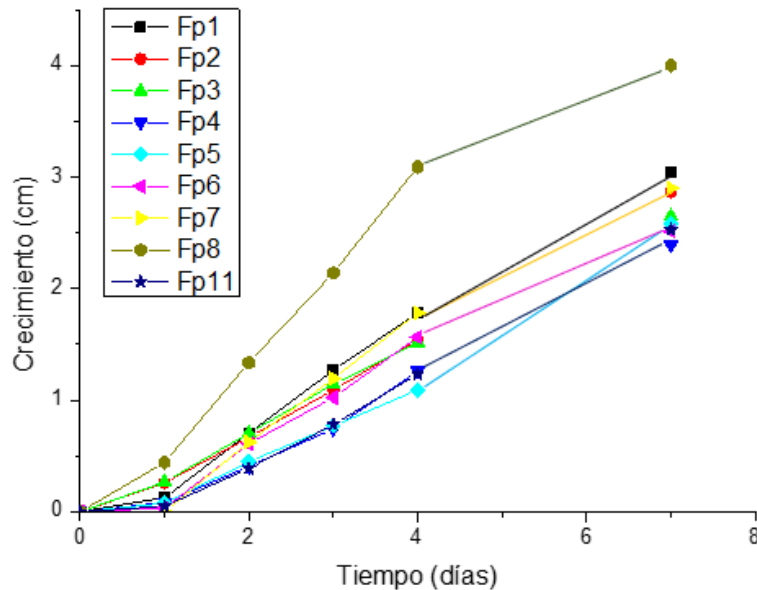


Figura 19. Dinámica de crecimiento de las cepas Fp del hongo *Fusarium sp* en medio Sabourau, donde se muestra en tiempo (días) aproximadamente y el crecimiento (cm).

Como se observa en las Figura 18 y 19, las cepas presentaron una mayor velocidad de crecimiento, en las cuales mostraron mayor presencia radial, en el caso de la cepa Fp8 en PDA (Figura 18) hubo un crecimiento variado en Fp1 con 3.04 y Fp8 con 4.00, haciendo una comparación con en medio Sabouraud (Figura 19) su mayor crecimiento fue en la cepa Fp5 con 3.38 y Fp6 con 2.91, haciendo una comparación por cada cepa de *Fusarium sp*, determinamos que cada uno de los hongos tiene comportamientos diferentes, debido a las condiciones de acoplamiento dependientes del área de trabajo, que permita el crecimiento del micelio blanco, ya que cada hongo cuenta con características diferentes algunos tienen mejor comportamiento que otros.

4.3 Identificación morfológica

A continuación, se muestran las características de la morfología en crecimiento de las cepas para su identificación, dando descripción a su crecimiento en 5 días las cuales fueron seleccionadas las de mejor calidad para tomarlas con base a evaluaciones en morfología y coloraciones.

Cuadro 6. Características macroscópicas de las cepas Fp crecidas en medio PDA a los días de crecimiento.

Cepa	Identificación morfológica	Tonalidad
Fp1	Micelio presente esponjoso, con tonalidad rosa/morado.	Rosa/morado
Fp2	Micelio presente esponjoso disperso, con tonalidad Rojo/rosa.	Rojo/rosa
Fp3	Micelio presente, con coloración cremosa en amarillo/café rojizo.	Amarillo/café rojizo
Fp4	Micelio presente esponjoso en coloraciones bajas cremosas	Crema/opaco
Fp5	Micelio presente esponjoso en coloraciones naranja/rojizo	Naranja /rojizo
Fp6	Micelio presente disperso esponjoso en coloraciones Rojo/tinto	Rojo/tinto

Fp7	Micelio presente disperso esponjoso en coloraciones rosa/ amarillento	Rosa/ amarillento
Fp8	Micelio presente disperso en coloraciones rosa/café.	Rosa/ café
Fp11	Micelio presente disperso esponjoso en coloraciones morado intenso/tinto	Morado intenso/tinto

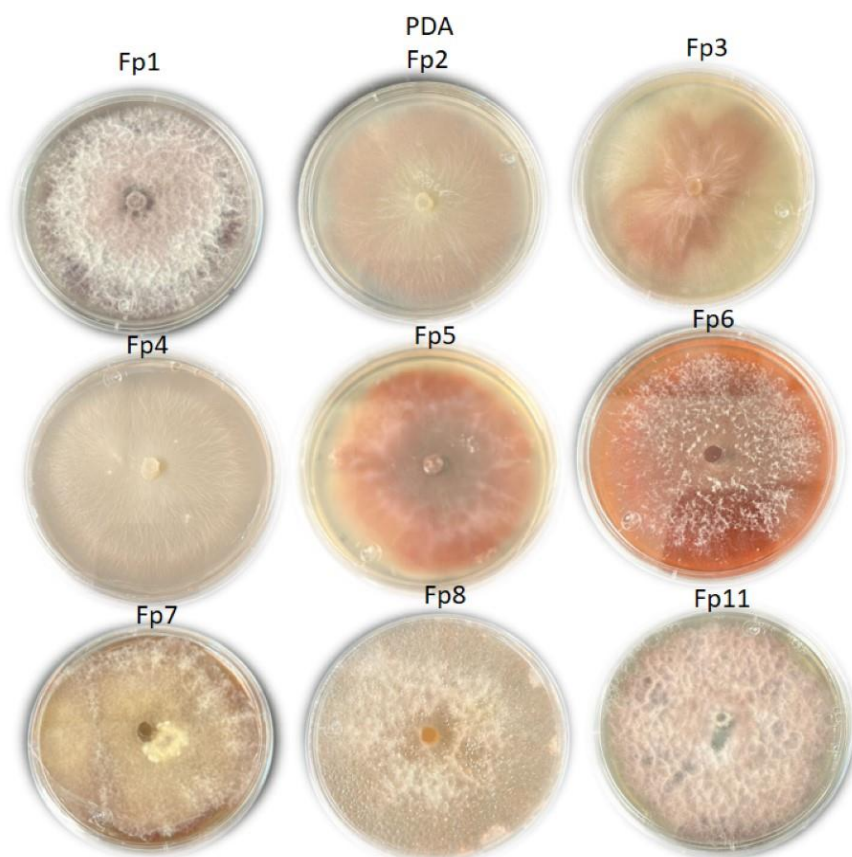


Figura 20. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de cepas Fp en medio PDA de la parte superior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.

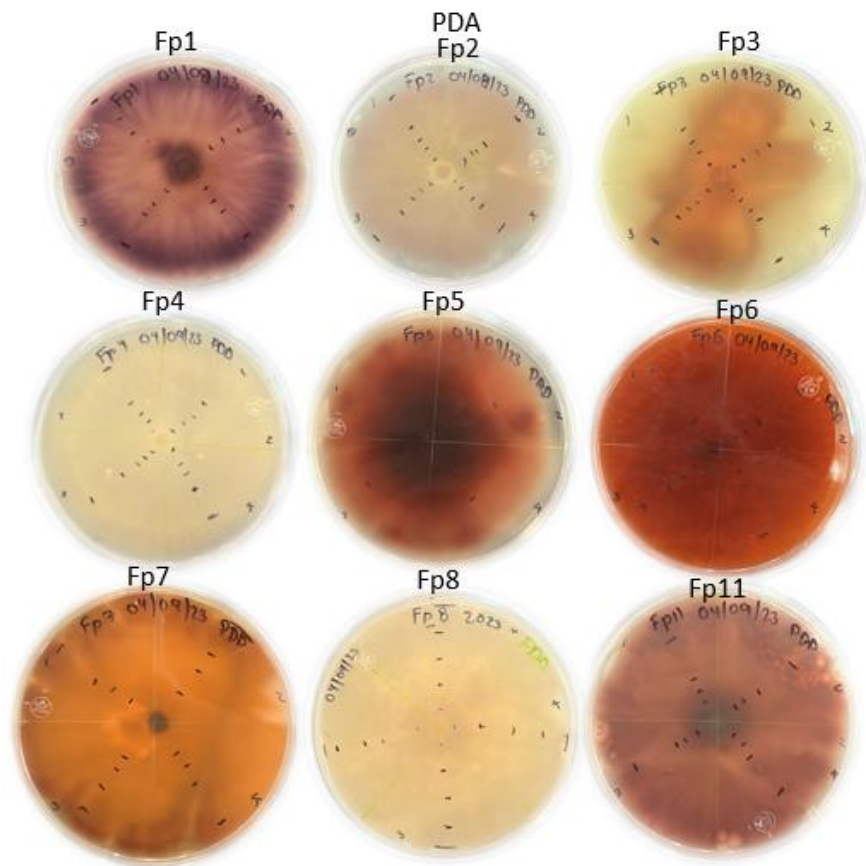


Figura 21. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de las cepas Fp en medio PDA de la parte inferior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.

Cuadro7. Características macroscópicas de las cepas Fp crecidas en medio Sabouraud a los 5 días de crecimiento.

Cepa	Identificación morfológica	Tonalidades
Fp1	Micelio presente aéreo, con vellosidad rosa/blanquecino.	Rosa/blanquecino
Fp2	Micelio presente aéreo , con vellosidad en color amarillento/blanquecino.	Amarillento/blanquecino
Fp3	Micelio presente aéreo, en coloración amarillento/blanquecino.	Amarillento/blanquecino
Fp4	Micelio presente aéreo en coloraciones amarillo/blanquecino.	Amarillo/blanquecino
Fp5	Micelio presente aéreo en coloraciones café/rojizo.	Café/rojizo
Fp6	Micelio presente disperso, en coloraciones rosa/amarillento.	Rosa/amarillento
Fp7	Micelio presente disperso, en coloraciones en rosa/medio.	rosa/medio.

Fp8	Micelio presente disperso, en coloraciones naranja/blanquecino.	Naranja/blanquecino
Fp11	Micelio presente disperso, con coloraciones blanco.	Blanco

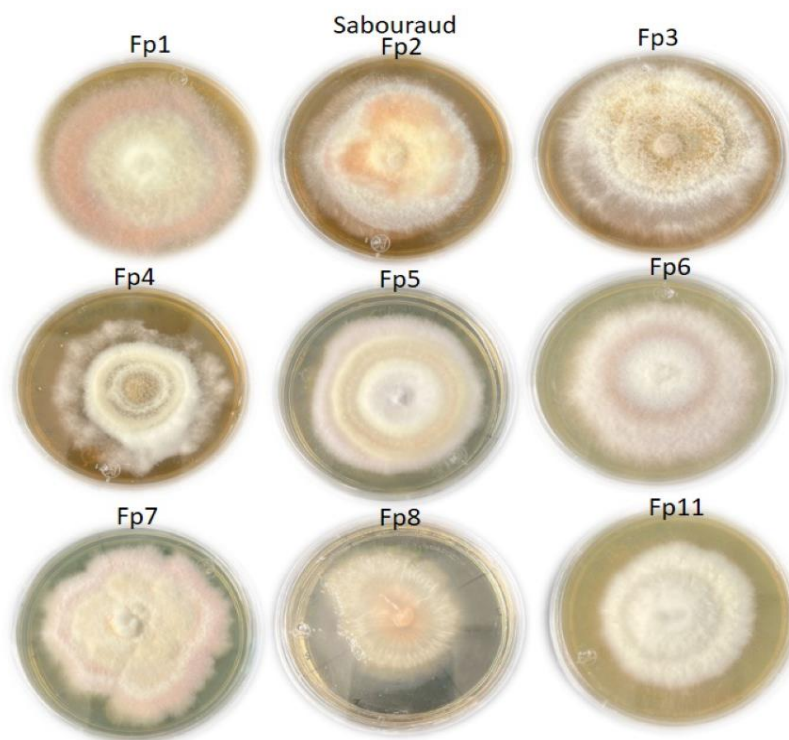


Figura 22. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de Fp crecidas en medio en Sabouraud de la parte superior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.

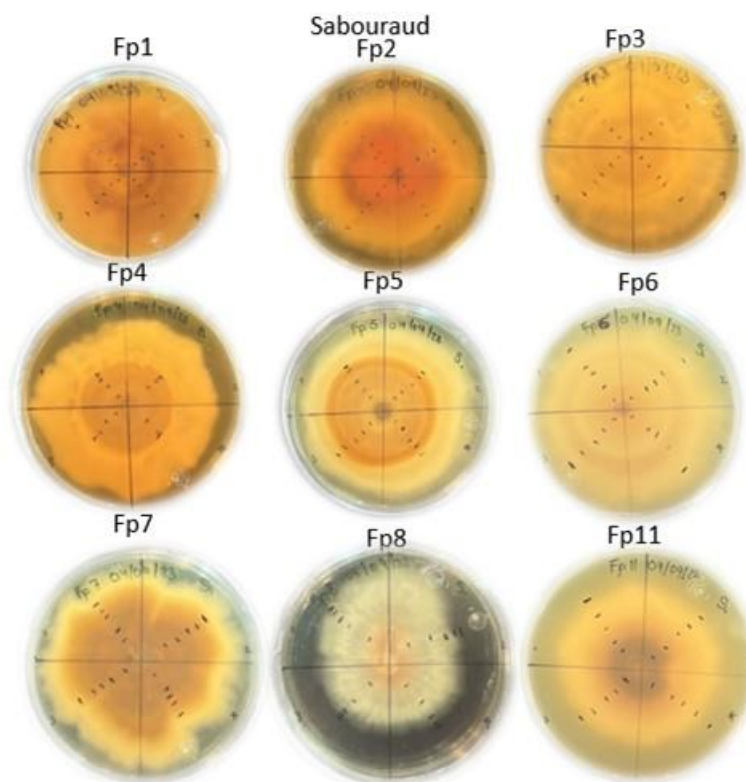


Figura 23. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de las cepas Fp en medio Sabouraud de la parte inferior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.

Cada cepa evaluada presento propiedades físicas con pigmentación y tonalidades a base de colores diferentes.

De acuerdo con la Dirección General de Sanidad Vegetal del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria a nivel del laboratorio, *Fusarium spp*, representa características microscópicas , frecuente tinciones de colores en negro o marrón con base de tallos , con manchas rojizas en las vellosidades del micelio o interno, con micelios rosas y blancos según (Buechel, 2018).

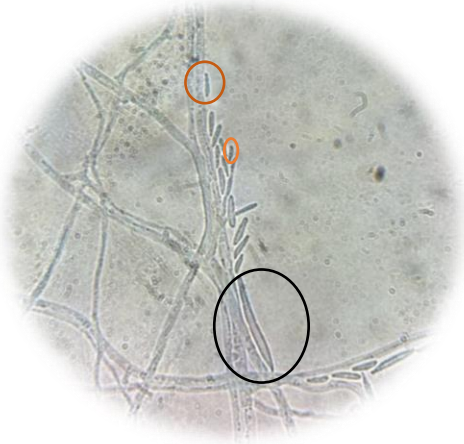
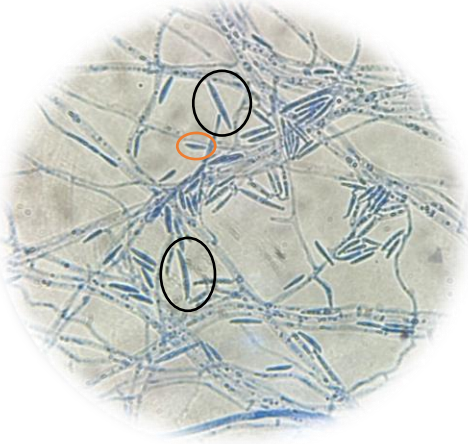
El medio PDA suele ser utilizado y recomendado para poder realizar monitoreo de crecimiento a comparación del medio Sabouraud , el medio PDA está enfocado al crecimiento de hongos de todos tipos de tal parecido que el medio Sabouraud es utilizado para un diagnóstico de enfermedades patógenas específico a enfermedades

en humanos, es altamente nutritivo y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos.

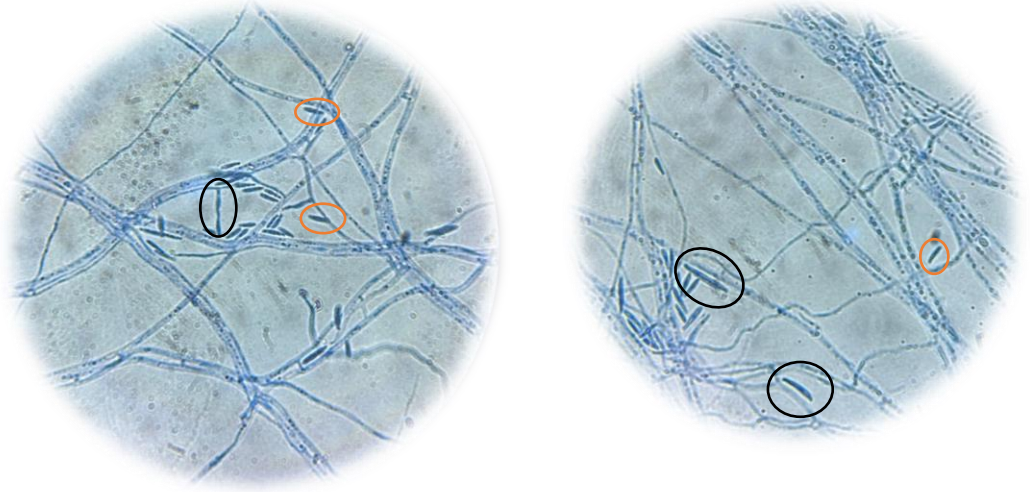
4.4 Morfología microscópica de los aislados de Fp

Se opto por tres cepas que fueron analizadas mediante observación microscópica. Estas cepas desempeñarán un papel crucial en nuestro proceso de PCR, siendo específicamente tres de *Fusarium* las responsables de influir en nuestros resultados finales.

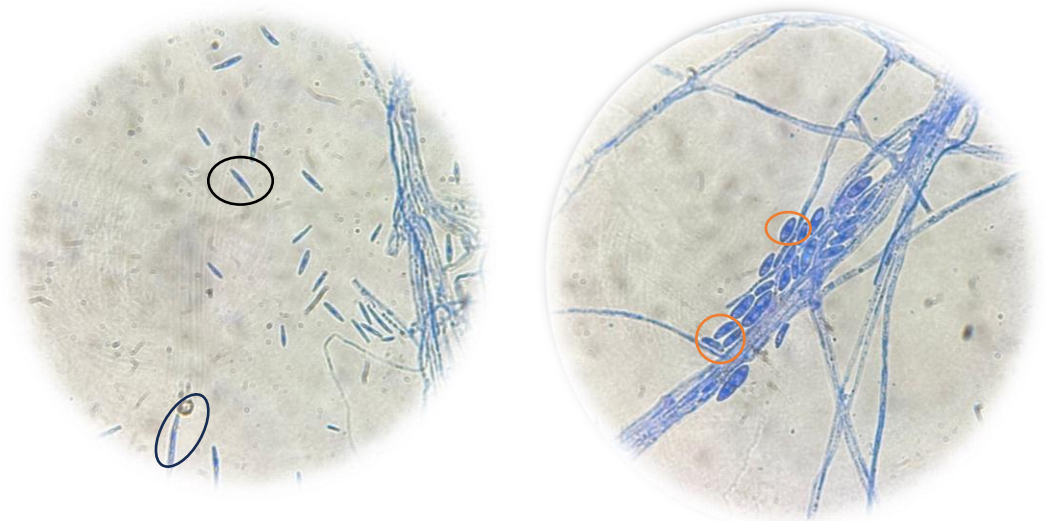
Figura 8. Vista microscópica de macroconidios y microconidios

Nombre de Cepa	Presencia de Macroconidios y Microconidios	
Fp2		

Fp3



Fp4



●: muestra una presencia de macroconidios y **●**: presencia de microconidios con formaciones, cada uno de ellos se encuentran en dispersiones formando de unas a otras.

4.5 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se tomó parte del micelio realizando un triplicado para su colecta en medio semi-sólido de PDA.

Las muestras de extracciones de ADN fueron las siguientes en Fp1, Fp2, Fp3, Fp4, Fp5, Fp6, Fp7, Fp8, y Fp11.

Cada muestra fue colocada dependiendo la cantidad de microlitros, incluyendo marcadores de peso y colorantes en los pozos del gel de agarosa.

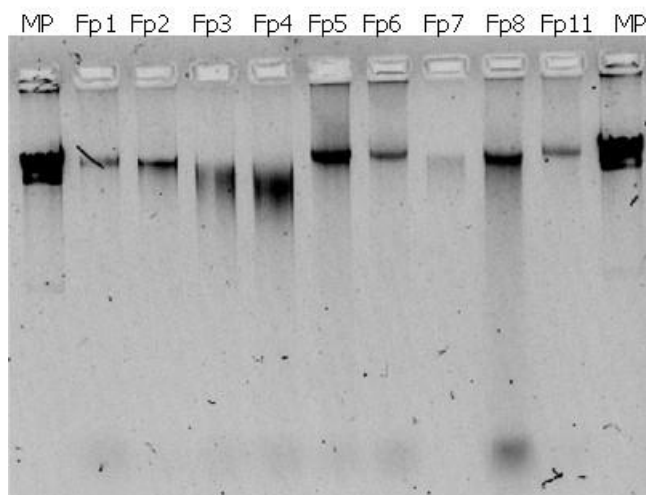


Figura 24. Electroforesis al 0.5 % de extracciones en el primer pozo “MP” y último con marcador de peso Lamda Mix , en los pozos 2 a 9 se cargaron las muestras de ADN provenientes de las cepas Fp con amortiguador Orange 1x.

Por medio de la electroforesis en gel de agarosa se visualizó la calidad en la integridad del ADN aislado, se observó en banda estrecha cerca del pozo en el que se colocó la mezcla, la detección del ADN puede ser empleadas ara las técnicas utilizadas en biología molecular.

Para el proceso metodológico se siguió las técnicas basadas de Zhang et al(1998.), a comparación de la metodología de Velarde & Valdez (2020), donde ellos emplearon diferente técnica utilizando extracción de ADN de cultivos monospóricos siendo una técnica más simple, a disposición de nuestras 10 muestras de ADN a la de la metodología .

Nuestras muestras presentan ADN , solo que suele variar en su visibilidad ya que alguno se presenta un poco fragmentado y/o con pocas impurezas.

Finalmente, las muestras pasan al proceso de electroforesis para dar lectura a los fragmentos de ADN.

Los marcadores de peso molecular permitieron medir el tamaño de la secuencia de ADN por medio de proceso de electroforesis.

4.5 Cuantificación de ADN

4.5.1 Concentración y pureza ADN

Se tomaron las muestras Fp las cuales pasaron por un control de calidad de ADN, por medio de espectrofotometría.

Se tomaron 2 μ L de los ADN aislados de las muestras Fp1 ,Fp2, Fp3, Fp4, Fp5, Fp6, Fp7, Fp8 y Fp11.

En las siguientes figuras se muestran los análisis de las relaciones 260/280 y 260/230 nm.

Con base a los resultados obtenidos mediante espectrofotometría se las muestras con mayor calidad de ADN en pureza como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Valores indicados de pureza en muestra de ADN

Relación		
Cepa	260/280	260/230
Fp1	2.12	1.48
Fp2	1.89	0.91
Fp3	2.15	1.71
Fp4	2.09	1.33
Fp5	2.27	-31.42
Fp6	2.43	25.44
Fp7	1.67	0.47
Fp8	2.06	1.32
Fp11	1.90	0.91

Relación en valores de ADN con Pureza optima y Pureza aceptable.

En el cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos de las purzas de ADN en las relaciones de 260/230 y 260/280.

La relación de absorbancia a 260/280 nm fue utilizada para evaluar la pureza del ADN, en donde la mayoría de las muestras presenta pureza optima como se lugar ver en este caso es el bajo contenido de proteínas, mientras que la relación 260/230 también es crucial para detectar posibles contaminantes como los solventes orgánicos (fenoles) provenientes de las soluciones de extracción. Estas medidas son estándares comunes en la espectrofotometría para caracterizar la calidad de las muestras de ácidos nucleicos, tomando a base la referencia de Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014).

4.6 Reacción de la cadena de la polimerasa "PCR"

Recordando la morfología microscópica de los aislados de Fp de la figura, se seleccionaron tres para la amplificación de ITS usando un termociclador de la marca C1000 Thermal Cycler , con un tiempo aproximado de 2 horas y 30 minutos.

En esta sección se dan a conocer los resultados por parte del ADN en su extracción dando paso a la cadena de la polimerasa en sus lecturas.

Se tomaron 3 muestras para la PCR las cuales fueron las cepas de Fp2, Fp3 y Fp4, las cuales se seleccionaron y se llevó a cabo su proceso de lectura por medio de electroforesis para la reacción de la cadena de la polimerasa.

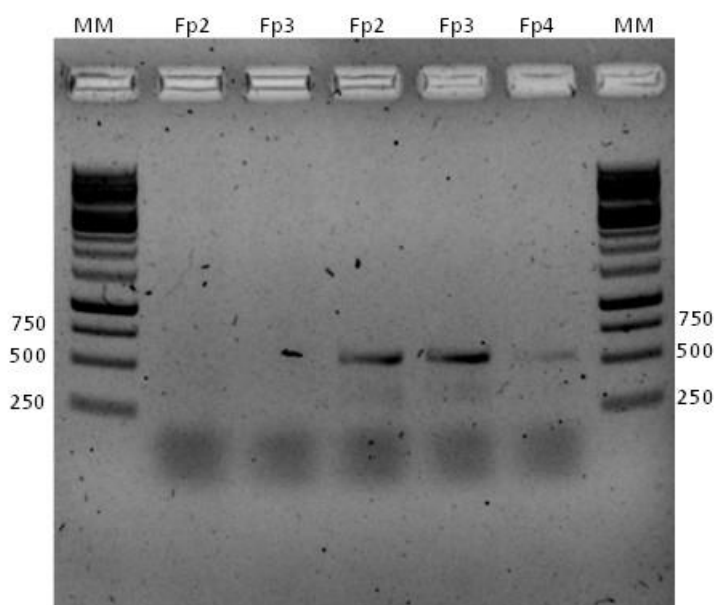


Figura 25. Primera corrida de electroforesis 1.5 % de agarosa en PCR pozo 1 y 7 "MM" marcador molecular , pozo 4 a 6 muestra de ADN en PCR, PB = número de pares de bases.

Como se logra ver en la Figura 25 , se efectuó una corrida de electroforesis de las muestras pasadas por la reacción de la cadena de la polimerasa PCR, conocido como " taq polimerasa" empleando en muestras nombradas Fp2, Fp3 y Fp4.

La cepa Fp2 y Fp3 en primera muestra, no se logra presenciar ADN fragmentado debido a las cantidades empleadas contando los tiempos y la cantidad de nuestra muestra, esto suele debido a que nuestro ADN contiene proteínas o alguna sustancia que inhibe la reacción de PCR. En cambio, en el pozo 3, 4 y 5 se logra ver presencia de ADN presencia de ADN fragmentado e con ayuda de los oligos ITS 1-4.

Basándonos en la guía de la reacción de la polimerasa Asuar, L. E. (2007).

Cuando se trabaje con un oligo diseñado en el laboratorio (o que no está reportado) se recomienda empezar a ejecutar la técnica en condiciones estándares, y dependiendo del resultado. Es sugerible probar primero con pocas muestras (por ejemplo, de 5 a 10 ADNs diferentes), y una vez que esté montado el PCR, entonces se hace el experimento con las muestras que se necesiten, así para evitar un desperdicio de estas evitando el gasto de oligos.

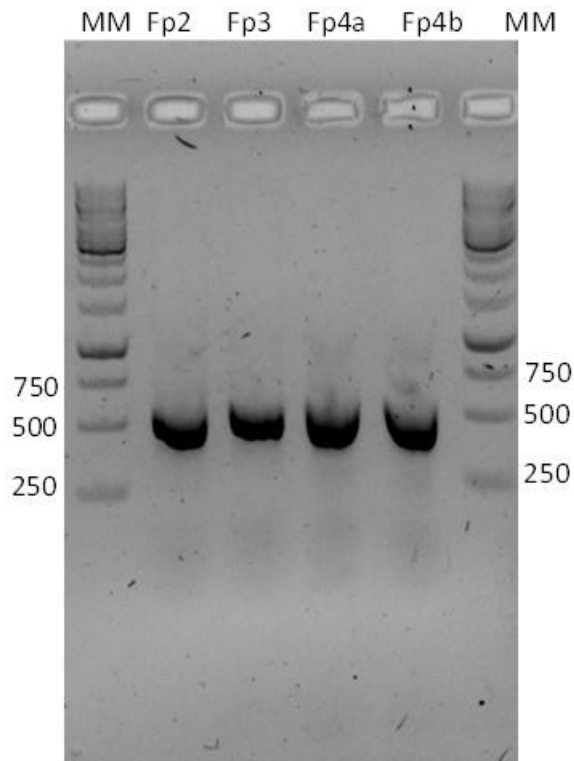


Figura 26. Segunda corrida de electroforesis 1.5 %PCR pozo 1 y 6 "MP" marcador de peso , pozo 2 a 4 muestra de ADN en PCR, mostrando PB = número de pares de bases.

Realizando una segunda corrida en la figura 26, se logra ver mayor presencia de ADN en Fp2,Fp3 y Fp4 , dentro del Fp4 se realizó una doble corrida comparándola con la anterior para ver la reproducibilidad de la técnica de PCR.

Los marcadores de peso molecular permitieron visualizar que se estaba amplificando la región de interés ya que el amplicon de IT1 al ITS4 tiene un tamaño aproximado de 5XX pb.

Nuestra técnica de PCR sirvió para amplificar la región de interés de los candidatos causantes de Fusariosis en maíz.

4.7 Espectrofotometría de PCR.

Concentración y Pureza de ADN en PCR.

Una vez más pasando por el proceso de espectrofotometría de nuestras muestras en PCR, en el equipo se colocaron 2 µL por cada muestra en cada uno de los orificios , con ayuda del NANODROP 8000 , se realizaron las lecturas correspondientes de las 3 cepas elegidas.

Cuadro 10. Concentraciones de purezas de ADN por medio de espectrofotometría.

Cepa	Relación	
	260/280	260/230
Fp2	1.59	0.90
Fp3	1.56	0.85
Fp4	1.53	0.7

Relación en valores de ADN con Pureza optima.

Una muestra libre de impurezas garantiza una calidad adecuada para la muestra, que permita clarificar e identificar cada una de ellas.

En el cuadro 10, se analiza una relación de las cepas de *Fusarium sp*, por el proceso de espectrofotometría en donde las 3 muestras elegidas fueron aceptadas por su calidad en pureza, es decir las cepas son estables y están libres de contaminantes.

4.7.2 Secuenciación de los amplicones ITS.

Una vez realizada la purificación de nuestras muestras , se llevó a cabo la secuenciación conocida con el nombre Sanger, una vez obtenido el resultado se utilizaron dos programas el primero conocido como "Crustal Omega", que permite conocer las bases donde se mide el alineamiento de empalme dentro de las hebras de ADN.

La secuenciación de los amplicones se realizó en ambos sentidos de las hebras para cubrir toda la región ITS1 a ITS4, con ayuda del programa "Crustal Omega" que genera un producto de 5xx pb. Para obtener una sola secuencia fusionada una de las cadenas fue invertida para generar el mismo sentido de la cadena posteriormente fueron alineados para ver la zona de empalme y generar así una solo cadena de mayor amplitud como se muestra en el cuadro 11 de abajo.

Cuadro 11. Zona de empalme de la secuencia.

Iniciador	Secuencia 3'-----5'
	5'-----3'
Fp2 Fusion 1515bp	GATATTTTATCCTACTCACCATTAGTATTATGTAGTGTGGGTA CTACCCCGCGCGCGCGCTA CTACGAGGGGGGTGTTAAGCCGCGCCCCCTCTCTCAGTGTGTGTTTTTTTCCCCCA CACGCAAGAGAGAGAACCCCCCTTTTTTTGGCCTGGTGATACTCCTCTTTCCACCACCACA AGGGGGGGGGGAGAGTCACCCCATCCACCCCCCCCACAAGGACGCCCCCATTTTTAA GAGTTGTATCTCCAATTTTTCCACCCCCCCCCCTTTCCCCCTTTGTTTTTTTAAAGGCC CCCCCCCCGAAGCCCTCGTAAATTTTTAATTATTTTGGTTTTTACTCCGGAATTTAAAAATA GAAAAAGATTTAGGGTCCTCTGGGCGCCCTTCCCTTTACCCGAGCGGGTGTCCCCGAGG CAACAAATTGGATGTTACCGGGGTTGGAGTTTAACTCGGTAAGATTTTCTCCGGGCCTT TGATATGCTTAAGTTCAGCGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTGAGAGTTGGGGTT TAACGGCTTGGCCGCGCCGTACCGAGTTGCGAGGGTTTACTACTACGCAATGGAAGCTGCAG CGAGACCGCCACTGTATTTGCGGGCCGCGCTTGCCGTGAGGCTCGCCGATCCCCAACCAAAACC

CGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTG
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGTATTATTTATGTTTTTA
CTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCGGTTCCGTTTTACCGGG
AGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGG
TAATGATCCCTCCGAGGAACCCCTTACAGAAACATTACGAGTTTACAACCTCAACCTGTGAAC
ATACAATTTTGTCTCGCGAACACCGCTTCCGGTAAACGGGAGGGCGCGGAAGACCTAAAC
TTTTTCTTTTTTAACTTCGAGTAAACCCTAATTAAATCAAAATTTTACGGGATTGTTTTTT
TGTCTTAAAAAACACAAAGGCGGCAAAAGTGAAGGTGTAGAAAAATTGTTAATGAAACATTTT
TAAAGCGCGGGCTTCTGCGGGGGTTATGAGGAGTTTCTCCCCCCCCGTTTGGTGTGTG
GAAAAGCGAGCACCCGGACCCACAAAAAGGGTTTTGTCTCTCCCGGTGTGGAGATAAAA
CACTCGCGGGAGACGGCGCGCTTCTCCCCCTTGATGTGTCTCGAGGTGAACCCCCATA
TATATATGTGTGAGTGGAGGAACT

Fp2 ITS fisioned

AGTTTTTTTTTCTTCTCCCTAATATATAATAAAGGAGGGGTTTTCCCCCCTGCGG
GGGCAAAACAAAAAGAGAGGGGGGTAATAGCGGGCCCCCCCCCGTGGGGGTGTTTTT
TTTTTACCCAGCGAGAGAGGAGAGACACCCCTTTTTTTTTGGGGGGGGCGCAGAGCG
TCGCTATTTCCCCCAACCAAAAGCGGTGGGTGAGAGAGAATACCCACCAACCGCGCGGG
GGGGCGGGGTTTAAAGAGAGTCTAAATATTTTTTCCCCCCCCCACAACCTCCTTCGCTTT
TTTTTTAAACGAAAAACACCAATTCTGTGAAATTTAATTTATTTAGGGTTTACTCCGG
AATTAAAAAATAAAATTTAGGGTCTTCGGCGGGCTTCCCGTTTACCGGAAGCGGG
TGTTCCGCGGACCAACCAATTGATTTTACAGGGTTTGAGTTGTAAACTCGTAATGATT
TCCTCCGGGATTTGATATGCTTAAGTTACGCGGTATTCTACGTATCCGAGGTCAACATTCA
GAAGTTGGGGTTTAAAGGCTTGGCGCGCGCGTACAGTTGCGAGGGTTTTACTACTCGCA
ATGGAAGTCGAGCGAGACCGCCACTGTATTTGCGGGCGGCTTGCCGTGAGGCTCGCCGATCC
CCAACACCAAAACCGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATA
CTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
TCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGTATT
ATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCGGTTT
CGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAG
TTGTAAACTCGTAATGATCCCTCCGAGGCACCCCAACGAAACATTACGAGTTTACAACCTC
AAACCTGGTGAAAAAACATTGTTGGCGGGCGGAACAACCGCTCCCGTTAAACGGGAAGGCC
GCCGAGGGACCCTAAACTCTGTTTTCTATATTTAACTTCGGAGTAAAAACATAAATAAAATCAAAAT
TTTAACAACGAATTGGTGGTTTCCGGGCTTCAAAAAAAGACACACAGCGCTTGAGTAGTGTGAA
TGCAAAATTTGTGAACACCACTTTTTTAACACACGGCGCCCCCGCTATAGGCGGGGGGGCTTC
TACCCGTTCTGTGTTTGGGAAAAGAGCTTAGAGCACCCCAAAAAAGAGTGGCGTGCCT
CTCTCGTGGCGTATAATAAACTCACGTGAAGAGGGGGCGCGCTTACACACTCTTGTA
TTGATCTCTCAAGGGAGAGACGCTCATATACAATATTATGGGAAGAGAAAAA

Fp4ITSfisioned

CTCCGGGTTTCACTCCCATCTCGCAGTACAGTCGCTGTTAATGACACAGCAGCACACA
GCCGTAGAGAGTTATAATTATGTTCTGTTATCTCAGAGAGAACCTATATAAAAAATTTGGGG

```

TCTTTGGCGGGCGCGCTATATGTCGTTTATTTCCCGCGGAAACCTTAAAGGTTTTTTCACCGGT
GGAGGAGTGAAAACGTAATTTCTCCGGCCTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTCT
ACCTGATTGAGGTCAACATTGAGAGTTGGGTGTTTACACATTGAGAGTTGGGTGTTTACG
GCGTGCGCGCGCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGTAGCTACTACGCAATGGAAGCTGCGGCGGGA
CCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGTTGTGCCCCGAGGGGGCTTCCGCCGATCCCCAACGCCAG
GCCCCGGGGCCTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCGCCAGAATACTGGCGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTT
GCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAATTTATTTGCTTG
TTTACTCAGAGAAACATTATAGAAACAGAGTTAGGGGGTCTCTGCGGGGGCGGCCCGTGT
ACGGGGCCGCTGTTCGCCCGAGGCAACGTATAGGTATGTTCACAGGGTTGATGAGTTGTAT
AACTCGGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCCCTACGGAATACCGAGTTATACAACCTACAACCGG
GGAAAAATACCTTTTAAGTTTCCCGGGCGGAAAAAACGGCCCAAAGGGGGCCGCCCCAGG
ACCCCAATCTTTTTTTATAAGGTTTCTCCGAGTAAAAGCAAATAAATTAACCTTCTCACG
GGACCTTTGGGGTCTTGCTCTTTAAAAAAGCACGCCAAGGGGATAAGTAGGGGGGAGGTAA
AAACTGGGCAGCACCACTCTTTAAACCATTTGGGCGCGCCGATATATGGGGCGGAGTGC
GTCTTAGAGATATCTACACCCCGCGCGCGGGGGGTGTTGGGGAT

```

En el cuadro 11 se muestran las secuencias que fueron “Blasteadas” para la búsqueda de la identidad molecular de las cepas, el alineamiento de la secuencia se hace con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable, las bases de empalme son las que se muestran en color amarillo en donde los oligos ITS 1-4 son pegados a las pares de bases 3’ y 5’ que permiten conocer el gen de interés, con base al Taq polimerasa y una enzima termoestable para seguir una secuencia hasta encontrar una repetición en los ciclos en las bases nitrogenadas en ADN.

Cuadro 12. Iniciadores específicos, empleados para la amplificación de fragmentos de la especie de Fusaría.

Nombre del iniciador	Género de Especies	Especies identificadas
Fp2 Fusion 1515bp	<i>Fusarium nygamai</i>	98.32 %
	<i>Fusarium sp</i>	95.70%
	<i>Fusarium proliferatum</i>	93.27%
Fp3 ITS fusioned	<i>Fusarium nygamai</i>	97.82%
	<i>Fusarium proliferatum</i>	93.62%
	<i>Fusarium spp</i>	93.37%
Fp4 ITS fisioned	<i>Fusarium spp</i>	97.56%
	<i>Fusarium spp KC</i>	91.76%
	<i>Fusarium spp KC</i>	91.56%

Como se logra ver en el cuadro 12 se identificaron especies a base de nuestros iniciadores Fp2, Fp3 y Fp4 en donde los valores de identidad para las cepas superaron el 90%, a base de la herramienta Targeted Loci Nucleotide BLAST.

Las secuencias con alto porcentaje de identidad fueron elegidas y analizadas a base de nuestro gen (ITS).

Se identificaron especies las cuales fueron *Fusarium nygamai*, *Fusarium proliferatum* y especies de *Fusarium spp.*

Fusarium nygamai resalta en ser el importante en la identificación de especie en un 98.32 - 97.82% toma el papel protagónico en Fp2 y Fp3 , se sabe que en diversos estudios se ha presentado como un hongo asociado en pudrimientos basales del tallo y en la raíz del grano. Por lo general, se pueden diferenciar mediante el uso de pruebas de apareamiento o mediante secuencias de ADN. La separación entre ellas como especies biológicas no es completa según (John F. Leslie & Brett A. Summerell, 2006).

A comparación de *Fusarium spp* 97.56% en Fp4, pero no una identificación de una sola especie , como se sabe *Fusarium spp* dicta de ser en varias especies y no se logra dar una identificación individual de Fp4, si bien este hongo produce metabolitos tóxicos que ponen en peligro la salud de los seres humanos y de los animales según, (Ma et al., 2013).

Basándonos a nuestras referencias de estudio se logró identificar que Velarle y Valdez(2020) obtuvieron una especie de *Fusarium nygamai*, resaltando como los

principales con mayor predominancia habitualmente encontrado en plantas en este caso del maíz.

4.8 Vista microscópica final de *Fusarium spp*

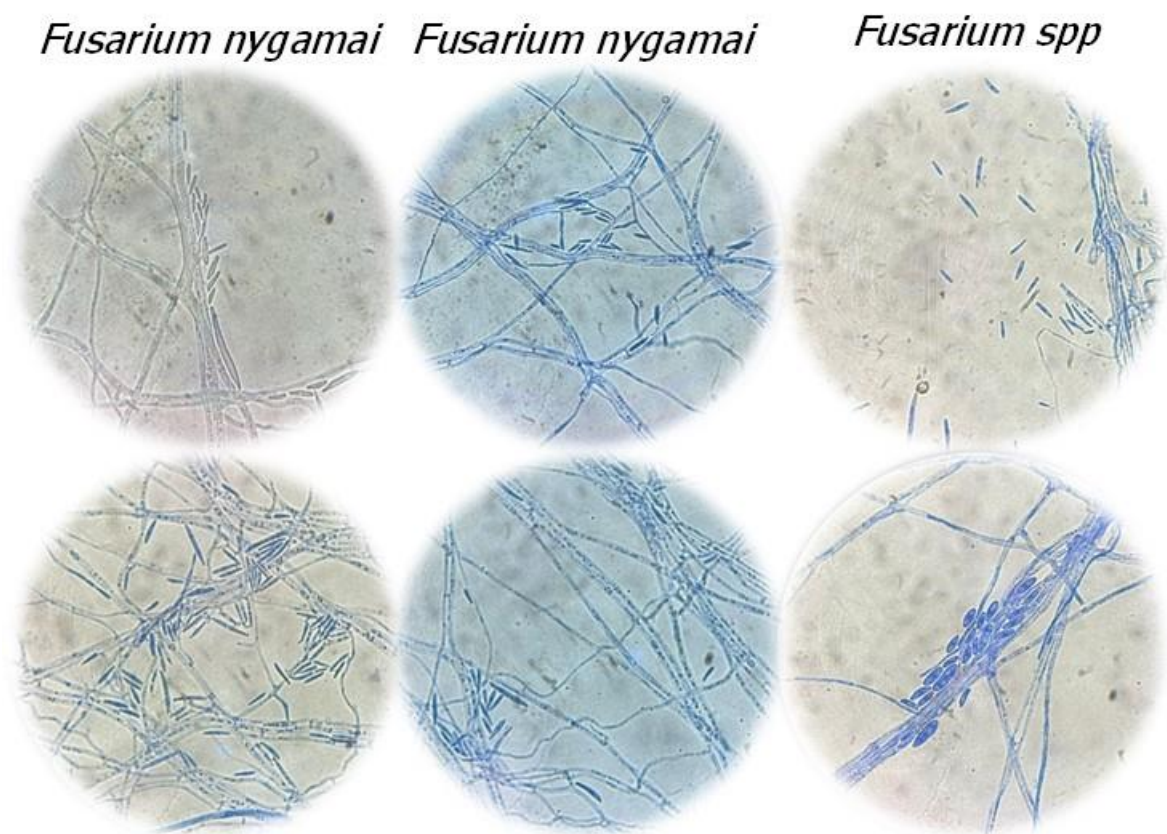


Figura 27. Vista microscópica de especies de *Fusarium spp*.

Retrocediendo a la identificación macroscópica *Fusarium nygamai* y diferentes especies en *Fusarium spp*, (figura 27) en cada una de ellas se logra observar presencia de macroconideas y microconideos.

Según Leslie y Summerell (2006), los macroconidios suelen presentarse en el género de *Fusarium spp* en forma de medialuna, hialinos y septados, en su clasificación es de importancia el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos. Los microconidios,

ausentes en algunas especies, poseen formas variadas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas "falsas cabezas"), en cadenas largas o cortas.

Capítulo V

Conclusiones

5.1 Conclusiones del proyecto, recomendaciones, experiencia profesional y personal adquirida

La identificación de especies dentro del género *Fusarium spp*, fue de manera precisa y rápida.

La utilización del amplicon ITS1-4 permitió identificar las especies correspondientes a los aislados Fp2 y Fp3, como *Fusarium nygamai*, en el caso de la cepa Fp4 es recomendable ampliar el número de amplicones como tub2 o tef1, para poder identificar la especie.

La utilización de técnicas moleculares y recopilación de información molecular permite dar un impulso en aspectos biotecnológicos en proyectos, que permitirán conocer diferentes mecanismos de diferentes especies, ya sea de plantas entre otros, desarrollando alternativas de control para diferentes patógenos en cultivos.

5.2 Conclusiones relativas a los objetivos específicos

Cada uno de los objetivos establecidos dentro del proyecto fueron cumplidos y desarrollados en tiempo y forma siguiendo orden planteado.

5.4 Aportaciones originales

El aspecto de biología molecular es una herramienta útil para poder dar respuestas a diferentes series de preguntas, conociendo a fondo diferentes especies dependiendo a que se quiera enfocar , en este aspecto al género, conociendo a base de estructuras, ácidos nucleicos , detección de proteínas , pasando a un proceso biológico.

La búsqueda de información relevante a base de identificación molecular ,fue esencial para realizar comparaciones en detección de géneros de especies, en

trabajos de ADN , basado en agricultura aplicando organismos para su desarrollo, en tener control de plagas en cultivos en este caso el maíz, dando una producción eficaz ,disminuyendo gastos por parte de agricultores al conocer la especie causante de la enfermedad.

5.5 Limitaciones del modelo planteado

El uso de solo un amplicon genera cierto grado de incertidumbre para la identificación molecular ya que un solo gen no permite identificar de manera específica a comparación de otros genes que puedes ser vareados.

5.6 Recomendaciones

Se propone un convenio por parte del centro de investigación (CIIDIR), para poder dar continuidad a este proyecto basado en identificación molecular, para conocer diversas técnicas por parte de biología molecular en biotecnología, enfocarse poco a poco e ir conociendo en este aspecto, también se podría implementar la llegada del uso de material al Instituto Tecnológico de Teziutlán.

Capítulo VI

Competencias desarrolladas

6.1 Competencias desarrolladas y/o aplicadas

- Responsabilidad y organización independiente
- Búsqueda de información en fuentes confiables bibliográficas.
- Desarrollo y conocimiento de biológica molecular
- Uso de equipos de laboratorio
- Uso de técnicas aplicadas en laboratorio en microbiológica y biología molecular
- Uso de software digital
- Búsqueda de información y redacción
- Pensamiento analítico y critico

CAPÍTULO VII

Fuentes de información

7.1 Fuentes de Información

- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos tropicales*, 30(2), 00-00.
- Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular. LE Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds). INECC. México*, 517-552.
- Bell, D. (2023, March 23). *Micelio, un laberinto mágico que intriga y promete* / *Letra Urbana*. Letra Urbana. <https://letraurbana.com/articulos/micelio-un-laberinto-magico-que-intriga-y-promete/>
- Brown, D. W., & Proctor, R. H. (2013). Fusarium. *Genomics, Molecular and Cellular Biology, Norfolk, UK*.
- Coll, V. B. (2007). Estructura y propiedades de los Ácidos Nucleicos. *Química Aplicada a la Ingeniería Biomédica*.
- Conabio. (s. f.). *Qué nos aportan los maíces* / *Biodiversidad mexicana*. Biodiversidad Mexicana. https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_maices
- Conalepfelixtovar. (2012, 26 septiembre). *Técnicas y métodos de aislamiento y selección de microorganismos*. conalepfelixtovar. <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>
- de Mercados Agropecuarios, A. de S. a. la C. y. D. (s/f). *¿Conoces el origen del maíz?* gob.mx. Recuperado el 31 de julio de 2023, de <https://www.gob.mx/asercia/articulos/conoces-el-origen-del-maiz?idiom=es>
- De Servicios A La Comercialización Y Desarrollo De Mercados Agropecuarios, A. (2018). *Maíz grano cultivo representativo de México*. gob.mx.

<https://www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico>

- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *TRENDS in Genetics*, 29(10), 569-574.
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- Fundación Instituto Roche - Glosario de Genética - Gen constitutivo. (s. f.). <https://www.instituto-roche.es/recursos/glosario/gen+constitutivo>
- *Fusarium spp*, «Hypocreales: Nectriaceae» Podredumbre de raíces. (2020). Bayer Crop Science. Recuperado 12 de enero de 2024, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/600884/Podredumbre_de_raices.pdf
- Henao-Henao, E. D., Hernández-Medina, C. A., Salazar-González, C., Velasco-Belalcázar, M. L., & Gómez-López, E. D. (2018). Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 53.
- Lievens, B., Rep, M., & Thomma, B. P. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(8), 781-788.
- López, M. D. C. (2012). Identificación y variabilidad genética de cepas de *Fusarium spp* aisladas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en Baja California, México
- Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Mokobi, F. (2021, 26 julio). *Fusarium SPP- an overview*. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/fusarium-spp/>

- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia*, 19-40.
- Nhgri. (2019b, marzo 9). *Secuenciación del ADN*. Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of Fusarium: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43, 583-595.
- Ochoa Fuentes, Y. M., Cerna Chávez, E., Gallegos Morales, G., Landeros Flores, J., Delgado Ortiz, J. C., Hernández Camacho, S., ... & Olalde Portugal, V. (2012). Identificación de especies de Fusarium en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de micología*, 36, 27-32.
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31, 535-546.
- Pardo, G. G. (2004). ADN: historia de un éxito científico. *Revista colombiana de filosofía de la ciencia*, 3(11), 9-40.
- Peña Cuellar, R. D. (2017). *Variables morfométricas y análisis molecular para la identificación de razas colombianas de maíz (Zea mays L.)* (Doctoral dissertation).
- **PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN.** (2020, 2 octubre). bancoadn. Recuperado 12 de enero de 2024, de <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A. M., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., ... & Klemsdal, S. S. (2008). Morphological and molecular

identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 463-468.

- Ruiz, M. Á. (2018). Principales enfermedades del cultivo de maíz. *Unisem*. <https://semillastodoterreno.com/2018/09/principales-enfermedades-del-cultivo-de-maiz>
- Saez Gomez, K. C., & SAEZ GOMEZ, K. C. (2018). *Presencia de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos contaminantes en productos agrícolas en localidades de Puebla y Tlaxcala* (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Salmones, D. S., & Mata, G. M. (2019). *TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE cepas de hongos EN EL LABORATORIO* (1ª. edición, 2021). Gerardo Mata y Dulce Salmones. https://www.inecol.mx/inecol/images/pdf/libro_cepas.pdf
- SAN EMETERIO, J. P., LARA, T. E., & ANDRÉS, G. Q. (2002). CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS (I). ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN Y REPRODUCCIÓN. *J. Liébana Ureña, Microbiología Oral*, 244-253.
- SUÁREZ-CONTRERAS, L. Y., & PEÑARANDA-FIGUEREDO, F. A. (2022). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 20(1), 194-206.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.

TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO. (s. f.).

https://viresa.com.mx/blog_tipos_medios_cultivo

- Velarde Félix, S., Valdez Rubio, N., Zamora Galván, F., López Molina, R., Melgoza Villagómez, C. M., & Garzón Tiznado, J. A. (2018). Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(8), 1675-1689.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1.
- Veritas [a LetsGetChecked company]. (2019, 21 mayo). *¿Qué es el ADN?* veritasint. Recuperado 23 de agosto de 16d. C., de <https://www.veritasint.com/blog/es/que-es-el-adn/>
-

CAPÍTULO VIII

Anexos

Figura 28. Recolección de muestra de micelio.



Figura 29. Espectrofotometría de ADN.



Figura 30. Ajustamiento pH de 8 para amortiguador CTAB.

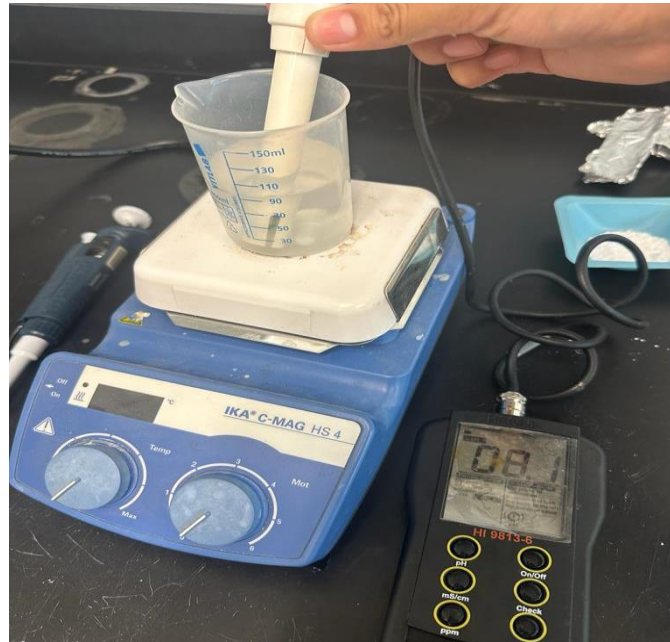


Figura 31. Técnica de electroforesis en ADN.

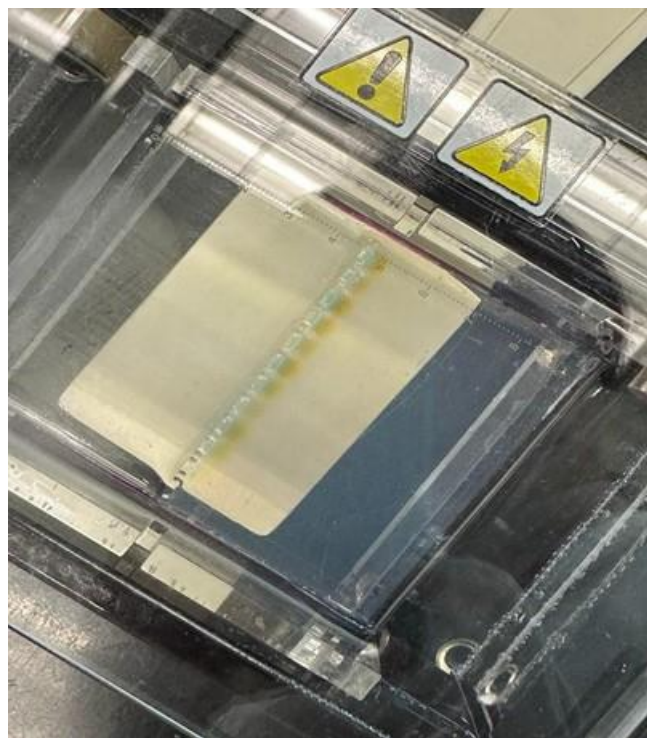


Figura 32. Técnica para visualización de macroconidios y microconidios.

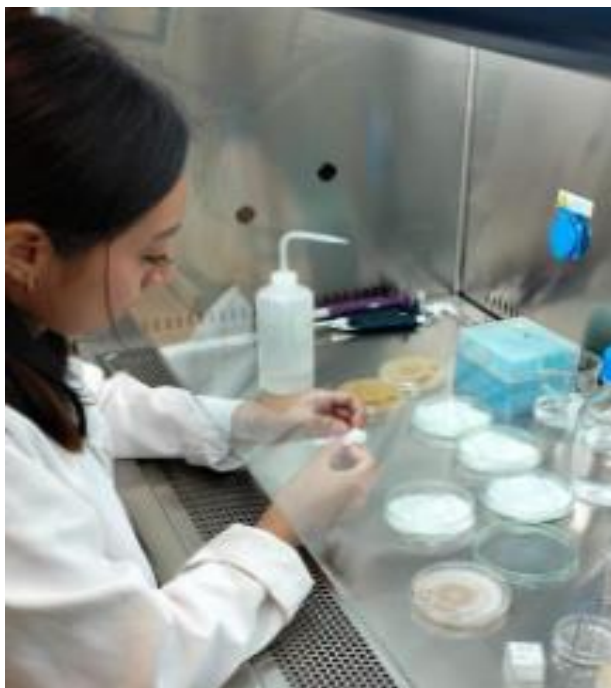
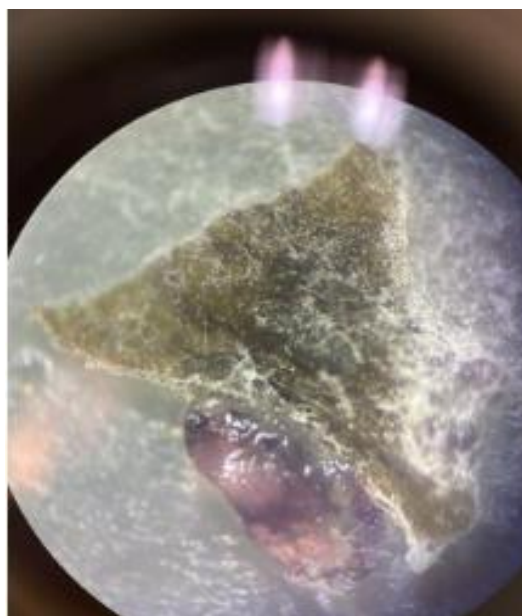


Figura 33. Visualización microscópica de *Fusarium* sp, en medio CLA.



Índice de Cuadros

Cuadro 4. Clasificación taxonómica del maíz , fuente de Acosta, R. (2009).....	26
Cuadro 5. Clasificación taxonómica de <i>Fusarium spp.</i> EPPO, 2020.....	29
Cuadro 1. Cepas en orden por cada medio enlistadas proporcionadas dentro del laboratorio de Fitomejoramiento molecular.	40
Cuadro2. Cantidades empleadas para PCR.	47
Cuadro 3. µL empleados para la reacción de la cadena de la polimerasa	49
Cuadro 4. Monitoreo del crecimiento micelar de las cepas Fp en medio PDA.....	51
Cuadro 5. Monitoreo del crecimiento micelar de las cepas Fp en medio PDA. Sabouraud.	51
Cuadro7. Características macroscópicas de las cepas Fp crecidas en medio Sabouraud a los 5 días de crecimiento.	57
Cuadro 9. Valores indicados de pureza en muestra de ADN	64
Cuadro 10. Concentraciones de purezas de ADN por medio de espectrofotometría.	69
Cuadro 11. Zona de empalme de la secuencia.....	70
Cuadro 12. Iniciadores específicos, empleados para la amplificación de fragmentos de la especie de Fusaría.....	73

Índice de Figura

Figura 1. Territorial del área de estudio del municipio de Guasave, Sinaloa. 2018.	19
Figura 2 . Micro-localización del estado de Guasave. Inegi 2023.	20
Figura 3.. Ubicación satelital del CIIDIR.2023.	21
Figura 4. Maíz (Agropecuarios, Gobierno de México, 2018).....	25
Figura 7. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.....	39
Figura 8. a) Toma de punta para hacer el “plug” en la cepa y b) Recolección de muestra del hongo.	41
Figura 9. a) Marcador de los cuatro cuadrantes para crecimiento, b) Medición del crecimiento de hongo, c) Vista del crecimiento avanzado de hongos en PDA y Sabouraud.	42
Figura 10. a) Raspamiento de micelio, b) Toma de muestra del hongo colocada en el tubo Eppendorf y c) Alineamiento de las muestras finales.	43
Figura 11. Micelio recogido en tubos eppendorf.....	44
Figura 12. a) Adición de los 200 µL del amortiguador CTAB , b) Maceración de las muestras y c) Agregación de µL del amortiguador.	44
Figura 13. Incubación de las muestras de micelio para ADN.	45
Figura 14. a) Centrifugación de las muestras y b) Parte acuosa superior de la muestra libre de impurezas inferior.....	45

Figura 15. a) Parte acuosa siendo transferida a un nuevo tubo eppendorf y b) uso del isopropanol a las muestras.	46
Figura 16. a) Técnica de electroforesis en gel de garosa, b) Corrimiento del ADN con corrimiento Blue /Orange y c) Detección de posicionamiento del gel pasado por electroforesis en equipo de Molecular Imager.....	46
Figura 17. Uso del termociclador a temperaturas de 95°C, 55°C y 72°C.....	48
Figura 18. Dinámica de crecimiento de las cepas Fp en medio PDA.....	53
Figura 19. Dinámica de crecimiento de las cepas Fpen medio Sabouraud.....	53
Figura 20. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de cepas Fp en medio PDA de la parte superior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.	55
Figura 21. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de las cepas Fp en medio PDA de la parte inferior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.	56
Figura 22. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de Fp crecidas en medio en Sabouraud de la parte superior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.	58
Figura 23. Caracterización de pigmentación y morfología de crecimiento de las cepas Fpen medio Sabouraud de la parte inferior de las cajas Petri a los 5 días de crecimiento.	59
Figura 8. Vista microscópica de macroconidios y microconidios.....	61

Figura 24. Electroforesis al 0-5 %de extracciones en el primer pozo "MP" y último con marcador de peso Lamda Mix , en los pozos 2 a 9 se cargaron las muestras de ADN provenientes de las cepas Fp con amortiguador Orange 1x.	63
Figura 25. Primera corrida de electroforesis 1.5 % de agarosa en PCR pozo 1 y 7 "MM" marcador molecular , pozo 4 a 6 muestra de ADN en PCR, PB = número de pares de bases.....	66
Figura 26. Segunda corrida de electroforesis 1.5 %PCR pozo 1 y 6 "MP" marcador de peso , pozo 2 a 4 muestra de ADN en PCR, mostrando PB = número de pares de bases.....	68
Figura 27. Vista microscópica de especies de <i>Fusarium</i> spp.....	75
Figura 28. Recolección de muestra de micelio.	89
Figura 29. Espectrofotometría de ADN.	89
Figura 30. Ajustamiento pH de 8 para amortiguador CTAB.....	90
Figura 31. Técnica de electroforesis en ADN.....	90
Figura 32. Técnica para visualización de macroconidios y microconidios.....	91
Figura 33. Visualización microscópica de <i>Fusarium</i> sp, en medio CLA.....	91

LICENCIA DE USO OTORGADA POR Norma Cecilia Hernández Millán, de nacionalidad Mexicana, mayor de edad, con domicilio ubicado en la calle Carretera San José Acateno No. S/N, Colonia Zanzontla, en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor(a) de la tesis denominada "Identificación molecular de hongos provenientes de maíces con síntomas de fusariosis" en adelante "LA OBRA" quien para todos los fines del presente documento se denominará "EL(LA) AUTOR(A) Y/O EL(LA) TITULAR", a favor del Instituto Tecnológico Superior de Teziutlán del Tecnológico Nacional de México, la cual se registrá por las clausulas siguientes:

PRIMERA –OBJETO: "EL(LA) AUTOR(A) Y/O EL(LA) TITULAR", mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico Superior de Teziutlán del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuita e indefinida respecto de "LA OBRA", para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través del repositorio institucional y del repositorio nacional, éste último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

SEGUNDA - TERRITORIO: La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geográfica o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

TERCERA -ALCANCE: La presente licencia contempla la autorización para formato uso de "LA OBRA" en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguientes medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (en red), mensaje de datos o similar, conocido o por conocerse.

CUARTA – EXCLUSIVIDAD: La presente licencia de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico Superior de Teziutlán; por lo tanto, "EL(LA) AUTOR(A) Y/O EL(LA) TITULAR" conserva los derechos patrimoniales y morales de "LA OBRA", objeto del presente documento.

QUINTA – CRÉDITOS: El Instituto Tecnológico Superior de Teziutlán y/o el Tecnológico Nacional de México y también por parte del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, reconocen que "EL(LA) AUTOR(A) Y/O EL(LA) TITULAR" es el(la) único(a), primigenio(a) y perpetuo(a) titular de los derechos morales sobre "LA OBRA"; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

SEXTA – AUTORÍA: "EL(LA) AUTOR(A) Y/O EL(LA) TITULAR" manifiesta ser el(la) único(a) titular de los derechos de autor que derivan de "LA OBRA" y declara que el material objeto del presente fue realizado por él(ella), sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el(la) único(a) responsable. Dado en la Ciudad de Teziutlán, Puebla, al primer día del mes febrero de 2024.

"EL(LA) AUTOR(A) Y/O
EL(LA) TITULAR",



Norma Cecilia Hernández Millán
Nombre y Firma

"EL INSTITUTO TECNOLÓGICO
SUPERIOR DE TEZIUTLÁN"



Arminda Juárez Arroyo
Directora General
Nombre, Firma y Sello

Asunto: **Asignación de Asesor(a), Comisión Revisora, Entrega de Trabajo Profesional y Dictamen**

Teziutlán, Puebla, **15/enero/2024**

Asesor(a): **JACQUELIN LEON BAEZ**
Integrante de Comisión Revisora: **DULCE MARIA HERNANDEZ DEGANTE**
Integrante de Comisión Revisora: **FRANCISCO ROBERTO QUIROZ FIGUEROA**
Presentes

Por este medio me permito informar que ha sido asignado como asesor(a) y comisión revisora del trabajo profesional que se convertirá en Tesis de:

Alumno(a):	HERNANDEZ MILLAN NORMA CECILIA Apellido paterno/materno/nombre (s)		
Número de Control:	19TE0702	Licenciatura o Posgrado:	INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
Plan:	2010	Correo Electrónico:	L19TE0702@TEZIUTLAN.TECNM.MX
Cuyo tema es:	IDENTIFICACION MOLECULAR DE HONGOS PROVENIENTES DE MAICES CON SINTOMAS DE FUSARIOSIS 25 palabras (máximo)		

Se ha enviado a su correo institucional el trabajo profesional o de grado, por lo cual la comisión revisora tendrá 5 días hábiles para realizar las observaciones al alumnado, el(la) interesado(a) tendrá igualmente **5 días** para corregir y las enviará al correo electrónico institucional de la comisión revisora, agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de licenciatura o de posgrado de nuestro alumnado egresado.

Dictamen de Comisión Revisora, Aprobación de Impresión o Grabación y Autorización para subirla al Repositorio del TecNM

Siendo el día: 31 de enero de 2024 se reunieron los miembros de la comisión para revisar el trabajo asignado y una vez analizado se decidió liberarlo y aprobarlo para su grabación y programación de examen profesional.

JACQUELIN LEON BAEZ
Nombre y Firma del(la) Asesor(a)

FRANCISCO ROBERTO QUIROZ FIGUEROA
Nombre y Firma de integrante de la Comisión Revisora

R08/06/2023
Folio:49

DULCE MARIA HERNANDEZ DEGANTE
Nombre y Firma de integrante de la Comisión Revisora

MYRIAM SANCHEZ PEREZ
Subdirección Académica


ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
GOBIERNO DEL ESTADO
S.E.P.

**INSTITUTO TECNOLÓGICO
SUPERIOR DE TEZIUTLÁN
SUBDIRECCIÓN
ACADÉMICA**

F-SAC-18



Fracción I y II s/n Aire Libre, Teziutlán, Puebla, C.P. 73960 Tels. 231 311 4000 / 4001 / 4002 / 4003
e-mail: itsteziutlan@hotmail.com | www.teziutlan.tecnm.mx



Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico Superior de Teziutlán

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DEL(LA) AUTOR(A) PARA LA CONSULTA Y
PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

El que suscribe:

NORMA CECILIA

HERNÁNDEZ

MILLÁN

Con Número de
Control **19TE0702**

Perteneciente al
Programa **INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**
Educativo

Por este conducto me permito informar que he dado mi autorización para la consulta y publicación electrónica del trabajo de investigación en los repositorios académicos.

Registrado con el
producto: **TESIS**

Cuyo Tema es:

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS PROVENIENTES DE MAÍCES CON SÍNTOMAS DE
FUSARIOSIS**

Correspondiente al periodo:

AGOSTO-DICIEMBRE 2023

Y cuyo(a) director(a) de tesis es:

**DR. FRANCISCO ROBERTO QUIROZ
FIGUEROA.**

MPB.JACQUELÍN LEÓN BAÉZ


ATENTAMENTE

NORMA CECILIA HERNÁNDEZ MILLÁN

Nombre y firma

Fecha de emisión: **01/02/2024**
c.c.p. Subdirección Académica