

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INFORME TECNICO
DE RESIDENCIA PROFESIONAL
INGENIERIA BIOQUIMICA

PRESENTA:

ARELI CASTELLANOS DE LA CRUZ

NOMBRE DEL PROYECTO:

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE DOS GENOTIPOS DE MAIZ A LA
MANCHA DE ASFALTO**

ASESOR INTERNO:

DR. REINER RINCON ROSALES

ASESOR EXTERNO:

DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMIREZ

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

DICIEMBRE/2014

CONTENIDO

| INDICE | págs. |
|--|--------------|
| 1.- INTRODUCCION..... | 7 |
| 2.- JUSTIFICACION. | 8 |
| 3.- OBJETIVOS..... | 10 |
| 3.1. Objetivo general. | 10 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 10 |
| 4.- CARACTERIZACION DEL AREA EN QUE PARTICIPO. | 11 |
| 5.- PROBLEMAS A RESOLVER..... | 13 |
| 6.- ALCANCES Y LIMITACIONES. | 13 |
| 7.- FUNDAMENTO TEORICO. | 15 |
| 7.1. ASPECTO BIOLOGICOS DEL MAIZ (<i>Zea mays</i> L.)..... | 15 |
| 7.2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE MAIZ..... | 17 |
| 7.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE MAIZ..... | 19 |
| 7.4. PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE MAIZ..... | 21 |
| 7.5. LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA DE ASFALTO DEL MAIZ..... | 27 |
| 7.5.1. AGENTES CAUSALES..... | 27 |
| 7.5.2. DESARROLLO Y SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD..... | 27 |
| 7.5.3 TAXONOMÍA DE LA MANCHA DE ASFALTO..... | 31 |
| 7.5.4 IMPORTANCIA ECONOMICA..... | 32 |
| 7.6. RESISTENCIA GENETICA DE VARIEDADES DE MAIZ..... | 32 |
| 7.7. TECNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES EN PLANTAS..... | 35 |
| 7.7.1. ANALISIS PROTEOMICO..... | 35 |
| 7.7.2. TÉCNICAS PROTEÓMICAS..... | 35 |
| Electroforesis bidimensional (2D)..... | 35 |
| IEF..... | 36 |
| Espectrometría de masas (MS)..... | 36 |
| MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)..... | 37 |
| ESI-MS o MS/MS..... | 37 |
| Otros elementos tecnológicos asociados al estudio de proteómicos..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 7.7.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE..... | 38 |
| Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida..... | 40 |
| 8. PROCEDIMIENTO..... | 41 |
| 8.1. MATERIAL BIOLÓGICO..... | 41 |
| 8.2. ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO | 41 |
| 8.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL | 41 |
| 8.2.2. TRATAMIENTOS | 42 |
| 8.2.3. UNIDAD EXPERIMENTAL | 43 |
| 8.2.4 VARIABLES DE ESTUDIO..... | 43 |
| 8.3 ANALISIS PROTEOMICO | 46 |
| 8.3.1. PREPARACION DE MATERIAL..... | 46 |
| 8.3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE). | 47 |
| 8.3.3. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS. | 52 |
| 8.3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRANDFORD | 52 |
| 9. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 54 |
| 10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. | 64 |
| 11. BIBLIOGRAFIA. | 65 |
| 12.- ANEXOS. | 67 |

| INDICE DE FIGURAS | | |
|-------------------|--|---------|
| No. Figuras | TITULO | Paginas |
| 1 | Localización el Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). | 11 |
| 2 | Morfología de la planta de maíz | 15 |
| 3 | Principales partes estructurales del maíz | 16 |
| 4 | Larva gallinita ciega | 21 |
| 5 | Barrenador de tallo | 21 |
| 6 | Gusano cogollero. | 22 |
| 7 | Chicharrita del maíz. | 22 |
| 8 | Gusano Alambre | 23 |
| 9 | Foto tomada en el INIFAP en la escala 1, presencia de <i>Phyllachora maydis</i> . | 28 |
| 10 | Foto tomada en el INIFAP en la escala 2, presencia de <i>Phyllachora maydis</i> , iniciando <i>Monographella maydis</i> . | 29 |
| 11 | Foto tomada en el INIFAP en la escala 3, presencia de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis</i> conocido como mancha de asfalto. | 29 |
| 12 | Foto tomada en el INIFAP en la escala 4, presencia de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis</i> , provocando el secamiento de las hojas. | 30 |
| 13 | Diseño experimental. | 42 |
| 14 | Porcentaje de área foliar afectada para la toma de datos de las severidades causadas por las enfermedades del maíz a la Mancha de Asfalto. | 44 |
| 15 | Grafica de la cinética de la severidad causada por la enfermedad mancha de asfalto en los dos genotipos. | 45 |

| | | |
|----|---|----|
| 16 | Contenido del equipo de electroforesis SDS-PAGE. | 50 |
| 17 | Armado del dispositivo para preparar el gel. | 50 |
| 18 | Colocación del gel en soporte e insertar en la caja de electroforesis. | 51 |
| 19 | Primera corrida a diferentes grados de la enfermedad. | 56 |
| 20 | Tabla referencia de pesos moleculares. | 57 |
| 21 | Corrida de muestras comparando plantas sanas y enfermas en el grado cuando inicia el secamiento de la planta. | 58 |
| 22 | Corrida de muestras comparando plantas sanas y enfermas en el grado cuando inicia el secamiento de la planta. | 58 |
| 23 | Curva estándar de Brandford. | 59 |

| INDICE DE TABLAS | | |
|------------------|--|---------|
| No. Figuras | Título | Paginas |
| 1 | Clasificación taxonómica del maíz. | 14 |
| 2 | Producción nacional de maíz por entidades en 2012 | 17 |
| 3 | Principales países productores de maíz. | 18 |
| 4 | Factores que afectan el cultivo de maíz. | 18 |
| 5 | Taxonomía de <i>Phyllachora maydis</i> . | 31 |
| 6 | Taxonomía de <i>Monographella maydis</i> . | 31 |
| 7 | Datos de la severidad causada por la enfermedad en los dos genotipos de estudio. | 45 |
| 8 | Preparación del Buffer de tampón de extracción. | 46 |
| 9 | Prepara la solución para el gel de separación | 48 |
| 10 | Prepara la solución para el gel de apilamiento | 49 |
| 11 | Concentraciones de la solución estándar para la curva patrón. | 53 |
| 12 | Colocación de la muestra en el gel para la electroforesis a diferentes grado de la enfermedad. | 54 |

| | | |
|----|--|----|
| 13 | Colocación de la muestra en el gel para la electroforesis en comparación de la muestra sana y enferma en el grado cinco iniciando el secamiento. | 56 |
| 14 | Resultados de las absorbancia para la curva estándar. | 59 |
| 15 | Resultado de absorbancia en la muestras en presencia del hongo. | 60 |

1.- INTRODUCCION.

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. Este grano se produce en dos ciclos productivos primavera-verano y otoño-invierno, bajo las diversas condiciones agroclimáticas (humedad, temporal y riego), con un consumo diario per cápita de 343 gramos, es decir el 72% del total de cereales consumido en el país.

Sin embargo, la planta de maíz, aunque de reconocida adaptabilidad y resistencia, “sufre frecuentemente de ataques de plagas y enfermedades, que provocan trastornos o anomalías que alteran la fisiología normal de la misma, lo cual modifica su desarrollo y reduce o anula su producción” (Fontana y González, 2000).

Un ejemplo claro podría demostrarse en la mancha de asfalto, es una enfermedad producida por la interacción sinérgica de dos hongos: *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, ambos son hongos fitopatógenos que se presentan en una gran variación morfológica, patogénica y de adaptación a diversas condiciones climáticas por lo cual ocurre con mayor frecuencia en zonas frescas y húmedas, especialmente en campos que se encuentran cerca de las riberas o en suelos que acumulan mucha humedad y tienden a inundarse. Cuando las condiciones favorecen el desarrollo de la enfermedad, las plantas de los genotipos susceptibles pueden marchitarse por completo de 8 a 14 días después de ser infectadas, a medida que las lesiones se fusionan y producen una toxina que mata el tejido vegetal con rapidez.

De acuerdo con Mendoza-Zamora 1996, dice que las plagas y enfermedades son las principales causas de disminución en la cantidad y calidad de producción del maíz, además de tener la capacidad de atacar el maíz en ambos periodos de producción, disminuyendo el crecimiento normal de la planta y minimizando así o peor aun eliminando toda la cosecha del grano.

Las plantas emplean una elevada cantidad de señales originadas por los patógenos y el ambiente que les permiten reconocer al agresor y activar sus

mecanismos de defensa. La detención temprana del patógeno en la planta induce una serie de mecanismo entre los que se encuentra las rutas de señalización que conducen a la resistencia sistemática adquirida (SAR) la cual está involucrado en el estallamiento oxidativo, así como la expresión local y sistemática de genes de defensas.

Hoy en día existen pocos recursos para poder estudiar y conocer cuáles podrían ser algunas causas de dichas enfermedades y las posibilidades de la cura para evitar o minimizar las pérdidas del maíz, es por tal motivo que el presente trabajo permitió realizar la inoculación de la enfermedad en los dos genotipos de maíz, ya que en los estudios sobre la biología de estos hongos, se desconoce aún aspectos relacionados con el proceso de la infección y severidad en el daño que causa a las plantas. Este estudio se planteo realizar un análisis proteómicos que de tal manera ayuden a detectar la proteína o enzima producidas como respuesta a la resistencia al fitopatogeno que induce la planta.

A lo largo de este proyecto se trabajó con distintos métodos para llegar a un resultado favorable, en primera instancia, se realizó la extracción de proteínas en muestras de fragmentos de hojas de maíz en dos distintas condiciones, una en estado sano y la otra en estado de infección. Se estudió a través de la electroforesis SDS-PAGE para detectar las proteínas en la planta.

2.- JUSTIFICACION.

El maíz (*Zea mays* L.) es la base en la alimentación de más de cien millones de mexicanos, sembrándose anualmente más de 2, 000,000 ha. La humedad y temperatura favorecen el desarrollo de tizones foliares, como sucede con la mancha de asfalto, que ocurre con mayor severidad en áreas con alta humedad relativa, localizadas entre 1300 y 2300 m.

Para el periodo de 2011-2012, la producción de maíz a nivel mundial se estimó en 875.09 millones de toneladas. Los principales países productores de maíz son, en orden de importancia (en millones de toneladas): Estados Unidos de Norteamérica (273.83), China (208.13), Brasil (71.29), Argentina (25.70), México (22.06), India (21.06), Ucrania (20.96), Indonesia (19.37), Francia (15.61) y Sudáfrica (12.50), de los cuales se obtienen el 78.90% de la producción mundial. (FAO, 2012).

A nivel nacional, la superficie sembrada de maíz es aproximadamente de 7, 963, 450 hectáreas, de las cuales en el Estado de México se destinan 579, 101 hectárea ubicándose entre los principales productores de este grano, después de Sinaloa y Jalisco. El rendimiento en la entidad es de 2.85 ton/ ha, con un volumen de producción anual de 1, 549, 545 ton. (SIAP, 2012). Las pérdidas ocasionadas por enfermedades no se ha estimado; sin embargo las principales enfermedades que afectan el cultivo del maíz son de origen fungoso.

El complejo de la mancha de asfalto fue reportado por primera vez en México y se le ha observado mayormente en zonas de 1,300 a 2,000 metros sobre el nivel del mar, pero también en zonas productoras de maíz tropicales y subtropicales. Se considera que esta enfermedad tiene importancia económica en más de 800,000 ha. de los estados de Jalisco, Michoacán, Nayarit, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. Causando pérdidas de la productividad de grano y de la calidad del forraje.

Respecto al manejo de la enfermedad, Ceballos y Deutsch (1992) encontraron resistencia a mancha asfalto atribuible a un gen dominante. El control químico con aspersiones preventivas o curativas han sido efectivas (Bajet *et al.*, 1994). Lo cual surgió la necesidad de buscar e implementar alternativas para la identificación y caracterización del hongo, mediante el empleo del análisis proteómico que ayuden a detectar las proteínas producidas como respuesta a la resistencia al fitopatógeno y de esta manera generar variedades de maíz genéticamente resistentes al hongo (*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis*).

3.- OBJETIVOS.

3.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de la infección de los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, causantes de la mancha de asfalto del maíz en la inducción de proteínas de resistencia en dos genotipos de maíz contrastantes.

3.2. Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la inoculación de los hongos causantes de la mancha de asfalto en los dos genotipos de maíz
- Identificar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) las proteínas del agente causal de la enfermedad mancha de asfalto, tanto en los dos genotipos de maíz para determinar su perfil proteico.
- Cuantificar la cantidad de proteína que se encuentra en los dos genotipos por el método colorimétrico de Bradford.

4.- CARACTERIZACION DEL AREA EN QUE PARTICIPO.

El presente trabajo se realizo en el Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el Laboratorio de Sanidad vegetal, ubicado en la ciudad de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas. A continuación se menciona la misión, visión, localización, objetivos de la institución.

Misión.

Contribuir al desarrollo productivo, competitivo, equitativo y sustentable de las cadenas agropecuarias y forestales, mediante la generación y adaptación de conocimientos científicos e innovaciones tecnológicas y la formación de recursos humanos para atender las demandas y necesidades en beneficios del sector y la sociedad de un marco de cooperación institucional con organizaciones públicas y privadas.

Visión.

Institución de excelencia científica y tecnológicas, dotada de personal altamente capacitado y motivado; con infraestructura, herramientas de vanguardias y administración moderna y autónoma, con liderazgo y reconocimiento nacional e internacional por su alta capacidad de respuestas a las demandas de conocimiento e innovación y formación de recursos humanos en beneficio del sector forestal, agrícola, pecuario y de la sociedad.

Objetivos.

1.- Generar conocimiento e innovaciones tecnológicas que contribuyan al desarrollo sustentable de las cadenas agroindustriales forestales, agrícolas y pecuarias del país. En su desempeño busca el aprovechamiento racional y la conservación de los recursos naturales.

2.- Desarrollar y promover investigaciones estratégicas y de fronteras para contribuir oportunamente a la solución de los grandes problemas de productividad, competitividad, sustentabilidad y equidad del sector forestal, agrícola y pecuario del país.

3.- Promover y apoyar la transferencia de conocimiento y tecnologías forestales, agrícolas y pecuarias, de acuerdo a las necesidades y demandas prioritarias de los productores y de la sociedad, así como contribuir a la formación de recursos humanos.

4.- Fortalecer la capacidad institucional a través de la actualización, renovación y motivación de su personal, así como la modernización de las infraestructuras, procedimientos y administración, para satisfacer las demandas de la sociedad.

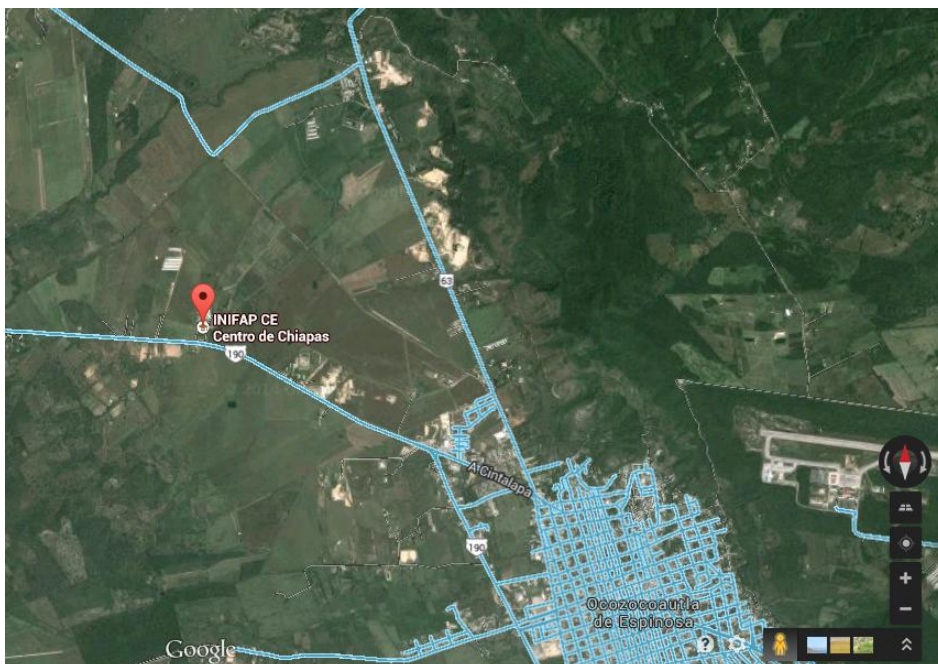


Figura 1. Localización el Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

5.- PROBLEMAS A RESOLVER.

Debido a la falta de información del agente o agentes causales de la enfermedad y su origen del mismo, es motivo por el cual surgió la necesidad de implementar alternativa para su identificación y caracterización:

Utilizando dos genotipos de maíz uno susceptible y otro tolerante a la enfermedad, con la finalidad de usar herramientas tal como el análisis proteómicas que ayuden a detectar la proteína o enzima producidas como respuesta a la resistencia al fitopatógeno que enlaza a la planta, dicho trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la infección de los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, así mismo establecer la técnica SDS-PAGE para el análisis de proteínas.

6.- ALCANCES Y LIMITACIONES.

Alcances.

- La inoculación se llevo a cabo con éxito los primeros meses: agosto-octubre obteniendo buenos resultados en ambos genotipos, cabe decir que en el genotipo susceptible fue en donde se observó la enfermedad con mayor rapidez caso contrario del genotipo resistente, no obstante por ser tolerante se exceptuó de la enfermedad en la planta, sí hubo un registro aunque en mínimas cantidades.
- Las pruebas de extracción de proteína ha proporcionado buenos resultados, ya que gracias a la técnica de electroforesis SDS-PAGE se observó cada proteína que se encuentra relacionada con la resistencia genética de cada genotipo, así mismo nos favoreció a la preparación de los geles utilizando un equipo de soluciones para gel de poliacrilamida (TGX™ and TGX stain-free™Fastcast, Acrylamide Kit and Starter Kit).

- La técnica de cuantificación de proteína por el método de Bradford, al elaborar la curva patrón nos proporcionó una ecuación que por medio de este nos dio el porcentaje de proteína que se encuentra en cada muestra.

Limitaciones.

- La principal limitante fue el tiempo para realizar más pruebas dentro del laboratorio para la identificación de proteínas en plantas de maíz.
- Otra de las limitantes fue la falta de conocimiento al ensamblar el equipo de electroforesis, ya que no se contaba con el manual para un manejo apropiado.
- La falta de algunos reactivos fue lo que coadyuvó a la demora del análisis y por ende a la obtención de los resultados.

7.- FUNDAMENTO TEORICO.

7.1. ASPECTO BIOLÓGICOS DEL MAÍZ (*Zea mays* L.).

Origen del de la planta.

El maíz (*Zea mays* L.) es originario del continente americano, la evidencia arqueológica más antigua sobre la existencia de este cereal indica que tiene aproximadamente 5000 años de antigüedad. Las representaciones de la planta de maíz en esculturas, códices, cerámicas prehistóricas, así como estudios fósiles encontrados, indican que el maíz tuvo origen geográfico en la república Mexicana, específicamente en el valle de Tehuacán, Puebla y al norte de Oaxaca. También indican que en México ocurrió su domesticación y posterior dispersión a otras regiones del continente. (FAO 2007; Reyes 1990).

Clasificación científica

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas, la cual incluye siete distintos géneros: *Zea* (como el teocintle), *Tripsacum* (conocidas como arrocillo o maicillo), *Coix*, *Chionachne*, *Sclerchne*, *Polytoxa* y *Trilobachne* (Paliwal, 2001; Pandey 1998). En la siguiente tabla se muestra la clasificación taxonómica del maíz:

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.

| CLASIFICACION TAXONÓMICA | |
|--------------------------|--|
| Reino: | <i>Plantae</i> |
| División: | <i>Magnoliophyta</i> |
| Clase: | <i>Liliopsida</i> |
| Subclase: | <i>Commelinidae</i> |
| Orden: | <i>Poales</i> |
| Familia: | <i>Poaceae</i> (<i>Gramineae</i>) |
| Subfamilia: | <i>Panicoideae</i> |
| Tribu: | <i>Andropogoneae</i> |
| Género: | <i>Zea</i> |

Especie: *Z. mays*

Nombre científico

***Zea mays* L.**

Fuente: Parsons, 1987.

Característica morfológica de la planta de maíz (*Zea mays* L.)

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta monóica, es decir, posee dos tipos de inflorescencias. Las flores masculinas están agrupadas en una panícula terminal al extremo del tallo; las flores femeninas están reunidas en una o varias espigas, se desarrollan en la axila de las hojas entre medio de la planta (Fleury, 1979),

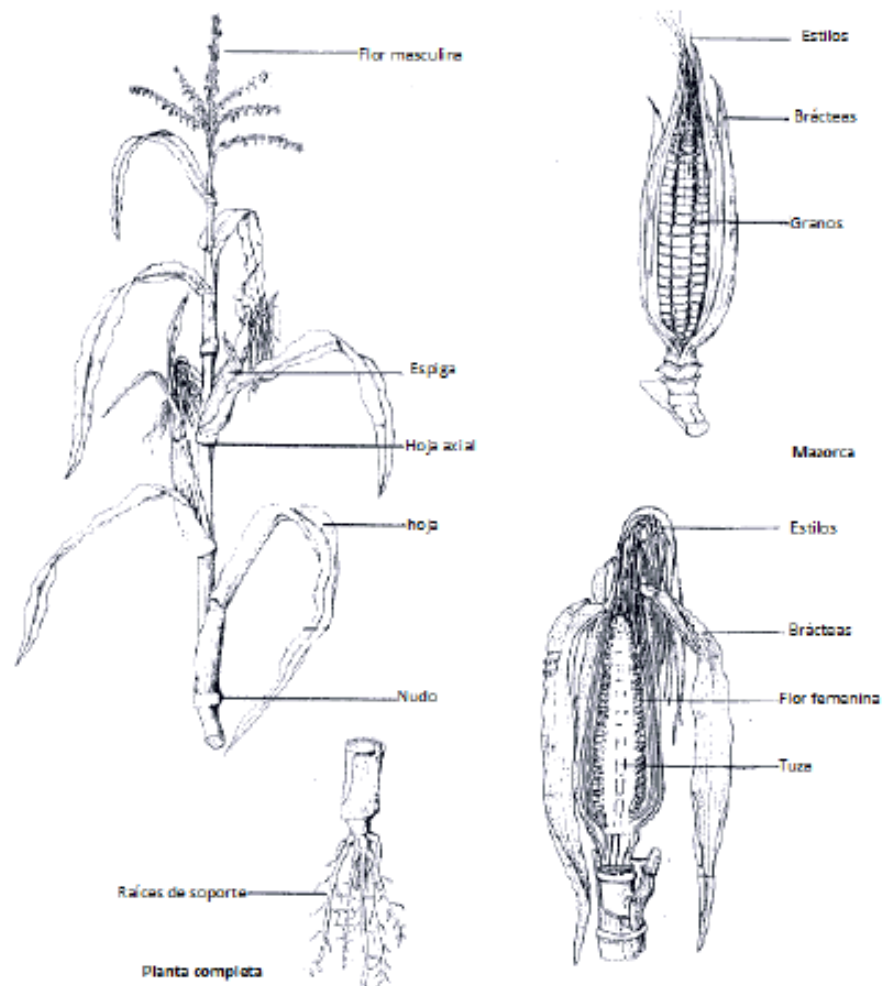


Figura 2. Morfología de la planta de maíz

Descripción botánica de la semilla del maíz.

Está compuesta principalmente de cuatro partes anatómicas que son: el pericarpio y la aleurona, el pedicelo, el endospermo y el germen. En la figura se muestra las principales partes estructurales del grano.

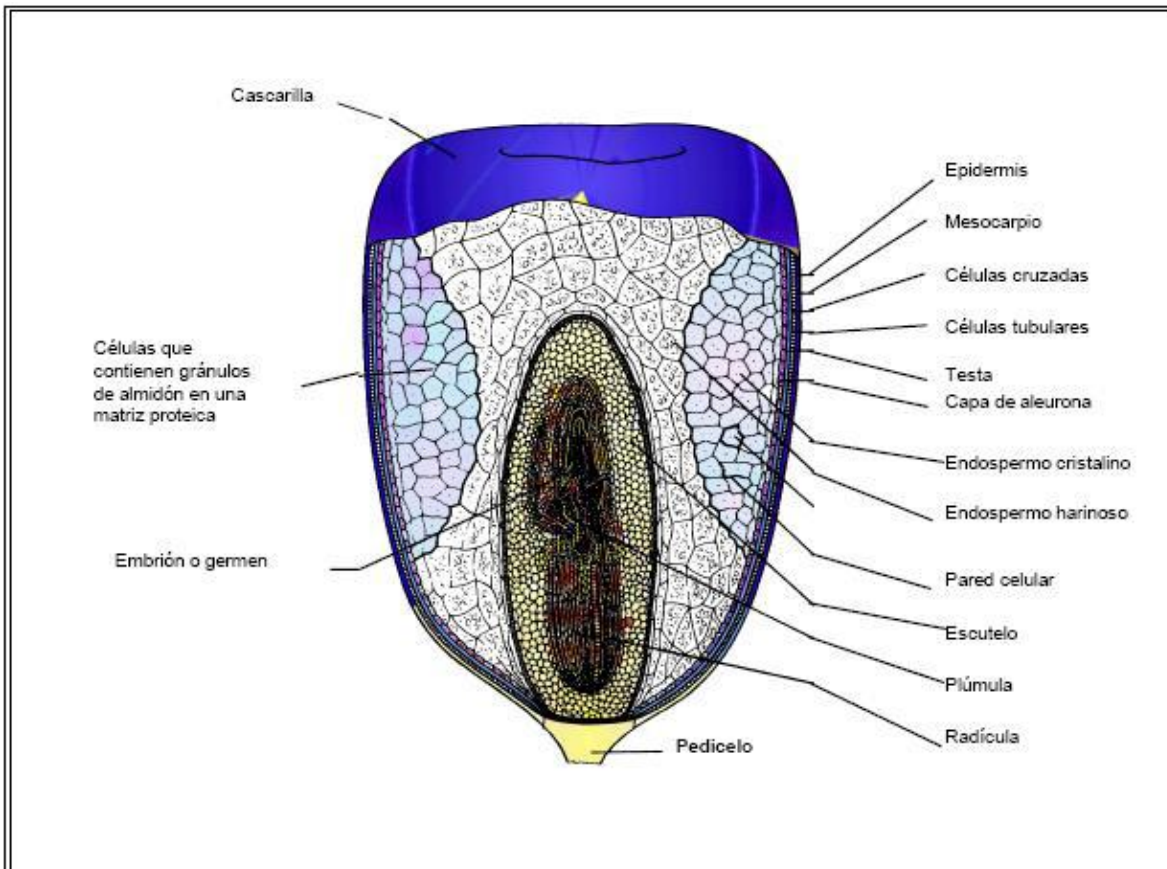


Figura 3. Principales partes estructurales del maíz

7.2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE MAIZ

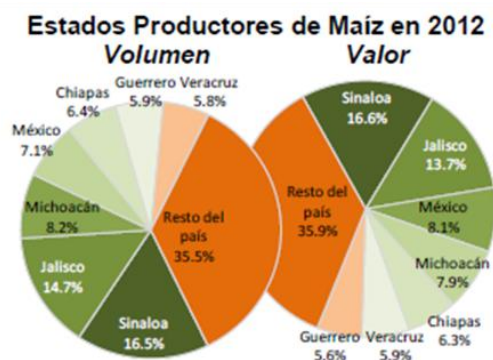
El maíz es el principal cultivo en México, participa con el 18% del valor de producción del sector agrícola (88 mil mdp en 2012 y 78 mil en 2013) y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas).

Todas las entidades del país presentan algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 64.5% del volumen de producción nacional. Sinaloa es el principal productor al concentrar el 16.5% del total. Le siguen en importancia Jalisco, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero y Veracruz.

Tabla 2. Producción nacional de maíz por entidades en 2012

| Estados | Volumen | | Valor | |
|----------------|--------------------|---------------|----------|---------------|
| | Miles de Toneladas | Participación | mdp | Participación |
| Sinaloa | 3,646.9 | 16.5% | 14,726.8 | 16.6% |
| Jalisco | 3,235.2 | 14.7% | 12,144.5 | 13.7% |
| Michoacán | 1,802.0 | 8.2% | 7,015.8 | 7.9% |
| México | 1,575.3 | 7.1% | 7,141.3 | 8.1% |
| Chiapas | 1,404.7 | 6.4% | 5,536.7 | 6.3% |
| Guerrero | 1,304.1 | 5.9% | 4,954.3 | 5.6% |
| Veracruz | 1,275.3 | 5.8% | 5,224.3 | 5.9% |
| Resto del país | 7,825.8 | 35.5% | 31,745.7 | 35.9% |
| Total Nacional | 22,069.3 | 100.0% | 88,489.6 | 100.0% |

Fuente: SIAP - SAGARPA.



Fuente: SIAP-SAGARPA.

Fuente: SIAP-SAGARPA 2012.

El rendimiento nacional alcanza en promedio las 3.2 ton/ha, siendo el rendimiento de temporal de 2.2 ton/ha y el de riego de 7.5 ton/ha.

El maíz es el cereal más ampliamente distribuido a nivel mundial y ocupa la tercera posición en cuanto a producción total, detrás del arroz y del trigo.

Para el periodo de 2011-2012 la producción de maíz a nivel mundial se estimó en 875.09 millones de toneladas. Los principales países productores de maíz son, en orden de importancia:

Tabla 3. Principales países productores de maíz.

| Países | Millones de Toneladas |
|--------------------------------|-----------------------|
| Estados Unidos de Norteamérica | 273.83 |
| China | 208.13 |
| Brasil | 71.29 |
| Argentina | 25.7 |

| | |
|------------------|-------|
| México | 22.06 |
| India | 21.06 |
| Ucrania | 20.96 |
| Indonesia | 19,37 |
| Francia | 15.61 |
| Sudáfrica | 12.5 |

(FAO, 2012)

7.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE MAIZ

Tabla 4. Factores que afectan el cultivo de maíz.

| Factores climáticos o geográficos | Factores del suelo | Factores del cultivo y de su manejo |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Precipitación <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cantidad ✓ Distribución • Temperatura • Humedad relativa • Radiación solar <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cantidad ✓ Intensidad ✓ Duración • Altitud/ Latitud • Viento | <ul style="list-style-type: none"> • Característica del suelo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Físicas <ul style="list-style-type: none"> Textura Estructuras Profundidad ✓ Químicas <ul style="list-style-type: none"> Materia orgánica pH saturación de base contenido de nutrientes • manejo del suelo <ul style="list-style-type: none"> ✓ preparación ✓ nivelación ✓ drenaje | <ul style="list-style-type: none"> • especie, variedad calidad de la siembra • fecha de siembra • profundidad de siembra • población de plantas • distribución espacial: distancia entre y sobre las hileras • maleza • nutrición y fertilización • riesgo • plagas • enfermedades • cosecha. |

- Condiciones climáticos.

El maíz requiere una temperatura de entre 24.4 a 35.6°C., siendo una media de 32 °C la temperatura ideal para lograr una óptima producción. Requiere bastante cantidad de luz solar, bajando sus rendimientos en los climas húmedos. La temperatura debe estar entre los 15 a 27 °C para que se produzca la germinación en la semilla. Puede soportar una temperatura mínima de 8 °C y máximas de 39°C, pero a partir de los 40°C pueden aparecer problemas serios debido a mala absorción de nutrientes y una baja polinización.

En el período de fructificación la planta requiere temperaturas de 20 a 32 °C. El clima ideal para el maíz, es un ambiente con días soleados, noches frescas, temperaturas y vientos moderados.

Los vientos fuertes pueden ocasionar volcamiento de las plantas, por lo que es necesario construir rompe vientos. Los vientos calientes y secos pueden provocar la desecación de los cabellos de la mazorca de maíz. (Parsons, 1987)

- Adaptación

El maíz posee buen desarrollo vegetativo que puede alcanzar hasta los 5 metros de altura en altitudes superiores a los 1,000 metros sobre el nivel del mar (msnm).

- Suelo

El maíz se adapta a una amplia variedad de suelos donde puede producir buenas cosechas, si se emplean los cultivares adecuados y técnicas de cultivo apropiadas.

En general, los suelos más idóneos para el cultivo del maíz son los de textura media (francos), fértiles, bien drenados, profundos y con elevada capacidad de retención para el agua.

El maíz, en general, crece bien en suelos con pH entre 5.5 y 7.8. Fuera de estos límites suele aumentar o disminuir la disponibilidad de ciertos elementos y se produce toxicidad o carencia. Cuando el pH es inferior a 5.5 a menudo hay problemas de toxicidad por aluminio y manganeso, además de carencia de fósforo y magnesio; con un pH superior a 8 (o superior a 7 en suelos calcáreos), tiende a

presentarse carencia de hierro, manganeso y zinc. Los síntomas en el campo, de un pH inadecuado, en general se asemejan a los problemas de micro nutrientes.

- Riego

La falta de agua es el factor más limitante en la producción de maíz en las zonas tropicales. Cuando hay estrés hídrico o sequía durante las primeras etapas (15 a 30 días) de establecido del cultivo puede ocasionar pérdidas de plantas jóvenes, reduciendo así la densidad poblacional o estancar su crecimiento.

Sin embargo, el cultivo puede recuperarse sin afectar seriamente el rendimiento. Cerca de la floración (desde unas dos semanas antes de la emisión de estigmas, hasta dos semanas después de ésta) el maíz es muy sensible al estrés hídrico, y el rendimiento de grano puede ser seriamente afectado si se produce sequía durante este período.

En general, el maíz necesita por lo menos de 500 a 700 mm de precipitación bien distribuida durante el ciclo del cultivo.

7.4. PLAGAS Y ENFERMEDADES DEL CULTIVO DE MAIZ

7.4.1. Principales plagas.

Estos insectos son considerados plagas de primera importancia, porque pueden atacar granos de maíz, hojas, raíz y tallos, ya que son dañinos cuando son abundantes y bajo condiciones ambientales especiales, como falta de higiene, alto contenido de humedad del grano, altas temperaturas.

- *Phyllophaga* spp.

Larva: gallinita ciega

El daño lo ocasiona al endospermo de las semillas germinadas, los puntos de crecimiento y en ocasiones también barrenan el tallo de plántulas.

Ciclo de vida: La larva mide de 3-5 mm de diámetro, color blanco y de apariencia gruesa, apoda (sin patas), cabeza



Figura 4. Larva gallinita ciega

pequeña anaranjada. Adulto de 4 mm de largo, alargado, café oscuro, pronoto y élitros (alas) densamente de foso y cerdas cortas, rostro cortó. Su daño se incrementa bajo condiciones secas, así como en áreas que ha sido inundada durante la época de humedad. El daño se produce por manchones o parches y cuando se detecta tardíamente el control del insecto no resulta efectivo.

- *Diatraea* spp.

Barrenadores de tallo

La especie más importante es *D. lineolata*, cuyo daño se presenta en el cogollo de la planta que la predisponen al acame.

Ciclo de vida: huevo amarillo, como escama, desarrolla una banda roja antes de la eclosión. La larva pasa por siete estadios. Color blanco con parches distintos negros a café en cada segmento, empupan en la galería que han abierto en el tallo. Al final de la estación de lluviosa las larvas suspenden su desarrollo y entran en un periodo de diapausa que se prolonga durante toda la estación seca.



Figura 5.
Barrenador de tallo

- *Spodoptera frugiperda*.

Gusano cogollero.

El Gusano Cogollero es una de las plagas más comunes en los cultivos de granos. Se debe controlar cuando se observan altas poblaciones ya que podrían destruir más de un 25% del follaje.



Figura 6. Gusano cogollero.

- *Dalbulus maydis*.
Chicharrita del maíz.

Su importancia está relacionada con su forma de alimentación (chupador) y su capacidad de transmitir dos enfermedades distintas con sintomatología parecida, que muestran los síntomas, cuatro a seis semanas después de la infección. El daño es causado por los adultos y las ninfas. El síntoma principal de esta enfermedad consiste en un enanismo de las plantas afectadas, especialmente cuando se enferma jóvenes.



Figura7.Chicharrita del maíz.

- *Eriophyes tulipae*
Ácaros (acarina)

Se localiza entre las vainas de la hoja y dentro de la mazorca de maíz, sobre los granos y por debajo de estos. Se disemina principalmente por el viento, material vegetativo, granos, mazorcas, utensilios o personas que entran al cultivo, no constituye un problema severo en el maíz.

- *Agriotes spp.*
Gusano Alambre

Al revisar minuciosamente el suelo, alrededor de las semillas o plántulas dañadas podría encontrar gusanos delgados, cilíndricos y segmentados que al nacer son suaves y blancos y de unos 10 milímetros de largo; cuando están completamente desarrollados miden 40 milímetros y son brillantes, lisos y duros, pero flexibles, de movimientos lentos y



Figura 8. Gusano Alambre

de color amarillo o café. Su daño se identifica al observar áreas del cultivo sin plántulas o plantas marchitas y con macollos, con la base de los tallos lesionados. Las plantas mayores presentan sus raíces cortadas o taladradas. Infestaciones intensas de estos gusanos reducen el sistema radicular y provocan el acame de las plantas.

7.4.2. PRINCIPALES ENFERMEDADES

Las principales enfermedades que afectan el cultivo del maíz son de origen fungoso, que se encuentran diseminadas en todo el país, y su aparición está sujeta a las condiciones ambientales que favorezcan la infección y multiplicación del patógeno, así como la fuente de inóculo y la susceptibilidad de los genotipos.

- **Mancha café (peca)**

Physoderma maydis

Esta enfermedad ocurre normalmente en áreas de precipitación pluvial abundante y altas temperaturas. Ataca las hojas, las vainas, los tallos y, en ocasiones, incluso las brácteas externas.

Los primeros síntomas aparecen en la lámina foliar y consisten en pequeñas manchas cloróticas dispuestas en forma de bandas alternas de tejido sano y enfermo. Las manchas en la nervadura central son circulares, de color café oscuro, en tanto que las lesiones en las láminas son sólo manchas cloróticas. Los nudos y los entrenudos muestran también lesiones de color café. En infecciones graves las manchas se fusionan y ocasionan la pudrición del tallo y acame.

- **Mildiús vellosos (cenicillas)**

Existen varias especies de los géneros

Peronosclerospora, *Sclerospora* y *Sclerophthora*

Estas enfermedades constituyen un problema serio para los productores de maíz de varios países de Asia, África y el Continente Americano. La expresión de los síntomas depende en gran medida de la edad de la planta, la especie del patógeno y el medio ambiente. Generalmente se observa un bandeo clorótico o síntomas parciales en las hojas y las vainas, y enanismo. El mildiú veloso devuelve más conspicuo cuando aparece un crecimiento veloso (cenicilla) sobre o bajo la superficie de las hojas. Esta condición es el resultado de la formación de conidios, lo cual ocurre por lo general en las primeras horas de la mañana.

La enfermedad es más común en regiones cálidas y húmedas. Algunas especies que causan el mildiú veloso inducen también malformaciones de la espiga (panoja), lo cual obstruye la producción de pánicula y la formación de mazorcas. Las hojas pueden ser angostas, gruesas o anormalmente erectas.

- **Roya por *polysora***

Puccinia polysora

Comparadas con las pústulas producidas por *P. sorghi*, las de *P. polysora* son más pequeñas, de color más claro (anaranjado claro) y más circulares. Aunque también se las encuentra en ambas caras de las hojas, la epidermis permanece intacta por más tiempo que cuando se trata de *P. surgí*. Las pústulas se tornan de color café oscuro a medida que las plantas se acercan la madurez. No se conoce al hospedante alternativo de este hongo. La roya sureña, como también se llama esta roya, es común en los climas cálidos y húmedos de las tierras bajas del trópico.

- **Roya tropical**

Physopella zae

Los brotes de esta enfermedad son esporádicos y restringidos a las regiones tropicales del Continente Americano. La forma de las pústulas varía de circular a ovalada; son pequeñas y se las encuentra debajo de la epidermis. En el centro de la pústula la lesión es de color blanco a amarillo claro y presenta un orificio. La pústula está a veces rodeada de un borde de color negro, pero su centro continúa siendo claro. No se conoce hospedante alternativo de este hongo.

- **Carbón de la espiga**

Sphacelotheca reiliana

El carbón de la espiga puede ocasionar daños económicos significativos en zonas maiceras tanto secas y cálidas como de altitud intermedia y clima templado.

La infección es sistémica, lo cual significa que el hongo penetra las plántulas y se desarrolla dentro de las plantas sin que éstas muestren síntomas, hasta que llegan a la floración y la emisión de estigmas.

Los síntomas más conspicuos son: a) el desarrollo anormal de las espigas (panojas), que se deforman y crecen excesivamente; b) la formación de masas negras de esporas en algunas florecillas macho, y; c) el desarrollo de masas negras de esporas en lugar de mazorcas, que dejan al descubierto los haces vasculares desgarrados.

Pudriciones de mazorca por *Gibberella* y *Fusarium*

Fusarium graminearum (sin. *F. roseum*)

(Teleomorfo: *Gibberella zeae*)

Fusarium moniliforme, sin. *F. verticillioides*

(Teleomorfo: *Gibberella fujikuroi*)

En el maíz, estas dos especies de hongos provocan pudrición de mazorca y de tallo, y tizón en las plántulas. *Gibberella zeae*, el estado sexual del patógeno, es más común en las zonas frías y húmedas.

Los primeros signos de la infección son la formación de micelios blancos, que van descendiendo desde la punta de la mazorca y dan una coloración rojiza y rosada a los granos infectados. El hongo produce micotoxinas (conocidas como deoxinivalenol, zearalenona y zearalenol) que son tóxicas para varias especies animales. La pudrición por *Fusarium moniliforme* es probablemente el patógeno más común de la mazorca de maíz en todo el mundo. A diferencia de *G. zeae*, el daño que causa *F. moniliforme* se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas de la mazorca. Los granos infectados desarrollan

un moho algodonoso o rayas blancas en el pericarpio y germinan estando aún en el olote. Por lo general, las mazorcas invadidas por barrenadores del tallo son infectadas por *Moniliforme*. El hongo produce micotoxinas conocidas como fumonisinas, que son tóxicas para algunas especies animales.

7.5. LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA DE ASFALTO DEL MAIZ

7.5.1. AGENTES CAUSALES

El Complejo de mancha de asfalto es una enfermedad producida por la interacción sinérgica de tres hongos: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae*.

- *Phyllachora maydis* es un parásito obligado.
- Las ascosporas de *Monographella maydis* pueden sobrevivir en restos de cosecha por tres meses o más. Lo cual puede ser suficiente para asegurar una fuente de inóculo primario. Requiere la presencia de *P. maydis* para ser patogénico.
- *Coniothyrium phyllachorae*, es un hiperparásito de los hongos anteriores, que le confiere una textura ligeramente áspera al tejido necrótico.

Ocurre con mayor frecuencia en zonas frescas y húmedas, especialmente en campos que se encuentran cerca de las riberas o en suelos que acumulan mucha humedad y tienden a inundarse.

7.5.2. DESARROLLO Y SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD

Esta enfermedad se presenta en zonas relativamente frescas y húmedas, tanto en el trópico como el subtrópico situados de 1,300 a 2,300 metros sobre el nivel del mar.

➤ *Phyllachora maydis*.

La enfermedad comienza cuando *P. maydis* infecta la planta producen lesiones oscuras pequeñas (con 0.5 a 2.0 mm de diámetro), ovaladas o redondas en las

hojas, brillantes, ligeramente abultadas y forma estrías de hasta 10 mm de largo, la infección pasa rápidamente a las hojas superiores y a otras plantas.

➤ ***Monographella maydis*.**

Dos o tres días después de formadas las lesiones por infección de *P. maydis*, éstas son invadidas por *M. maydis*, hongo que forma un halo elíptico de color verde claro alrededor de cada lesión de *P. maydis* de 1 a 4 mm de tamaño; esto da como resultado el típico síntoma “ojo de pescado” del complejo de mancha de asfalto.

Las lesiones que producen los dos patógenos que causan el complejo comienzan a desarrollarse en las hojas inferiores antes de la floración y, si el ambiente es propicio, la infección continúa hacia arriba afectando incluso las hojas más jóvenes, estas lesiones necróticas pueden llegar a fusionarse y provocar la quemadura completa del follaje. Las mazorcas de las plantas afectadas son muy livianas y tienen granos flojos que no alcanzan a compactarse; muchos de los granos en la punta germinan prematuramente, mientras aún están en el olote.

Escala de daño en la hoja

Escala 1

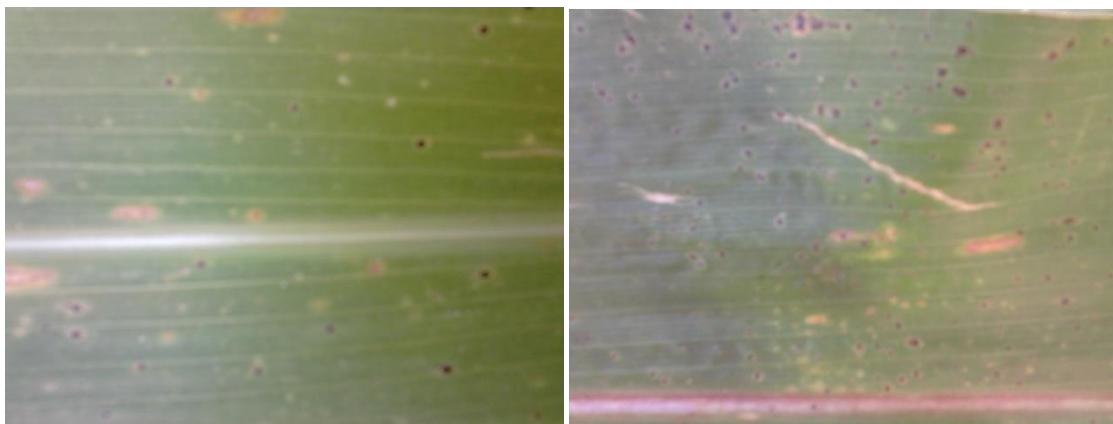


Figura 9. Foto tomada en el INIFAP en la escala 1, presencia de *Phyllachora maydis*.

Aparecen pequeños puntos negros brillantes, ligeramente elevados (apariencia de asfalto) sobre el haz de las hojas inferiores. En esta fase la enfermedad puede pasar desapercibida.

Escala 2



Figura 10. Foto tomada en el INIFAP en la escala 2, presencia de *Phyllachora maydis*, iniciando *Monographella maydis*.

Dos a tres días después de la aparición de las manchas negras se comienzan a observar alrededor de ellas unas manchas o halos de tejido muerto de color marrón.

Escala 3

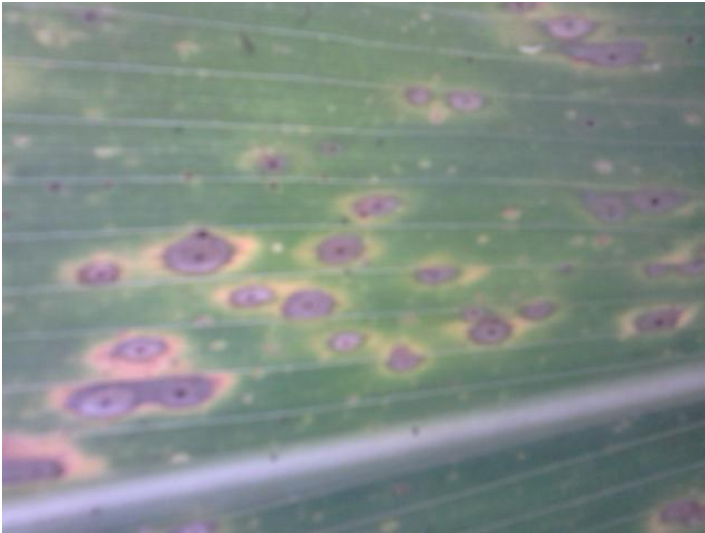


Figura 11. Foto tomada en el INIFAP en la escala 3, presencia de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* conocido como mancha de asfalto.

Las manchas de color marrón proliferan en las hojas y llegan a unirse entre sí, formando extensas áreas de tejido muerto. El tejido se necrosa desde el extremo superior de la hoja hacia su base.

Escala 4



Figura 12. Foto tomada en el INIFAP en la escala 4, presencia de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, provocando el secamiento de las hojas.

Transcurridas las primeras dos a tres semanas de la aparición de los primeros puntos negros, las áreas de tejido muerto cubren toda la hoja.

7.5.3 TAXONOMÍA DE LA MANCHA DE ASFALTO

Tabla 5. Taxonomía de *Phyllachora maydis*.

| <i>Phyllachora maydis</i> | |
|----------------------------------|------------------------|
| Reino | <i>Fungi</i> |
| Phyllum | <i>Ascomycota</i> |
| Clase | <i>Sordariomycetes</i> |
| Orden | <i>Phyllachorales</i> |
| Familia | <i>Phyllachoraceae</i> |
| Genero | <i>Phyllachora</i> |
| Especie | <i>Maydis</i> |
| Autor | Maubl. 1904 (963 sp) |

Tabla 6. Taxonomía de *Monographella maydis*.

| <i>Monographella maydis</i> | |
|------------------------------------|-------------------------|
| Reino | <i>Fungi</i> |
| Phyllum | <i>Ascomycota</i> |
| Clase | <i>Sordariomycetes</i> |
| Orden | <i>Xylariales</i> |
| Familia | - |
| Genero | <i>Monographella</i> |
| Especie | <i>Maydis</i> |
| Autor | E. Müll a Samuels. 1984 |

7.5.4 IMPORTANCIA ECONOMICA.

Aunque son muchas las enfermedades de origen fungoso que afectan el follaje del maíz, una de las más importante es el complejo de la mancha de asfalto por su incidencia y severidad se consideran de importancia económica.

El complejo de la mancha de asfalto fue reportado por primera vez en México y se le ha observado mayormente en zonas de 1,300 a 2,000 metros sobre el nivel del mar, pero también en zonas productoras de maíz tropicales y subtropicales. Se considera que esta enfermedad tiene importancia económica en más de 800,000 ha de los estados de Jalisco, Michoacán, Nayarit, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. También causa pérdidas de la productividad de grano y de la calidad del forraje. Cuando la infección ocurre antes de la floración, las pérdidas de grano y forraje en germoplasma de maíz muy susceptible pueden llegar al 100% y si la enfermedad incide después de la floración el rendimiento puede disminuir en 50 % debido principalmente a que el grano no completa su desarrollo y resulta con menor peso específico.

7.6. RESISTENCIA GENETICA DE VARIEDADES DE MAIZ

El término resistencia, ha ocasionado una diversidad de discusiones al homologarlo con tolerancia; sin embargo, desde nuestro particular punto de vista, el concepto tolerancia define la interacción de manera muy general, mientras que, el concepto resistencia, permite, no solo definir la interacción del patógeno con el hospedero, sino que, definir la calidad y el nivel de la interacción.

- Susceptibilidad: cuando una planta posee la cualidad de convertirse en sede de una infección, es decir, servir de hospedador a un patógeno.
- Patogenicidad: cuando un organismo patógeno, es capaz de penetrar, infectar y originar en la planta, los síntomas característicos de la enfermedad.
- Tolerancia: una planta es tolerante cuando el patógeno puede penetrar pero no aparece infección ni síntomas o son insensibles.

- Resistencia: Concepto opuesto a la susceptibilidad, es la propiedad de una planta para oponerse, parcial o totalmente, a la penetración, la infección y aparición de síntomas. Capacidad que tiene un organismo para superar, total o en cierto grado, el efecto de un patógeno u otro factor perjudicial.
- Naturaleza de la resistencia: De acuerdo a su naturaleza, la resistencia puede ser natural, o inducida, de acuerdo si proviene de factores genéticos o está generada externamente por el ambiente.

Expresión de la resistencia: de acuerdo al momento de aparición de la enfermedad y a su expresión en el tiempo, la resistencia puede ser:

- Resistencia vertical: cuando las plantas resisten de manera contundente a una o pocas razas del patógeno, se dice que en relación a la cronología de aparición de las razas del patógeno, esta retarda la aparición de la enfermedad.
- Resistencia horizontal: Se reconoce como resistencia parcial o de campo y se considera efectiva contra todas las razas de un patógeno, se dice que actúa retrasando la velocidad de incremento de la enfermedad.

Por lo tanto para prevenir pérdidas de rendimiento hay que conseguir y sembrar semilla de variedades resistentes a la Mancha de Asfalto. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha generado varios híbridos resistentes (H-377, H-318, H-562, y H-563). (González, 2005).

H-563

Tiene hojas semihorizontales de color verde oscuro. Su floración masculina en el ciclo agrícola P-V ocurre a los 61 dds, y 2 d después es la femenina. Su planta tiene una altura promedio de 257 cm y a la mazorca de 116 cm. Su espiga es semiabierto con 11 a 17 ramas laterales primarias, y sus estigmas son de color rosa con fondo verde claro. Su mazorca es gruesa y cilíndrica, de 17 a 20 cm de longitud y con excelente cobertura por las brácteas, de tamaño medio con 16 a 18 hileras rectas y 34 a 40 granos por hilera. Su grano es de color blanco con textura

semicristalina. se adapta a climas tropicales y del subtrópico bajo. Se puede sembrar en regiones cálidas y semicálidas desde Sinaloa hasta Chiapas por la costa del Pacífico, y desde Tamaulipas hasta Yucatán por la vertiente del Golfo de México, así como en los Estados de México y Morelos.

Este híbrido es tolerante al complejo “Mancha de asfalto”, pues en evaluaciones efectuadas durante 2002 y 2003 P-V en cuatro localidades de Guerrero, se estimaron daños de 26.3 % en el rendimiento de grano de los híbridos comerciales testigo, mientras que el ‘H-563’ únicamente presentó 2.7 % de daños en la mazorca. Resultados similares se obtuvieron en parcelas de validación efectuadas en el ciclo P-V del 2004, donde los testigos comerciales presentaron daños de mazorca que variaron de 45.4 a 60.9 %, mientras que el ‘H-563’ presentó daños del orden de 3.6 %. Su resistencia a la enfermedad se refleja en un menor daño foliar durante la incidencia de la “Mancha de asfalto”. (Marino, 2008)

7.7. TECNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES EN PLANTAS

7.7.1. ANALISIS PROTEOMICO

Proteoma hace referencia al conjunto completo de proteínas que se expresan a partir del genoma de una célula o tejido en un determinado momento. La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma (Proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas. La Proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos.

La proteómica se está aplicando en la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en al patogenia de enfermedades y el análisis de procesos de transducción de señales. El Proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre la célula, si se encuentra en una situación de estrés, bajo el efecto de fármacos o de una hormona. Así, en cada momento y en cada tipo celular el perfil de proteínas expresadas será diferente. La proteómica es útil para estudiar estas diferencias. Existen tres ramas en la proteómica que tratan de caracterizar el Proteoma estudiando distintos aspectos del mismo (FIBAO, 2007).

7.7.2. TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Electroforesis bidimensional (2D)

Actualmente, no hay ninguna otra técnica la cual sea capaz de resolver simultáneamente miles de proteínas en un procedimiento de separación, la mejora mas prometentes en la electroforesis (2-D) resulta de los geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG strip por sus siglas en ingles). La identificación de proteína a partir de geles de poliacrilamida ofrece ventajas importantes comparada con la

aplicación libres de gel ya que remueve la impurezas de bajos pesos molecular, incluyendo detergente y componentes de soluciones amortiguadoras, los cuales frecuentemente perjudican la identificación por espectrometría de masa, otra ventaja es que la matriz de poliacrilamida es un contenedor seguro para manipular, derivatizar y archivar cantidades hasta de fentomoles de proteínas (Shevchenko, 2006)

Carga eléctrica intrínseca (IEF)

Las proteínas son separadas en base a su carga eléctrica intrínseca. En un IEF, las proteínas se desplazan bajo un campo eléctrico a través de un gel de poliacrilamida, en el que se ha creado con un gradiente de pH por medio de unas moléculas denominadas anfólitos. Las proteínas migran a través del gel hasta alcanzar la zona de pH de igual valor a sus puntos isoeléctricos (pI), donde adquieren carga neta neutra y dejan de ser atraídas por los polos eléctricos del sistema electroforético. Así, las proteínas se separan en función de su pH, (FIBAO, 2007).

Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una micro-técnica analítico que nos permite conocer el peso molecular y bajo ciertas condiciones, la información estructural de un compuesto. Por lo tanto, se utiliza para identificar compuestos desconocidos o elucidar la estructura las propiedades químicas de las moléculas con ventajas de necesitar pequeñas cantidades de muestras (10^{-12} a 10^{-11} moles de un compuesto de 1000 Da de masa). Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masa y un detector que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fases gaseosas.

La espectrometría de masas ha sido usada en fitopatología y ha demostrado su uso para la identificación de virus mejor que para cualquier otro patógeno. (Padliya y Cooper, 2006)

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)

La proteína objeto de análisis es fragmentada en péptidos con proteasas específicas (generalmente, la tripsina) antes de ser aplicada al espectrómetro de masas. Los péptidos son incluidos en una matriz acrílica. Un pulso láser impacta sobre la matriz, volatilizando e ionizando los péptidos que contiene. Los péptidos se introducen en el MS, se aceleran a través de un campo electromagnético y vuelan hasta llegar a un detector. Según la relación masa-carga (m/z) del péptido tardará más o menos tiempo en llegar al detector. Como resultado, el detector registrará un espectrograma denominado mapa peptídico, exclusivo y característico de la proteína analizada. El mapa peptídico se somete a análisis comparativo con miles de mapas peptídicos teóricos almacenados en las bases de datos on line. Si coincide con algún mapa teórico, la identificación es positiva (Moral 2008).

ESI-MS o MS/MS

En el caso de no obtener la identificación de la proteína por medio de MALDITOF, se puede recurrir al ESI-MS (electro-spray ionisation mass spectrometry) que permite secuenciar los aminoácidos de un péptido. En este caso, los péptidos procedentes de la digestión con tripsina suelen ser separados previamente por microcromatografía de alta resolución. Se selecciona un pico cromatográfico (el pico cromatográfico no tiene por qué corresponder a un solo tríptico, puede estar compuesto por un conjunto de trípticos) y se dirige hacia el MS. La salida del sistema cromatográfico se realiza a través de un spray altamente electrificado, que permite ionizar a los trípticos. Estos entran al sistema de detección de iones, generalmente, compuesto por dos espectrómetros de masas en tandem, por lo que a este sistema también se le denomina masas-masas (MS-MS). El primer MS resuelve cuantos trípticos diferentes hay en la muestra que se ha introducido. Se selecciona un determinado tríptico al que se le permite el paso a una cámara, donde la colisión con moléculas de un gas inerte (por ejemplo, argón) va a

producir una subfragmentación aleatoria del péptido original (CID, collision-induced dissociation). Se genera así una colección de fragmentos consistente en aminoácidos libres, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, etc. Los fragmentos entran en el segundo MS, donde son separados por campos electromagnéticos hasta llegar al detector. La interpretación global de los subpéptidos detectados permite resolver la secuencia del péptido original analizado. Por tanto, este método permite identificar proteínas no representadas en las bases de datos genómicas, así como permite detectar modificaciones post-traduccionales (Moral 2008).

Otros elementos tecnológicos asociados al estudio de proteómicos

Para analizar y comparar los resultados entre proteómicos, generalmente se utiliza un escáner para digitalizar la imagen del gel y sistema de análisis computarizado. Para tomar una muestra del gel con precisión, se recurre a un sistema robotizado que “pica” una porción de gel en las coordenadas que se le indican por ordenador. Otros elementos pueden ser un sistema formador de matrices con los fragmentos peptídicos, o sistemas de micropurificación que separan e identifican los péptidos tripticos y los dirige hacia el ESI-MS.

La captura por microdissección laser (LCM) permite seleccionar, recortar y extraer a partir de tejidos aquellas células de interés y poder hacer estudios proteómicos precisos (Moral 2008).

7.7.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Dodecil-sulfato de sodio electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica para la separación de proteínas en función de su capacidad de moverse dentro de una corriente eléctrica, que es una función de la longitud de sus cadenas de polipéptidos o de su peso molecular. Esto se logra mediante la adición de detergente SDS para eliminar estructuras de proteínas secundarias y terciarias y para mantener las proteínas como cadenas polipeptídicas. Las capas de SDS las proteínas, sobre todo proporcionales a su peso molecular, y confiere la

misma carga eléctrica negativa a través de todas las proteínas en la muestra. Las proteínas glicosiladas pueden no migrar en su peso molecular esperado ya que su migración se basa más en la masa de sus cadenas de polipéptidos, no los azúcares que se adjuntan (Sambrook et al, 1989).

Es el segundo paso en el proceso de la electroforesis 2D. El gel IEF desarrollado anteriormente se coloca sobre un gel de poliacrilamida con SDS (Dodecil-sulfato de sodio). Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas migrarán hacia el polo positivo introduciéndose en el gel SDS-PAGE. El SDS determina que todas las cadenas peptídicas tengan igual relación carga/masa, por lo que éstas se diferencian entre sí por su peso molecular. La porosidad del gel determina que las proteínas se separen en función de su tamaño. Las más pequeñas migrarán a mayor velocidad que las grandes y el recorrido a través del gel será mayor (Sambrook et al, 1989), (Thermofisherscientific, 2014).

El sistema de gel más ampliamente utilizado para la separación de una amplia gama de proteínas por SDS-PAGE es el sistema de Laemmli (1970), que utiliza geles de Tris-glicina que comprenden un componente de gel de apilamiento (que se utiliza para ayudar a enfocar las proteínas en bandas nítidas a partir de la corrida electroforética) y el gel de resolución, donde se utilizan porcentajes variables de gel de acrilamida para separar las proteínas en función de su peso de la masa. Este sistema clásico usa un sistema tampón discontinuo en el que el pH y la fuerza iónica del tampón utilizado para ejecutar el gel (Tris pH 8,3) es diferente de los tampones usados en el gel de apilamiento (Tris, pH 6,8) y gel de resolución (Tris, pH 8,8).

El pH de operación altamente alcalina del sistema de Laemmli puede causar distorsión de la banda, la pérdida de resolución, o bandas de artefactos. Finalmente las principales causas de la mala resolución banda con el sistema de Laemmli son:

- La hidrólisis de poliacrilamida al pH de lavado de gel, lo que resulta en una vida útil corta de 4-6 semanas.

- Las modificaciones químicas tales como desaminación y de alquilación de las proteínas debido al alto pH de la separación de gel.
- La reoxidación de disulfuros reducidos de cisteína que contiene en proteínas como el estado redox del gel no es constante.
- La escisión de Asp-Pro enlace de las proteínas cuando se calienta a 100 ° C en el tampón de muestra de Laemmli, pH 5,2 (Thermo Fisher científico, 2014).

Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Para detectar las proteínas en un gel de poliacrilamida existen varios métodos, por ejemplo: tinción con colorantes orgánicos (por ejemplo: azul Coomassie), tinción con plata, o tinción con compuestos fluorescentes.

8. PROCEDIMIENTO.

8.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se sembraron dos surcos en el invernadero por cada genotipos, uno susceptible (DK-357) y otro tolerante (H-563), se recolecto muestra para inocular las plantas y al igual se llevaron unas plantas en lugares donde se encontraba con mayor severidad la enfermedad, tales como Ignacio Zaragoza del municipio de Ocozocoautla de Espinosa, donde estuvieron unas semanas; como iban creciendo las plantas se observaba la aparición de *Phyllachora maydis* produciendo lesiones oscuras pequeñas, la infección pasa rápidamente a las hojas superiores y a otras plantas. Dos o tres días después de formadas las lesiones por infección de *Phyllachora maydis*, éstas son invadidas por *Monographella maydis*, hongo que forma un halo elíptico de color verde claro alrededor de cada lesión de *Phyllachora maydis*.

8.2. ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO

Para la extracción de proteína se colectaron de diferentes etapas de la enfermedad iniciando con plantas sanas, hasta que la enfermedad haya cubierto toda la hoja provocando el secamiento de la planta, donde se le agrego buffer de extracción y se incubo 4h a 4 °C, para corre las muestra se le agrego laemmlí 1x y se incubo 5 min a 95 °C, se corrió la muestra por la técnica de electroforesis SDS-PAGE se realizo en el Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el Laboratorio de Sanidad vegetal.

8.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se sembraron plantas de maíz en el invernadero de los dos genotipos D-357 y H-563, se implemento el siguiente diseño experimental con la finalidad de evaluar la resistencia y el perfil proteómico de la planta de maíz, consta de las siguientes etapas:

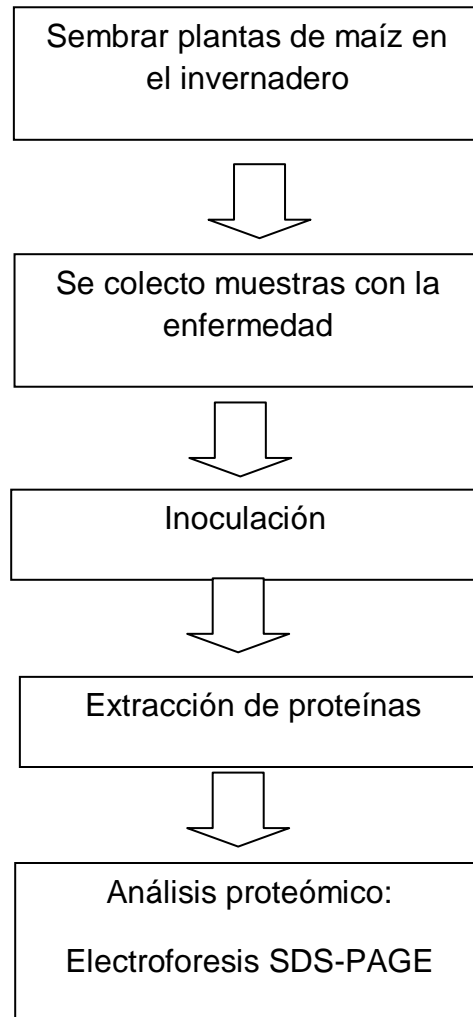


Figura 13. Diseño experimental.

8.2.2. TRATAMIENTOS

1. Aplicación de fungicida.

Se le aplico fungicida “manzate” a las plantas de cada genotipo de maíz. Se peso 22.5 gr en 3 L, se le aplico sobre la planta. Su aplicación se daba cada mes.

2. Inoculación.

2.1 Preparar el extracto de inóculo para las plantas.

- cortar 50 lecciones de hongo, triturar, agregar 10 ml de agua destilada y colar el extracto.

- Observar en el microscopio por medio de la cámara de Neubauer y hacer el conteo de las esporas, y obtener la concentración de la suspensión.
- Se Inocularon aproximadamente 25×10^8 células a cada plantas del invernadero.

2.2 Otro método de inoculación.

Para que las plantas se infectaran se llevaron en lugares donde se encontraba con mayor severidad la enfermedad, tales como Ignacio Zaragoza del municipio de Ocozocoautla de Espinosa, donde estuvieron unas semanas. Después de la semana se sembraron en el invernadero.

8.2.3. UNIDAD EXPERIMENTAL

Las plantas de maíz se sembraron en botes de unicell con abono orgánico donde estuvieron un mes después se sembraron en surcos, previamente tratado el suelo. Se realizaron dos surcos de 15 plantas por cada genotipo.

8.2.4 VARIABLES DE ESTUDIO

Para evaluar la resistencia de la severidad de la enfermedad de cada genotipo se tomaron las plantas de en medio de los dos surco. En la planta se lee el porcentaje de área foliar afectada en la hoja bajera y la hoja de intersección de la mazorca (hoja bandera).

Para medir el porcentaje de área foliar afectada se tomo de acuerdo al número de lesiones, así como ilustra la figura:

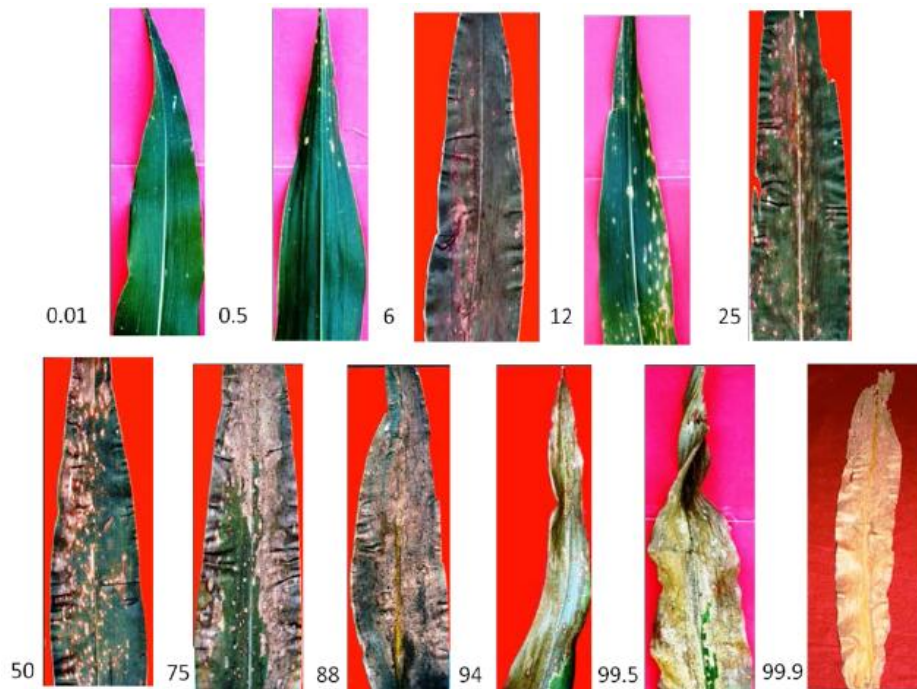


Figura 14. Porcentaje de área foliar afectada para la toma de datos de las severidades causadas por las enfermedades del maíz a la Mancha de Asfalto.

A continuación se muestra los datos tomados de la severidad durante 9 semanas, se midió el porcentaje de daño en el área foliar causada por la enfermedad en los dos genotipos, evidentemente en el genotipo DK-357 fue más afectado lo cual es un genotipo susceptible, mientras el genotipo H-563 aun por ser tolerante a la enfermedad podemos observar que al igual fue afectado en menor severidad.

Tabla 7. Datos de la severidad causada por la enfermedad en los dos genotipos de estudio.

| Datos de la severidad causada por la enfermedad mancha de asfalto (%) | | |
|---|-----------|-------|
| semanas | Genotipos | |
| | D-357 | H-563 |
| 1 | 0.1 | 0 |
| 2 | 1 | 0.1 |
| 3 | 5 | 1 |
| 4 | 20 | 6 |
| 5 | 25 | 11 |
| 6 | 30 | 15 |
| 7 | 36 | 20 |
| 8 | 40 | 23 |
| 9 | 60 | 30 |

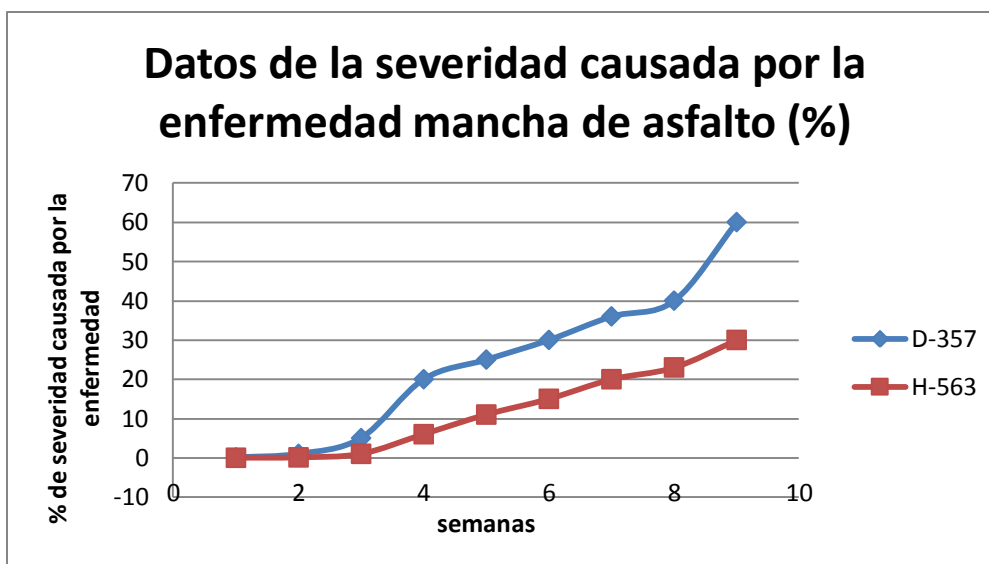


Figura 15. Grafica de la cinética de la severidad causada por la enfermedad mancha de asfalto en los dos genotipos.

8.3 ANALISIS PROTEOMICO

8.3.1. PREPARACION DE MATERIAL

Se pesa 0.5 gr de muestra, previamente pulverizada con ayuda de nitrógeno líquido. Se coloca en un tubo eppendorf donde se adiciono 0.5 ml de solución tampón de extracción [0.1 M de Tris-HCl (pH 8); 0.1% (w/v) de ácido ascórbico; 10% (v/v) de glicerina; 1%(w/v) de polyvinylpolypirrolidona y 5% (w/v) de B-mercaptoetanol], se agita para su posterior incubación a una temperatura de 4°C durante 4 hrs.

Tabla 8.Preparación del Buffer de tampón de extracción.

| Solución. | Cantidad Requerido para el buffer |
|--|--|
| Tris-HCl | 1.21 gr. |
| Acido ascórbico | 0.1 gr. |
| Glicerina | 10 gr. |
| Polyvinylpolypirrolidona | 1 gr. |
| B-mercaptoetanol | 5 ml |
| Se ajusta el pH 8 con HCl y se afora en un matraz de 100 ml | |

De las muestras, se centrifugadas a 15000 rpm durante 1min, y se tomaran 10µl del sobrenadante que se colocaron en un tubo eppendorf mas 10µl de laemmlí 1x y se agitaran vigorosamente. Se lleva a un baño maría a 90°C durante 5min y listo para la corrida del gel de electroforesis.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS METODO SECUNDARIO DE PRUEBA

Se tomaran 0.5g de muestra, se trituraron con la ayuda de nitrógeno líquido dentro de un mortero, la muestra se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1.5mL para adicionar 0.5mL de solución buffer de extracción de proteínas con la cual permaneció 4hr en incubación a 4°C.

De la muestra se tomaron 400µL de sobrenadante, se colocaron en un nuevo tubo y se adicionaron 100µL de solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 40% frío. Se incubó 40min a 4°C una vez terminado el tiempo de residencia se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 15min.

La pastilla formada de la muestra 2 se le adicionaron 100µL de TCA al 10% frío a 4°C, después de 40min de incubación se centrifugó a 15000 rpm durante 15min a 4°C.

Se enjuagó con 25 µL de agua destilada. Se re suspendió la pastilla con 400µL de acetona frío y se incubó a 0°C durante 1 hora. Se centrifugó bajo las mismas condiciones que las anteriores y se decantó. Se adicionó 20µL de Laemmli 1X a la pastilla formada por el precipitado y se incubó durante 5min a 90°C.

Finalmente se tomaron 15µL para correr dentro de los pocillos del gel de electroforesis.

8.3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa (Laemmli 1970).

Para preparación de los geles se utilizo un equipo de soluciones (TGX™ and TGX stain-free™Fastcast, Acrylamide Kit and Starter Kit).

Instrucciones:

Se prepara la solución para el gel de separación acrilamida, combinando volúmenes iguales de resolver A y B.

Tabla 9. Prepara la solución para el gel de separación

| | 1.0 mm mini- PROTEAN Empty cassettes (n=gels) | 0.75 mm Bio-Rad Glass Plates (n=gels) | 1.0 mm Bio-Rad Glass Plates (n=gels) | 1.5 mm Bio-Rad Glass Plates (n=gels) | 1.0 mm Criterion Empty cassettes (n=gels) |
|-----------------------|--|--|---|---|--|
| Resolver A | 3.5 ml * n | 2 ml * n | 3 ml * n | 4 ml * n | 6 ml * n |
| Resolver B | 3.5 ml * n | 2 ml * n | 3 ml * n | 4 ml * n | 6 ml * n |
| TEMED | 3.5 µl * n | 2 µl * n | 3 µl * n | 4 µl * n | 6 µl * n |
| 10% APS | 35 µl * n | 20 µl * n | 30 µl * n | 40 µl * n | 60 µl * n |

Se añade el volumen requerido de TEMED y APS al 10% recién hecho, se combina la solución y se mezcla bien, con la pipeta se verter la solución en el casete, sin dejar burbujas; se llena hasta 0.5–1cm por debajo de la parte inferior del diente del peine.

Preparar el gel de apilamiento acrilamida combinando volumen iguales de la solución Stacker A y B.

Tabla 10. Prepara la solución para el gel de apilamiento.

| | 1.0 mm mini- PROTEAN Empty cassettes (n=gels) | 0.75 mm Bio-Rad Glass Plates (n=gels) | 1.0 mm Bio-Rad Glass Plates (n=gels) | 1.5 mm Bio-Rad Glass Plates (n=gels) | 1.0 mm Criterion Empty cassettes (n=gels) |
|----------------------|--|--|---|---|--|
| Stacker A | 1 ml * n | 1 ml * n | 1 ml * n | 1.5 ml * n | 1.5 ml * n |
| Stacker B | 1 ml * n | 1 ml * n | 1 ml * n | 1.5 ml * n | 1.5 ml * n |
| TEMED | 2 µl * n | 2 µl * n | 2 µl * n | 3 µl * n | 3 µl * n |
| 10% APS | 10 µl * n | 10 µl * n | 10 µl * n | 15 µl * n | 15 µl * n |

Se añade el volumen requerido de TEMED y APS al 10% recién hecho, se combina la solución y se mezcla bien, con la pipeta se verter la solución en el casete hasta lo alto de la placa corta. Aplicar lentamente y constantemente para prevenir la mezcla de solución del gel de separación; alinear e insertar el peine en la caja cuidadosamente para prevenir el aire. Dejar que el gel se polimericé durante 30 a 40 min antes del electroforesis.

Preparación de la cámara de electroforesis:

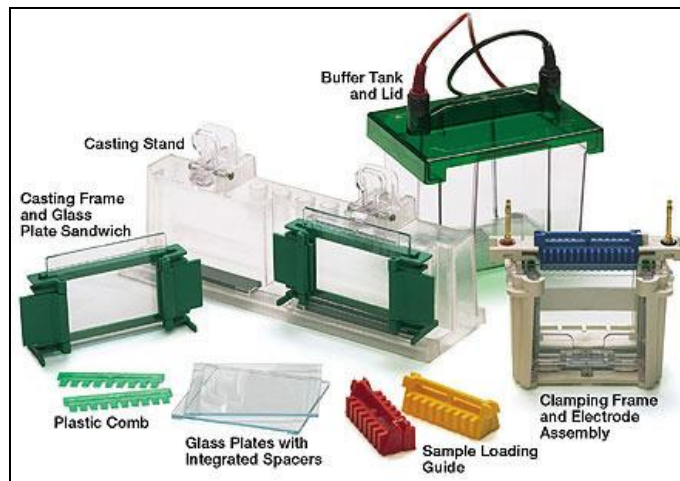


Figura 16. Contenido del equipo de electroforesis SDS-PAGE.

- Primero se limpiaron los vidrios, cuidadosamente con agua y jabón, después se limpiaron con alcohol finalmente se enjuagaron con agua destilada y secaron.
- Ya armado el dispositivo que servirá como molde para el gel, fue llenado con agua destilada para comprobar que no existiesen fugas, después se retiró el agua y se secó.

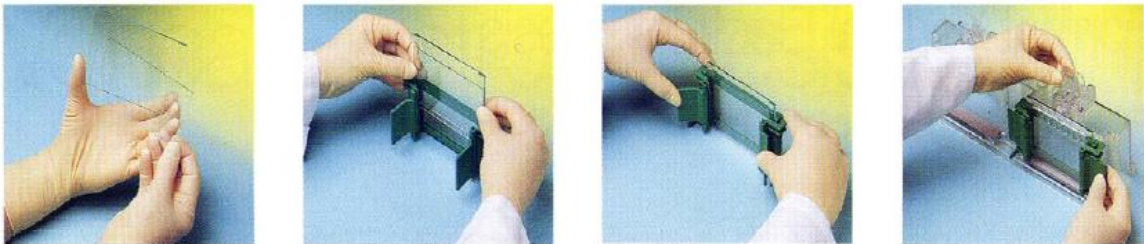


Figura 17. Ensamblado del dispositivo para preparar el gel.

- Utilizando el peine como guía se marcó el nivel al cual debe llegar el gel de separación, fue llenado y dejado para polimerizar aproximadamente durante 30 min una vez seco se procedió a inyectar el gel de apilamiento que va después del gel de separación y se colocó el peine que dio forma a los pocillos.

- Después de que el gel polimerizo se separo el peine y las posas quedaron hechas para cargar las muestras. Posteriormente se coloco la cámara en el soporte y se inserto en la caja de electroforesis, una vez colocada de esta forma se lleno la cámara con la solución amortiguadora de corrida hasta cubrir completamente los pocillos.

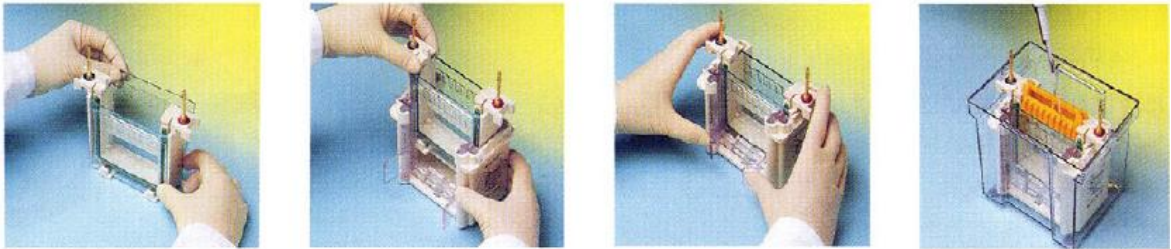


Figura 18. Colocación del gel en soporte e insertar en la caja de electroforesis.

- Se cargaron las posas con 15 μ L de muestra así como también se coloco el marcador de tamaño y el BSA en las mismas cantidades para tener una referencia estándar.
- Las muestras se corrieron a un voltaje de 50 volts durante 15min para el gel de apilamiento y después correrlas a 40 volts por 2 horas y 30 min el gel de separación.
- Se saca cuidadosamente el gel y se coloca dentro de un recipiente donde se agrega una solución para teñir (azul de coomassie G-250 al 0.1%, acido acético al 10%, metanol al 40%, agua destilada) durante 30 min en agitación.
- Para desteñir se agrega 2 o 3 veces la solución (acido acético al 10%, metanol al 40%) hasta que el gel quede limpio, es decir sin dejar colorante.

8.3.3. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS ('SDS polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli (Laemmli (1970), Nature, 277, p. 680). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuros, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.

8.3.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRANDFORD

El método que se utilizó durante estas prácticas se basó en el siguiente principio: se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ac. Fosfórico tienen un color pardo y que al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm. (Brandford 1976).

Para la preparación del reactivo de Bradford se disolvió 100mg de azul de coomassie en 50ml de alcohol al 95%, se añadió 100ml de ácido fosfórico al 85% y se aforo hasta 1L con agua destilada, una vez mezclado se filtro con papel whatman #1.

ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR

Se preparo una solución patrón de proteína con albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2mg/ml (sol. Stock). Para la solución de BSA se disolvieron 20mg de BSA en 10ml de agua estéril.

Se tomaron las siguientes concentraciones de la solución estándar para realizar la curva patrón:

Tabla 11.Concentraciones de la solución estándar para la curva patrón.

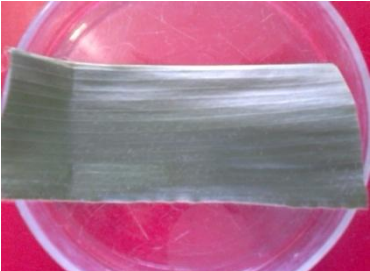
| Concentración (mg/ml) | Volumen sol. Stock (µL) | Vol. De agua (µL) | Vol. Total (µL) | Absorbancia |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------------|
| 0 | 0 | 1000 | 1000 | |
| 1 | 10 | 990 | 1000 | |
| 5 | 50 | 950 | 1000 | |
| 10 | 100 | 900 | 1000 | |
| 15 | 150 | 850 | 1000 | |
| 30 | 300 | 700 | 1000 | |
| 60 | 600 | 400 | 1000 | |





9. RESULTADOS Y DISCUSIONES.




Para evaluar el efecto de la enfermedad en el tejido foliar del maíz se llevo a cabo por el método de extracción de proteína [0.1 M de Tris-HCl (pH 8); 0.1% (w/v) de ácido ascórbico; 10% (v/v) de glicerina; 1%(w/v) de polivinilpirrolidona y 5% (w/v) de B-mercaptoetanol], al extracto de proteína se le agrego laemlli 2X y fueron separadas en un gel desnaturizante (SDS-PAGE) al 12 %. El SDS determina que todas las cadenas polipeptídicas tengan igual relación carga/masa, por lo que éstas se diferencian entre sí por su peso molecular. La porosidad del gel determina que las proteínas se separen en función de su tamaño. Las más pequeñas migrarán a mayor velocidad que las grandes y el recorrido a través del gel será mayor.

En la figura 19 se muestran las proteínas extraídas en diferentes etapas de infección de la enfermedad, de igual manera puede observarse la separación de proteínas de forma correcta y entre las muestras se presenta un patrón electroforético muy homogéneo, las bandas son muy legibles, de buena calidad y se pueden observar proteínas de todo los pesos moleculares, lo cual nos indica que el extracto es una mezcla compleja de proteínas.

Tabla 12. Colocación de la muestra en el gel para la electroforesis a diferentes grado de la enfermedad.

| No. De posos | Muestras | Caracterización de la muestra |
|--------------|----------------------------|--|
| 1 | BCA estandarizado 15µl | BCA estandarizado concentración 1mg/ µl |
| 2 | Marcador 5µl | Precision Plus Protein™ Standards |
| 3 | Planta sana 0.5gr. 15µl |  |

| | | |
|---|---|--|
| 4 | <p>G1 0.5gr. 15µl</p> <p>Aparecen pequeños puntos negros brillantes, ligeramente elevados sobre el haz de las hojas inferiores.</p> |  |
| 5 | <p>G2 0.5gr. 15µl</p> <p>Las manchas negras se comienza a observar alrededor de ella unas manchas o halo de color verdosa</p> |  |
| 6 | <p>G2 Invernadero 0.5gr. 15µl</p> |  |
| 7 | <p>G3 0.5gr. 15µl</p> <p>Las manchas negras se comienzan a observar alrededor de ellas unas manchas o halos de tejido muerto de color marrón.</p> |  |

| | | |
|----|--|--|
| 8 | <p>G4 0.5gr. 15µl</p> <p>Las manchas de color marrón proliferan en las hojas y llegan a unirse entre sí, formando extensas áreas de tejido muerto.</p> |  |
| 9 | <p>G5 0.5gr. 15µl</p> <p>La aparición de los primeros puntos negros, las áreas de tejido muerto cubren toda la hoja.</p> |  |
| 10 | <p>G5 0.5gr. 15µl</p> |  |

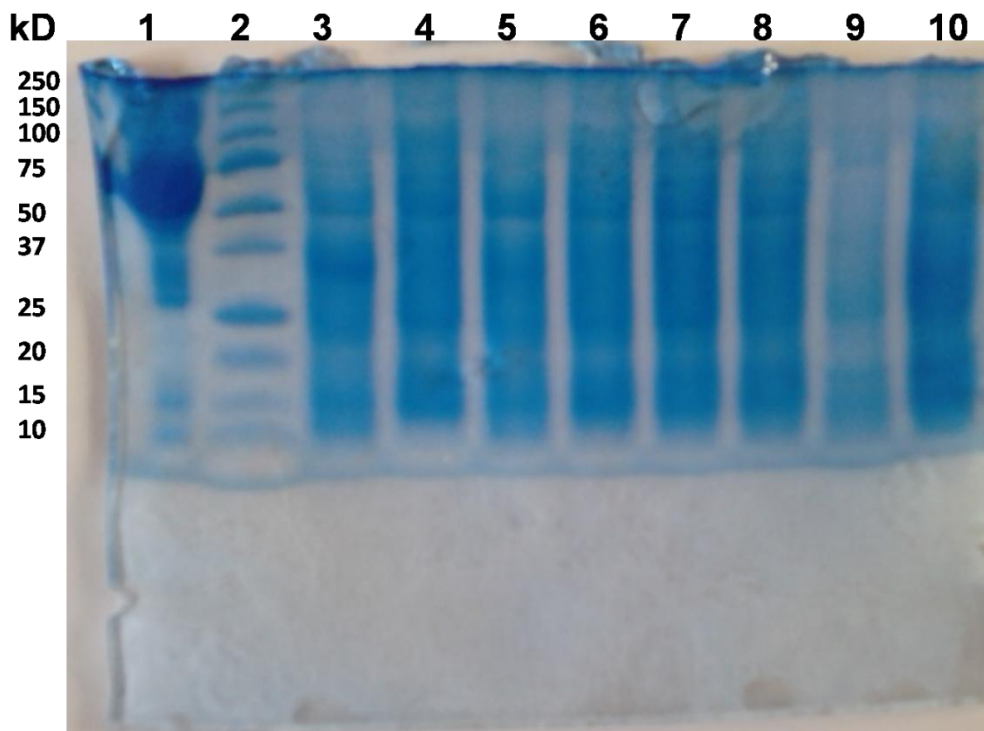
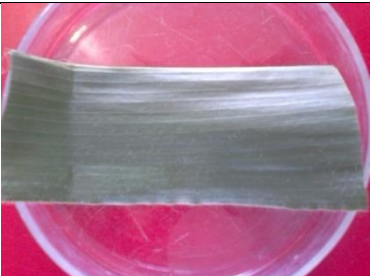



Figura 19. Análisis por el método de electroforesis SDS-PAGE a diferentes etapas de la enfermedad. Gel de acrilamida al 12%. Carril 1 muestra estándar (BCA), Carril 2 marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards), carril 3 muestra de planta sana, los carriles 4,5,6,7,8,9,10, corresponde a las etapas de la enfermedad. Cada carril se cargó 15 µl de extracto de proteína y 5 µl de marcador. Condiciones: 100 volts, 2: 30 hrs y 70 A.

Respecto a la figura, se hizo una comparación de bandas que se encuentra en cada muestra, el carril 3 corresponde al grado 0 de la enfermedad es decir que es el grado sano de la planta, el grado 1 de la enfermedad comienza en el carril 4, continua el grado 2 en el carril 5 y 6, en el grado 3 se puede observar que empieza en el carril 7, en el carril 8 comienza el grado 4, y el grado 5 se encuentra en al carril 9 extendiéndose hasta el carril 10, en este último grado es en donde se inicia el secamiento de la planta debido que a que va perdiendo resistencia dando paso a la extensión del fitopatógeno, pudiendo así lograr la muerte de la planta, es por lo cual se observan una banda entre 15-20 kD, asíéndolo así diferente a las banda del fragmento sano.

En la figura 20 se realizó la comparación de plantas sanas y plantas infectadas en la etapa donde las hojas están iniciando el secamiento, utilizando diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 gr) para comparar el contenido de proteínas que fueran representativas en el análisis de electroforesis, como podemos observar se separaron de manera correcta, es decir las bandas son muy legibles en las diferentes concentraciones por lo cual no hay diferencia alguna en las dos muestras, y la concentración que nos ofrece mejores resultados para ambas muestras es la de concentración de 0.5 gr; al comparar las proteínas de los fragmentos de hoja sana e infectada, lo que muestra es una proteína separada en base a su peso molecular entre 15- 20 kD, ya que no contamos con los equipos adecuados para desarrollar más técnicas que nos ayude a identificar y caracterizar con mayor profundidad las proteínas que involucra la planta y el fitopatógeno, solo se logró identificar por su peso molecular por lo que podemos decir que es una proteína cuya cadena polipeptídica es pequeña, por su recorrido en el gel, porque a menor tamaño migrarán a mayor velocidad que las grandes.

Tabla 13. Colocación de la muestra en el gel para la electroforesis en comparación de la muestra sana y enferma en el grado cinco iniciando el secamiento.

| No. Posos | De Muestras | Caracterización de la muestra |
|-----------|--------------------------|--|
| 1 | Marcador 5µl | Precision Plus Protein™ Standards |
| 2 | BCA Estandarizado 15µl | BCA estandarizado concentración 1mg/µl |
| 3 | Planta sana 0.5 gr. 15µl |  |
| 4 | Planta sana 1.0 gr. 15µl | |
| 5 | Planta sana 1.5 gr. 15µl | |
| 6 | Planta sana 2.0 gr. | |

| | | | |
|----|------------|-------|--|
| | 15µl | | |
| 7 | G5 15µl | 0.5gr |  |
| 8 | G5 15µl | 1.0gr | |
| 9 | G5 15µl | 1.5gr | |
| 10 | G5 15µl | 2.0gr | |

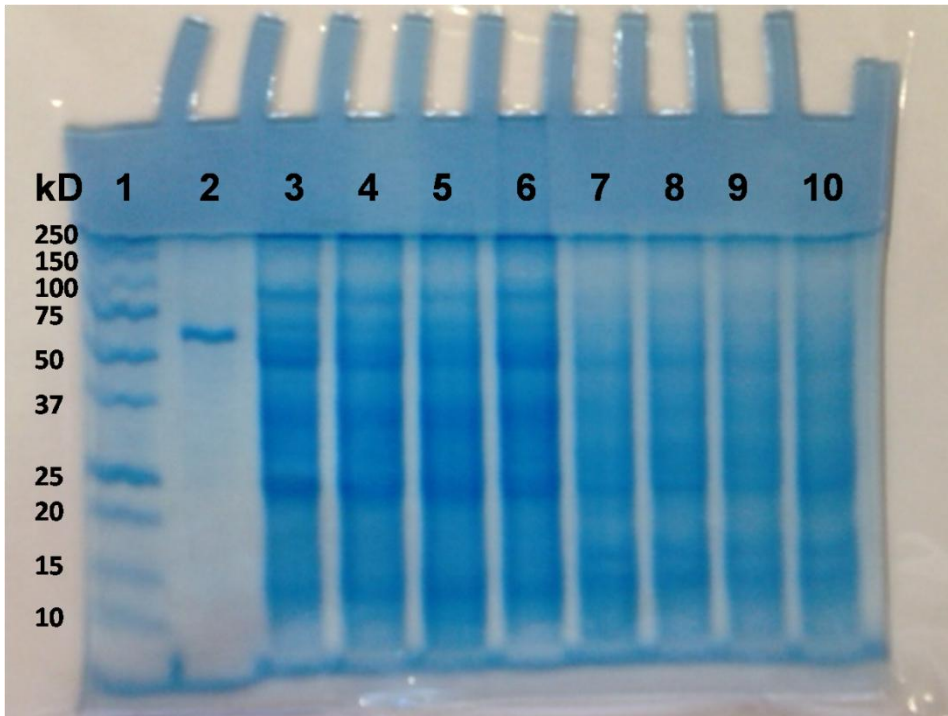


Figura 20. Corrida de muestras comparando plantas sanas y enfermas en el grado cuando inicia el secamiento de la planta. Gel de acrilamida al 12%. Carril 1 muestra marcador de peso molecular (Precision Plus Protein TM Standards), Carril 2 estándar (BCA), los carriles 3, 4, 5, 6 corresponde a las muestras de planta sana cuya concentración es 0.5, 1, 1.5 y 2 gr, los carriles 7, 8, 9, 10, corresponde a las muestras de planta enferma en el grado cuando inicia el secamiento cuya concentración es 0.5, 1, 1.5 y 2 gr. Cada carril se cargó 15 µl de extracto de proteína y 5 µl de marcador. Condiciones: 100 volts, 2: 30 hrs y 70 A.



Figura 21. Tabla referencia de pesos moleculares.

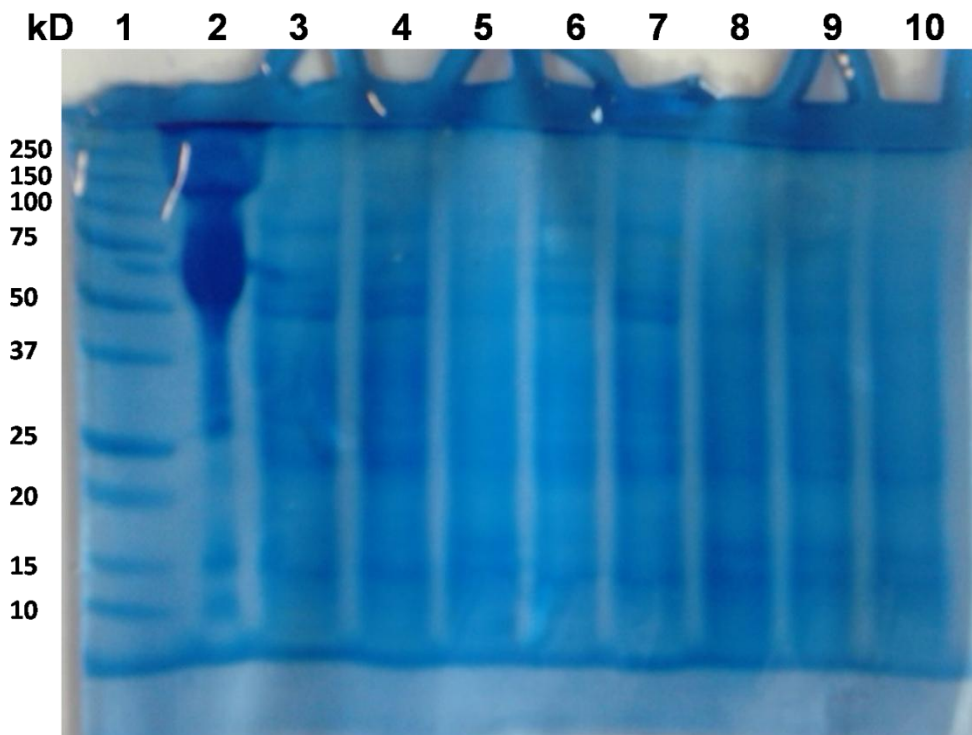


Figura 22. Corrida de muestras comparando plantas sanas y enfermas en el grado cuando inicia el secamiento de la planta. Gel de acrilamida al 12%. Carril 1 muestra marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards), Carril 2 estándar

(BCA), los carriles 3, 4, 5, 6 corresponde a las muestras de planta sana cuya concentración es 0.5, 1, 1.5 y 2 gr, los carriles 7, 8, 9, 10, corresponde a las muestras de planta enferma en el grado cuando inicia el secamiento cuya concentración es 0.5, 1, 1.5 y 2 gr. Cada carril se cargó 15 µl de extracto de proteína y 5 µl de marcador. Condiciones: 100 volts, 2: 30 hrs y 70 A.

El análisis SDS- PAGE es de gran utilidad para asegurarnos de que realmente estemos extrayendo la concentración de proteína estimada mediante el método de Bradford. Además, aun cuando se utilice diferentes método de extracción y sean separadas por el método de electroforesis SDS-PAGE, solo estamos llevando a cabo su separación en base al peso molecular, lo que resulta mezcla de proteína altamente complejas y esto no es suficiente para la identificación de proteínas, por lo que se seguirá otros métodos tales como Western Blot, electroforesis bidimensional, espectrometría de masa, entre otras que ayuden a proporcionar más información.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRANDFORD

ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR

Se preparo una solución patrón de proteína con albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1mg/ml (sol. Stock). Para la solución de BSA se disolvieron 10 mg de BSA en 10ml de agua estéril, se realizo por duplicados las lecturas de las concentraciones con una longitud de onda 595 nm y el promedio de esto se obtuvo la curva estándar.

Tabla 14. Resultados de las absorbancia para la curva estándar.

| Concentración (mg/ml) | Volumen sol. Stock (µL) | Vol. De agua (µL) | Vol. Total (µL) | Absorbancia |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|-------------|
| 0 | 0 | 1000 | 1000 | Blanco |
| 1 | 10 | 990 | 1000 | 0.041 |
| 5 | 50 | 950 | 1000 | 0.104 |
| 10 | 100 | 900 | 1000 | 0.177 |
| 15 | 150 | 850 | 1000 | 0.214 |
| 30 | 300 | 700 | 1000 | 0.305 |
| 60 | 600 | 400 | 1000 | 0.444 |

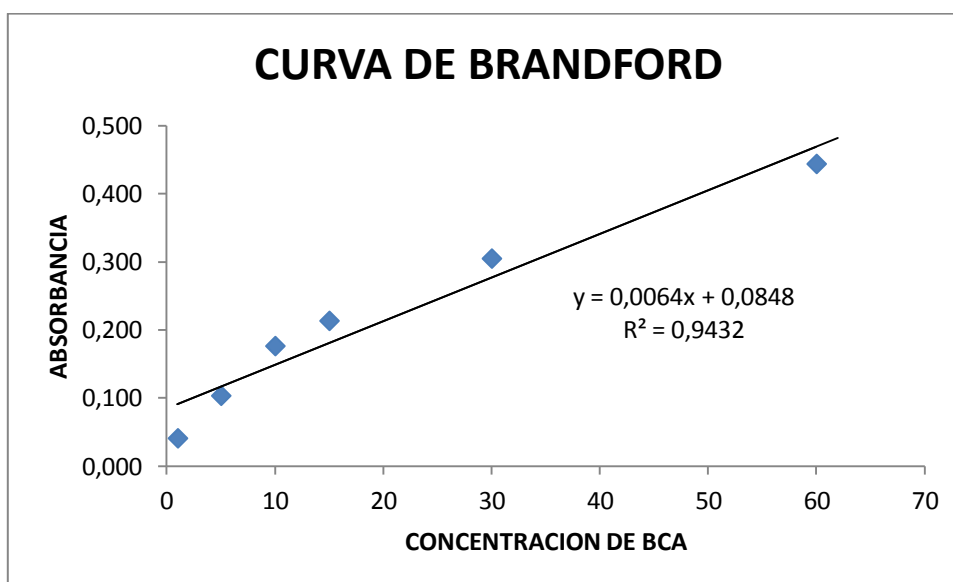


Figura 23. Curva estándar para determinar la concentración de proteína. Se cuantifico con el reactivo de Brandford con albumina de suero de bovino (BCA).

Con los resultados obtenidos muestra un coeficiente de correlación R^2 de 0.943. Esto indica que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (absorbancia) a partir de los valores de concentración. De manera que el intervalo de concentración comprendido, satisface las condiciones de linealidad del método

analítico, despejando a “X” de la ecuación obtenida, con los resultados de la curva obtuvimos que:

$$X = (Y - 0.084) / 0.006$$

De acuerdo a la fórmula obtenida se realizó la cuantificación de proteínas en las muestras, midiendo su absorbancia y sacando el porcentaje de proteína que había en la disolución, los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Resultado de absorbancia en las muestras en presencia del hongo.

| Muestra (g) | Absorbancia (nm) | % de proteína |
|--------------|------------------|---------------|
| G1 | 0.205 | 2.00 |
| G2 | 0.207 | 2.03 |
| G3 | 0.215 | 2.16 |
| G4 | 0.222 | 2.28 |
| G5 | 0.249 | 2.72 |
| Sana | 0.310 | 3.73 |
| Repeticiones | | |
| G51 | 0.179 | 1.57 |
| G52 | 0.188 | 1.72 |
| G53 | 0.198 | 1.88 |
| G54 | 0.203 | 1.96 |

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

A manera de conclusión se puede decir que mediante la realización de este proyecto, se observó y me puedo atrever a decir que las plantas emplean una elevada cantidad de señales originadas por los patógenos y el ambiente que les permiten reconocer al agresor y activar sus mecanismos de defensa. No obstante quiere decir que las plantas no vayan a sufrir de infecciones, en algunos casos pueden ser muy severos que hasta pueden llegar a perecer, todo depende del nivel de defensas que cada planta contenga.

La finalidad de este proyecto era de identificar la proteína del fitopatógeno en la planta de maíz y así mismo tener una visión de la respuesta del hospedador a la infección, de manera a la resistencia del mismo, por lo que en los resultados obtenidos se identifico una proteína entre 15-20 kD y que el el resto de estas proteínas pueden ser expresadas por la planta en respuesta a la enfermedad.

RECOMENDACIONES:

- En primera estancia se sugiere fortalecimiento del conocimiento para un adecuado manejo del equipo y material utilizado para el análisis proteómico.
- Perfeccionar aun más el método de extracción de proteína, para lograr un patrón más alto de proteínas, ya que al realizar los análisis proteómico con dicha técnicas, posiblemente se esté perdiendo una gran cantidad de proteína.
- Se recomienda que para una observación más detallada y obtención de mejores resultados se cuente con una mayor disponibilidad de tiempo.

11. BIBLIOGRAFIA.

1. Centro Internacional de Maíz y Trigo, CIMMYT (1999) Maize inbred lines released by CIMMYT. A compilation of 424 CIMMYT maize lines (CML_s). CIMMYT. First draft.
2. C.P., Reyes. (1990).El maiz y su cultivo. Mexico, D.F.: AGT. EDITOR S.A.
3. FIBAO glosario de Biología molecular, La proteómica, fecha de modificación 07/12/2007, disponible en internet en: <http://medmol.es/glosario/75/>
4. Fontana, H. y C. González. 2000. Enfermedades del maíz en Venezuela. Capítulo 6: Protección y sanidad vegetal, del libro: Maíz en Venezuela. Compilaciones del trabajo realizado por Gino Malaguti (Ing. Agro. Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
5. Fleury, A.1979. Cereales, GRAN LAROUSSE UNIVERRSAL. Vol. 9:2621-2622. PLAZA & JANES, S.A., USA.
6. González Camarillo, M (2005). Nuevos métodos de control de la “Mancha de Asfalto” en Maíz. Fichas tecnológicas sistema producto, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
7. INIFAP. 2007. Catálogo de Productos y Servicios; Guerrero. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Compilador Pedro Cadena Iñiguez. INIFAP. SAGARPA. Publicación especial No. 7. Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México. 174 páginas.
8. Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680.

9. Marino G C, N O Gómez M, J Pereyda H, Muñiz E (2008) Híbridos de maíz elotero tolerante al complejo “Mancha de asfalto” en el estado de Guerrero. CEIGUA-CIRPAS-INIFAP. Folleto técnico Núm.17. 36 p.
10. Marion M Branford, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of pretein- Dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, páginas 248-254.
11. Mao XiaoyingX. Mao, YufeiY. Hua and Guogang G. Chen, (2014), Amino Acid Composition, Molecular Weight Distribution and Gel Electrophoresis of Walnut (*Juglan sregia* L.), *International Journal of Molecular Sciences, Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 2003-2014; doi:10.3390/ijms15022003.
12. Padliya N. D., Cooper, B. (2006). Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens. *Proteomics* 6: 4069-4075.
13. Parsons, D. (1987). Maíz: manuales para educación agropecuaria. México: Trillas.
14. Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. *Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo*. Cuarta edición. México, D.F.: CIMMYT.
15. SIAP. 2002. Coordinación Federación-Estados en el Sistema Nacional de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (SNIDRUS). SAGARPA. México, D. F. 87 páginas.
16. SIAP, (2012). Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx.

17. Schevenko, A. (2006). In gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat. protoc. 1: 2856-2860.

18. Verónica Moral Dardé, (2008), proteómica cardiovascular: análisis Proteómico de plasma y monocitos circulantes humanos en pacientes con síndrome coronario agudo, Tesis, universidad complutense de Madrid facultad de ciencias biológicas Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, pag.14-20.

12.- ANEXOS.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVO.

- Buffer de extracción.

| Solución. | Cantidad Requerido para el buffer |
|--|--|
| Tris-HCl | 1.21 gr. |
| Acido ascórbico | 0.1 gr. |
| Glicerina | 10 gr. |
| Polyvinylpolypirrolidona | 1 gr. |
| B-mercaptoetanol | 5 ml |
| Se ajusta el pH 8 con HCl y se afora en un matraz de 100 ml | |

- Solución laemmli 2X

| Solución | Cantidad requerido |
|------------------------------------|---------------------------|
| Tris-bases | 65.8 mM |
| Glicerol | 26.3 % |
| SDS | 2.1 % |
| Azul de Bromofenol | 0.01 % |
| Se ajusta el pH 6.8 con HCl | |

Para preparación de los geles se utilizo un equipo de soluciones (TGX™ and TGX stain-free™Fastcast, Acrylamide Kit and Starter Kit).

- Prepara la solución para el gel de separación

| | 1.0 mm (n=gels) | 0.75 mm (n=gels) | 1.0 mm (n=gels) | 1.5 mm (n=gels) | 1.0 mm (n=gels) |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Resolver A | 3.5 ml * n | 2 ml * n | 3 ml * n | 4 ml * n | 6 ml * n |
| Resolver B | 3.5 ml * n | 2 ml * n | 3 ml * n | 4 ml * n | 6 ml * n |
| TEMED | 3.5 µl * n | 2 µl * n | 3 µl * n | 4 µl * n | 6 µl * n |
| 10% APS | 35 µl * n | 20 µl * n | 30 µl * n | 40 µl * n | 60 l * n |

- Prepara la solución para el gel de apilamiento.

| | 1.0 mm (n=gels) | 0.75 mm (n=gels) | 1.0 mm (n=gels) | 1.5 mm (n=gels) | 1.0 mm (n=gels) |
|------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Stacker A | 1 ml * n | 1 ml * n | 1 ml * n | 1.5 ml * n | 1.5 ml * n |
| Stacker B | 1 ml * n | 1 ml * n | 1 ml * n | 1.5 ml * n | 1.5 ml * n |
| TEMED | 2 µl * n | 2 µl * n | 2 µl * n | 3 µl * n | 3 µl * n |
| 10% APS | 10 µl * n | 10 µl * n | 10 µl * n | 15 µl * n | 15 µl * n |

Nota: es recomendable prepara alícuota pequeñas de APS al 10%, 0.05 gr APS disolver en 0.5 ml.

- Buffer de corrida 1X

| Solución | Cantidad requerido |
|--|---------------------------|
| Tris-base | 3 gr |
| Glicina | 14.4 gr |
| SDS | 1 gr |
| Aforar con agua destilada en un matraz de 1000 ml | |

- Solución de tinción azul de coomassie

| Solución | Cantidad requerido |
|--|---------------------------|
| Acido acético | 10 % |
| Metanol | 40 % |
| Azul de coomassie | 0.1 % |
| Aforar con agua destilada la cantidad requerido | |

- Solución para desteñir la solución de tinción de coomassie

| Solución | Cantidad requerido |
|--|---------------------------|
| Acido acético | 10 % |
| Metanol | 40 % |
| Aforar con agua destilada en un matraz de 1000 ml | |

- Solución de Brandford

| Solución |
|--|
| Disolver 100 mg de azul de coomassie en 50 ml de etanol (absoluto o al 95%) |
| Agregar 100 ml de acido fosfórico al 85% |
| Aforar la solución con agua destilada en un matraz de 1000 ml |
| Filtrar la solución y guardar en botella de ámbar |

CARTA DE PRESENTACION.



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

Departamento: GESTION TEC. Y VINC

No. de Oficio: 1753

Fecha: 10/07/2014

ASUNTO: **PRESENTACIÓN DEL ALUMNO
Y AGRADECIMIENTO**

Mc. Jorge Rojo Soberanes
Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícolas Pecuarias (INIFAP)
Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas
PRESENTE

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, tiene a bien presentar a sus finas atenciones al (la) alumno (a): **Areli Castellanos de la Cruz** número de control: **10270002** carrera de: **Ingeniería Bioquímica** quien desea desarrollar en ese organismo el proyecto de Residencias Profesionales denominado **Evaluación de la resistencia de dos genotipos de maíz a la mancha de asfalto** cubriendo un total de 500 horas, en un período de cuatro a seis meses, en el periodo Agosto-Diciembre 2014.

Es importante hacer de su conocimiento que todos los alumnos que se encuentran inscritos en esta institución cuentan con un seguro contra accidentes personales con la empresa **Aseguradora Interacciones S.A. de C.V.** Según póliza **No. 100 6861100**, e inscripción en el IMSS.

Así mismo, hacemos patente nuestro sincero agradecimiento por su buena disposición y colaboración para que nuestros alumnos, aun estando en proceso de formación, desarrollen un proyecto de trabajo profesional, donde puedan aplicar el conocimiento y el trabajo en el campo de acción en el que se desenvolverán como futuros profesionistas.

Al vernos favorecidos con su participación en nuestro objetivo, sólo nos resta manifestarle la seguridad de nuestra más atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE

LIC. HIGINIO GARCIA MENDOZA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GESTIÓN TECNOLÓGICA Y VINCULACIÓN



**SECRETARIA DE EDUCACION
PUBLICA**

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
Departamento de Gestión Tecnológica y Vinculación

ITTG-AC-PO-007-03

Rev.1

Carretera Panamericana Km. 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. C. P. 29050, apartado Postal 599

Teléfonos: (961) 615-0380, 615-0461 Fax: (961) 615-1687

www.ittuxtlagutierrez.edu.mx

CARTA DE ACEPTACION.

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



inifap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**DIRECCIÓN DE COORDINACIÓN Y VINCULACIÓN
DEL INIFAP EN CHIAPAS**

Número de oficio: JAG.CHS.6.03.00624

Asunto: Carta de aceptación

Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas; a 21 de agosto de 2014

**LIC. HIGINIO GARCIA MENDOZA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GESTIÓN
TECNOLÓGICA Y VINCULACIÓN
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ
TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS**

Por este medio, y en relación a la Carta de Presentación No. 1753, de fecha 10 de julio del 2014 y recibido el día 18 de agosto del presente, me permito informar a usted que no existe inconveniente en que la alumna **C. Areli Castellanos de la Cruz**, estudiante de la carrera de Ingeniería Bioquímica de esa Universidad, con número de matrícula **10270002**, realice su Residencia Profesional en el Programa denominado: "**Evaluación de la resistencia de dos genotipos de maíz a la mancha de asfalto**", mediante la supervisión del Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramirez, Investigador del Campo Experimental Centro de Chiapas.

La realización de la Residencia Profesional, comprende el periodo de agosto a diciembre del 2014, de lunes a viernes durante 8 horas diarias en un horario de 07:00 am a 03:00 pm., cubriendo un total de 500 horas, realizando las siguientes actividades:

1. Colecta de muestras para inóculo
2. Siembra de genotipos de maíz en invernadero
3. Preparación de inóculo e Inoculación de genotipos
4. Extracción de proteínas de maíz
5. Análisis de datos y redacción de informe de resultados

Cabe mencionar que la estudiante **C. Areli Castellanos de la Cruz** desempeñará sus actividades en el área de Laboratorios e invernadero.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE.
DIRECTOR DE COORDINACIÓN Y
VINCULACIÓN EN CHIAPAS DEL INIFAP**

M. C. JORGE VÍCTOR ROJO SOBERANES

C.c.p.- DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMIREZ.- Investigador del CECECH.- Presente.
MINUTARIO

JVRS/Chepita



Km. 3.0 Carretera Ocozocoautla-Cintalapa, Ocozocoautla de Espinosa, Chis., C.P. 29140. Tels.: (968) 6882911, 6882915, 6882916, 6882817, 6882818, ext. 202
www.inifap.gob.mx www.cirpas-inifap.gob.mx

CARTA DE LIBERACION.

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

DIRECCIÓN DE COORDINACIÓN Y VINCULACIÓN
DEL INIFAP EN CHIAPAS
Número de oficio: JAG.CHS.6.03.00882
Asunto: Carta de liberación de residencia profesional

Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas; a 10 de diciembre de 2014

LIC. HIGINIO GARCÍA MENDOZA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GESTIÓN
TECNOLÓGICA Y VINCULACIÓN
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ
TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIS.

Por este medio se hace constar que la alumna **C. Areli Castellanos de la Cruz**, con matrícula No. **10270002** de la carrera de Ingeniería Bioquímica de ese Instituto, ha concluido satisfactoriamente su residencia profesional en este Instituto, con el tema denominado: "Evaluación de la resistencia de dos genotipos de maíz a la mancha de asfalto", el cual se engloba dentro de las actividades del proyecto de investigación "Mecanismos de la resistencia del maíz al complejo de la mancha de asfalto y selección.

Las actividades desarrolladas por la estudiante **C. Areli Castellanos de la Cruz** fueron supervisadas por el Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez, Investigador del Campo Experimental Centro de Chiapas, en el periodo comprendido del 21 de agosto al 5 de diciembre de 2014, de lunes a viernes durante 8 horas diarias, en un horario de 7:00 am a 15:00 hrs., durante las cuales realizó las siguientes actividades:

1. Establecimiento de siembra en invernadero
2. Inoculación de los agentes causales de la mancha de asfalto
3. Colecta de muestras y extracción de proteínas
4. Electroforesis de proteínas
5. Análisis de datos y redacción de informe de resultados

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE,
DIRECTOR DE COORDINACIÓN Y
VINCULACIÓN EN CHIAPAS DEL INIFAP

M. C. JORGE VÍCTOR ROJO SOBERANES

C.c.p.- DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMÍREZ.- Investigador del CECECH.- Presente.
MINUTARIO

JVRS/Lupita



**DICOVI
CHIAPAS**

Km. 3.0 Carretera Ocozocoautla-Cintalapa, Ocozocoautla
de Espinosa, Chis., C.P. 29140. Tels.: (968) 6882911,
6882915, 6882916, 6882917, 6882918, ext. 202
www.inifap.gob.mx www.cirpas-inifap.gob.mx