

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**PRESENTA:**

VÍCTOR MANUEL MARANTO GÓMEZ

**NOMBRE DEL PROYECTO:**

“Caracterización de proteínas involucradas en la mancha de asfalto  
(*Phyllachora maydis*) en *Zea mays*”

**ASESOR INTERNO:**

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

**ASESOR EXTERNO:**

DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMIREZ

**PERIODO:**

AGOSTO – DICIEMBRE 2017

## Índice

1. Resumen .....	5
2. Introducción .....	6
3. Justificación .....	7
4. Objetivos .....	8
4.1. Objetivo general: .....	8
4.2. Objetivos específicos: .....	8
5. Caracterización del área en que participo.....	9
5.1. Misión.....	9
5.2. Visión .....	9
5.3. Objetivos .....	9
6. Problemas a resolver .....	11
7. Alcances y limitaciones.....	12
7.1. Alcances.....	12
7.2. Limitaciones .....	12
8. Fundamento teórico .....	13
8.1. Historia, clasificación, características e importancia de la planta .....	13
8.1.1. Historia.....	13
8.1.2. Clasificación taxonómica.....	13
8.1.3. Características de la planta.....	14
8.1.4. Importancia del maíz.....	15
8.2. Plagas y enfermedades del cultivo del maíz .....	16
8.2.1. Principales plagas.....	16
8.2.2. Principales enfermedades.....	19
8.3. Complejo de la mancha de asfalto (CMA).....	21
8.3.1. Historia del CMA .....	22
8.3.2. Agentes causantes de la enfermedad.....	23
8.3.3. Importancia económica .....	23
8.3.4. Proceso infeccioso y sintomatología.....	24
8.3.5. Escalas daño de CMA.....	25
8.4. Técnicas de identificación de proteínas .....	27
8.4.1. Método de Bradford .....	28

9. Metodología.....	34
9.1. Material biológico .....	34
9.1.1. Muestras de CMA .....	34
9.1.2. Inoculación de las esporas del CMA .....	34
9.2. Obtención de extractos proteicos.....	35
9.3. Curva patrón de proteínas .....	36
9.4. Cuantificación de proteínas.....	36
9.5. Electroforesis 1D – SDS – PAGE.....	36
9.5.1. Gel de separación .....	37
9.5.2. Gel de apilamiento .....	37
9.5.3. Desnaturalización de las proteínas .....	38
10. Resultados y discusión.....	38
10.1. Inoculación del CMA .....	38
10.2. Curva patrón de proteínas .....	39
10.3. Concentración de proteínas en CMA .....	40
10.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida 1D – SDS – PAGE .....	40
11. Conclusión y recomendaciones.....	42
12. Bibliografía .....	43
13. Anexos .....	45

## Índice de Figuras

<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Localización geográfica del Instituto Nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)	10
Figura 2. Etapa adulta de <i>Frankliniella williamsi</i> .	16
Figura 3. Gusano cogollero infectando la etapa temprana del maíz.	17
Figura 4. Gusano barrenador invadiendo el tallo de una planta de maíz.	17
Figura 5. Frailecillo en cultivo de maíz.	18
Figura 6. Larva de la gallina ciega.	19
Figura 7. Carbón de la espiga en la etapa de floración del maíz.	19
Figura 8. Pudrición de la raíz del maíz por infección del hongo <i>Fusarium</i> spp.	20
Figura 9. Tallo de maíz dañado por <i>Diplodia maydis</i> .	21
Figura 10. Tallo de la hoja de maíz siendo infectado por <i>Puccinia sorghi</i> .	21
Figura 11. Complejo de la mancha de asfalto en hoja de maíz, muestra de Guadalupe Victoria, Chiapas.	22
Figura 12. Plana de maíz infectada por CMA, se puede observar el desarrollo de la enfermedad de hojas inferiores a hojas superiores.	24
Figura 13. Desarrollo del proceso infectivo (grados G1 y G5) del CMA.	25
Figura 14. Severidad de daño a nivel individual con valores en escala ordinaria y rango porcentual.	26
Figura 15. Escala pictórica de referencia de severidad de daño a nivel de planta individual con clasificación en rangos de 1 a 5 y rango de valores en porcentaje.	27
Figura 16. Mancha de asfalto en cultivo de maíz en la zona de Guadalupe Victoria, municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas	34
Figura 17. a) Planta sana, b) Fase G1, c) Fase G2, d) Fase G3, e) Fase G4, g) Fase G5.	35
Figura 18. Fase asexual de <i>Monographella maydis</i> ( <i>Microdochium maydis</i> ) encontradas en la suspensión de esporas.	39
Figura 19. Curva patrón de proteínas por el método de Bradford.	39
Figura 20. Electroforesis de las fases del CMA: M (marcador molecular), BSA (Albumina de suero bovino), PS (Planta sana), G1 – G6 (Grados de infección del CMA).	41

## **Índice de Tablas**

<b><u>Nombre</u></b>	<b><u>Página</u></b>
Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.	13
Tabla 2. Características morfológicas de maíz, teosinte y Tripsacum.	14
Tabla 3. Producción mundial de maíz.	15
Tabla 4. Consumo mundial del maíz.	15
Tabla 5. Taxonomía de los hongos causantes del CMA.	23
Tabla 6. Clases de escala ordinal, índice de severidad y rango porcentual del CMA en planta completa.	26
Tabla 7. Función y descripción de las proteínas.	28
Tabla 8. Concentraciones de BSA para curva patrón de proteínas.	36
Tabla 9. Composición y cantidades del gel de separación.	36
Tabla 10. Composición y cantidades del gel de apilamiento	36
Tabla 11. Concentración promedio de proteínas por grado de infección del CMA y porcentaje de proteína	40

**L**

## **1. Resumen**

Se analizó el patrón electroforético de los diferentes grados del complejo de la mancha de asfalto desarrollado en la temporada de Agosto – Octubre de 2017 en la localidad de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, con plantas de *Zea mays* inoculadas con esporas de los diferentes hongos responsables de esta enfermedad. Los patrones electroforéticos se tomaron de los diferentes grados de la enfermedad tomando como control positivo planta sana de *Zea mays* y cuantificando la cantidad de proteínas totales que estas tenían en su desarrollo. Los resultados indican que a partir del grado G3 de esta enfermedad se desarrolla una nueva proteína con peso entre los 15 y 20 kD.

## 2. Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta gramínea anual, reconocido por ser el cultivo más importante en el mundo, siendo un elemento básico para la humanidad representando el 60% de la ingesta energética de plantas en el mundo, por encima del arroz y el trigo.

Debido a la importancia económica de este producto, se realizan investigaciones para mantener la calidad del maíz en perfectas condiciones, para el consumo humano, ya que, diversas condiciones climáticas y geográficas, permiten el desarrollo de enfermedades causadas por hongos patógenos, prevaleciendo entre las más comunes los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, los cuales al estar presentes en la planta generan un grupo de toxinas que son peligrosas para la salud humana como las fumonisinas y aflatoxinas.

Dentro de las enfermedades causadas por patógenos se encuentran unas particularmente especiales a condiciones de alta humedad, causadas por tizones foliares, como es el caso del complejo de la mancha de asfalto (CMA) el cual tiene un impacto económico importante en las regiones de Centroamérica, México y Colombia, las cuales registran el mayor porcentaje de pérdida de esta enfermedad.

Esta enfermedad es una sinergia de tres hongos involucrados los cuales son *Phyllacora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllacorae*, este último sienta un hiperparásito de *P. maydis*, que en algunas ocasiones no está presente en la enfermedad. Esta enfermedad genera la necrosis en la planta que se extiende por todo el follaje, teniendo pérdidas al ocasionar que la planta sea más liviana y germinación prematura de granos, teniendo la aparición de una posible toxina.

Este trabajo realiza una investigación de caracterización de las proteínas producidas durante el desarrollo de la enfermedad de CMA. Se realizaron pruebas para conocer el tamaño de las proteínas encontradas usando el método de electroforesis SDS – PAGE, utilizando como material biológico plantas enfermas de CMA apoyado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) que presentaban distintos niveles de infección de la planta.

### 3. Justificación

En la actualidad el cultivo de maíz es el más importante del mundo, siendo México el octavo productor y cuarto consumidor de maíz en el mundo con 24, 500 Mt y 36, 500 Mt respectivamente. En contraste las condiciones ambientales de alta humedad en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Veracruz favorecen a enfermedades relacionadas con hongos, como es el caso del complejo mancha de asfalto (CMA), llegando a tener un efecto en de pérdidas en el país de 30 al 100 de la producción total del maíz.

La intención de siembra de maíz para producción de grano en México en el ciclo otoño – invierno es de 1, 259, 264 Ha, que equivale a 33.78 % de hectáreas sembradas destinadas para este año, esperando tener un rendimiento de 6.41 ton/Ha, sin embargo, las condiciones climáticas de este año generan la aparición de CMA bajando el rendimiento esperado.

El CMA es una enfermedad que provoca pérdidas de rendimiento y deterioro en la calidad de follaje; debido a esto se considera una enfermedad de importancia económica en zonas húmedas y subhúmedas de México. Esta enfermedad es causada por una asociación de hongos de *phyllacora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllacorae*.

La enfermedad empieza con la infección de *P. maydis*, el cual se manifiesta en forma de una costra carbonosa en la planta, sin embargo, este hongo puede permanecer en la planta sin llegar a secarla. El segundo hongo en aparecer es *M. maydis*, el cual genera necrosis alrededor de la infección de *P. maydis*, secando la hoja provocando una posible toxina.

Aún hay muchas cosas que no se saben con exactitud sobre esta enfermedad, por tanto, el desarrollo de variedades genéticamente resistentes a esta enfermedad es muy pobre, lo que nos lleva a realizar estudios moleculares sobre el comportamiento del metabolismo de los hongos causantes de esta enfermedad.



## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general:**

- Identificar las proteínas involucradas en la enfermedad del complejo de la mancha de asfalto en sus diferentes grados de infección con técnicas de biología molecular.

### **4.2. Objetivos específicos:**

- Verificar la aparición de los hongos en el complejo de la mancha de asfalto realizando montajes y visualización en microscopio.
- Extraer y determinar el tamaño de las proteínas en el complejo de la mancha de asfalto utilizando la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) en sus diferentes fases de infección.
- Cuantificar la cantidad y rendimiento de las proteínas extraídas en el complejo de la mancha de asfalto.

## **5. Caracterización del área en que participo**

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), CE centro de Chiapas, en el área de sanidad vegetal, bajo la tutela y supervisión del Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez.

### **5.1. 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.

### **5.2. 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.

### **5.3. Objetivos**

- 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.
- 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.
- 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.

- 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.

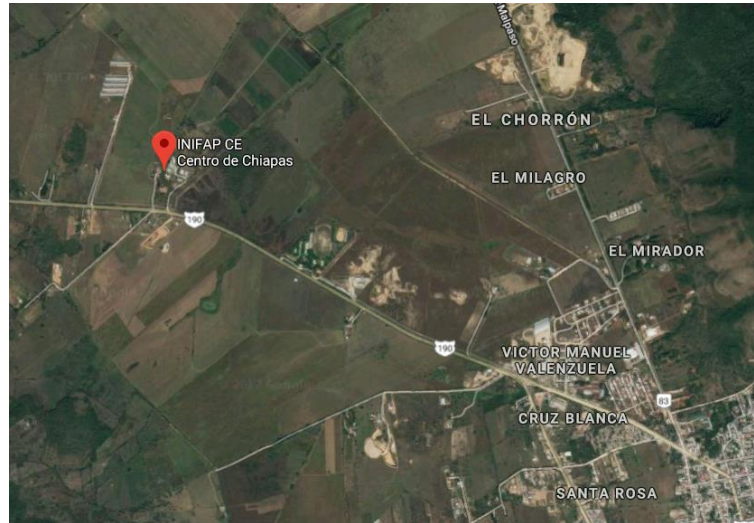


Figura 1. Localización geográfica del Instituto Nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Fuente: Google Maps.

## **6. Problemas a resolver**

La información actual sobre el CMA es insuficiente para poder establecer de manera concreta el agente(es) causante de la muerte de la planta, así como la también el motivo de resistencia a esta enfermedad de algunas especies de *Zea mays* L.

Esto nos lleva a realizar una investigación basándonos en los grados de infección del CMA, para dar a conocer una posible ruta de la expresión de la proteína que genera que la planta se seque. Para ello es necesario establecer técnicas de identificación electroforéticas de proteínas como es la técnica SDS – PAGE, y técnicas de identificación basados en espectrofotometría de masas para hacer la identificación de las proteínas encontradas en cada grado de infección de la planta.

## **7. Alcances y limitaciones**

### **7.1. Alcances**

- La inoculación del patógeno se llevó a cabo con éxito en los primeros meses de la estancia agosto-octubre, en una planta susceptible a la enfermedad del CMA. La presencia de *Phyllachora maydis* se presentó a las dos semanas, y la primera aparición de la fase G3 (inicio de secado de las hojas) a partir de la semana 3.
- La extracción de proteínas tuvo buen resultado, dando una cantidad considerable de proteínas extraídas en todas las fases de infección usando el método de Bradford.
- La electroforesis de proteínas nos demostró los diferentes pesos moleculares de las proteínas encontradas en todas las fases del CMA usando el método SDS – PAGE.

### **7.2. Limitaciones**

- El tiempo fue una limitante clave dentro del desarrollo del experimento, debido a que el establecimiento de la técnica SDS – PAGE en cuestión de proteínas es largo.
- La falta de recurso para montar la técnica de espectrofotometría de masas MALDI – TOF, debido a esto no se llegó a la caracterización de las proteínas involucradas en el CMA.

## 8. Fundamento teórico

### 8.1. Historia, clasificación, características e importancia de la planta

#### 8.1.1. Historia

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta gramínea anual y fuente principal de alimentación de la civilización del continente americano. El maíz tiene registros de hace 7.000 años, dando su origen en el país de México y sus zonas cercanas de América central (FIRA, 2016).

La primera considera que el maíz cultivado moderno procede de un maíz silvestre extinto (del cual no se ha hallado prueba alguna); propone, además, que el teosinte constituye un producto de la hibridación entre dos gramíneas silvestres: un maíz primitivo y el *Tripsacum*. La segunda, y la que goza de mayor aceptación, supone que el maíz tuvo un solo ancestro directo: el teosinte (Orozco-Ramírez *et al.*, 2016).

#### 8.1.2. Clasificación taxonómica

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las *Poáceas* (Gramíneas), tribu *Maydeas*, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teocintle y las del género *Tripsacum*, conocidas como arrocillo o maicillo, son formas salvajes parientes de *Zea mays*. Son clasificadas como del Nuevo Mundo, porque su centro de origen está en América. En un primer momento, los taxónomos clasificaron los géneros *Zea* y *Euchlaena* -al cual pertenecía el *teocintle*- como dos separados (Ross-Ibarra *et al.*, 2017).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz.

Clasificación taxonómica	
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Liliopsida</i>
Subclase:	<i>Commelinidae</i>
Orden:	<i>Poales</i>
Familia:	<i>Poaceae (Gramineae)</i>
Subfamilia:	<i>Panicoideae</i>
Tribu:	<i>Andropogoneae</i>
Genero:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>Zea mays</i>
Nombre científico:	<i>Zea mayz</i> L.

### 8.1.3. Características de la planta

La planta de maíz tropical es alta, con abundantes hojas y un sistema radical fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. Algunas veces se desarrollan una o dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta; estas terminan en una inflorescencia femenina la cual se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas que la envuelven; esta es la parte de la planta que almacena reservas. La parte superior de la planta termina en una inflorescencia masculina o panoja; esta tiene una espiga central prominente y varias ramificaciones laterales con flores masculinas, todas las que producen abundantes granos de polen. Las comparaciones de las características morfológicas esenciales de la planta de maíz con aquellas de las especies más próximas como el teosinte y el *Tripsacum* (Cázares-Sánchez *et al.*, 2015).

Tabla 2. Características morfológicas de maíz, teosinte y *Tripsacum*.

Aspecto de la planta	Maíz	Teosinte	<i>Tripsacum</i>
<b>Hábito</b>	Anual	Anual y perenne con rizomas	Perenne con rizomas
<b>Multiplicación</b>	Por semillas	Por semillas y vegetativa	Vegetativa y por semillas
<b>Sistema radicular</b>	Estacional	Persistente y estacional	Persistente
<b>Sistema caulinar</b>	Tallo principal, pocos macollos	Con macollos y ramificado	Macollos abundantes y ramificado
<b>Hojas</b>	Anchas	Similar al maíz	Angostas a medio angostas
<b>Inflorescencia lateral</b>	Femenina	Predominantemente femeninas y algunas mezcladas	Mezclada
<b>Inflorescencia terminal</b>	Masculina, grande y dominante	Masculina, media	Mezclada
<b>Espiguillas femeninas</b>	Apareadas	Simples	Simples
<b>Espiguillas masculinas</b>	Apareadas	Apareadas	Apareadas
<b>Mazorca</b>	Muchas filas, cubierta	Dos filas, cubierta	Dos filas, descubierta
<b>Fruto</b>	Desnudo, no dehiscente	Con cubierta rígida, cupulado, dehiscente	Con cubierta rígida, dehiscente
<b>Reproducción</b>	Sexual	Sexual	Apomíctica y sexual
<b>Semilla</b>	Sin latencia	Latencia en algunos casos	Latencia

Fuente: FAO, 2001.

### 8.1.4. Importancia del maíz

El maíz es el cultivo más importante y amplio en el mundo. Se cultiva en zonas tropicales, subtropicales y regiones templadas hasta 500 m y desde el nivel del mar hasta 4,000 m. Al bajo riego a condiciones Semiáridas. Hay una gran variedad de variedades con una maduración de 85 días a más de 200 días con variabilidad en el color y la textura del grano, etc (Cázares-Sánchez *et al.*, 2015).

Tabla 3. Producción mundial de maíz.

Producción mundial de maíz (miles de toneladas)											
	2006/2007	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017*
Estados Unidos	267,503	331,177	305,911	331,921	315,618	312,789	273,192	351,272	361,091	345,486	382,476
China	151,600	152,300	165,914	163,974	177,245	192,780	205,614	218,490	215,646	224,580	216,000
Brasil	51,000	58,600	51,000	56,100	57,400	73,000	81,500	80,000	85,000	67,000	83,500
Unión europea	55,887	49,481	65,131	59,540	58,618	68,316	59,142	64,931	75,840	58,481	60,279
Argentina	22,500	22,017	15,500	25,000	25,200	21,000	27,000	26,000	28,700	28,000	36,500
Ucrania	6,426	7,421	11,447	10,486	11,919	22,838	20,922	30,900	28,450	23,333	26,000
India	15,097	18,955	19,731	16,719	21,726	21,759	22,258	24,259	24,170	21,800	24,500
México	22,350	23,600	24,226	20,374	21,058	18,726	21,591	22,880	25,480	25,800	24,500
Rusia	3,510	3,798	6,682	3,963	3,075	6,962	8,213	11,635	11,325	13,168	14,000
Sudáfrica	7,300	13,164	12,567	13,420	10,924	12,759	12,365	14,925	10,629	7,900	13,000
Resto de países	113,403	115,141	121,966	123,740	133,092	138,853	137,971	145,524	148,039	143,593	144,938

Fuente: USDA, 2016.

Tabla 4. Consumo mundial del maíz.

Consumo mundial de maíz (miles de toneladas)											
	2006/2007	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015	2015/2016	2016/2017*
Estados Unidos	230,674	261,632	258,041	280,987	284,549	277,961	262,973	292,958	301,792	298,831	312,434
China	145,000	150,000	153,000	165,000	180,000	188,000	200,000	208,000	202,000	217,500	226,000
Unión europea	64,558	66,026	63,910	61,689	65,246	69,693	69,846	76,796	77,880	72,714	73,800
Brasil	41,500	44,000	45,500	48,500	50,000	51,500	52,500	55,000	57,000	55,300	58,000
México	30,700	32,000	32,400	30,200	29,500	29,000	27,000	31,700	34,450	36,900	37,500
India	13,900	14,200	17,000	15,100	18,100	17,200	17,500	19,600	22,300	22,650	23,300
Japón	16,600	16,600	16,400	15,900	15,800	14,950	14,300	15,000	14,600	15,100	15,100
Egipto	10,700	10,400	11,100	12,000	12,500	11,700	12,000	13,200	13,900	14,750	15,050
Canadá	11,442	13,769	11,738	11,868	11,761	11,637	11,604	12,675	12,820	13,100	13,300
Vietnam	4,900	5,200	5,400	6,100	5,900	6,000	6,400	7,700	9,400	12,000	12,100
Resto de países	157,609	162,559	168,293	173,780	181,224	190,758	195,208	210,109	217,728	218,382	222,201

Fuente: USDA, 2016.



Como se puede observar en la tabla 3 y 4, México es el 8vo productor y 5to consumidos de este producto a nivel internacional, siendo esta, una de las bases de la alimentación de la cultura Mexicana.

Sin embargo, la importancia de este producto radica que es materia prima para los diferentes tipos de industrias, en los cuales, el producto final de transformación es el jarabe de maíz, furfurool, azúcares fermentables, solventes, combustibles líquidos, gas de carbón y otros químicos por destilación destructiva, y también en la fabricación de pulpa, papel y tableros duros (Ross-Ibarra *et al.*, 2017).

## 8.2. Plagas y enfermedades del cultivo del maíz

### 8.2.1. Principales plagas

En los cultivos y huertas siempre hay todo tipo de insectos y organismos invertebrados, con más beneficio o daño para la plantación, según los casos. El problema surge cuando hay desequilibrios y desajustes en el ecosistema, y estos agentes se reproducen de una forma descontrolada (SAGARPA, 2015).

- **Trips (*Frankliniella williamsi*)**. La biología de este insecto consiste de cinco estadios: adulto, huevo, larvas, prepupa y pupa. Los huevos son depositados en el tejido tierno de la planta y la eclosión se presenta en 2 a 14 días dependiendo de la temperatura. Las larvas de primer estadio empiezan a alimentarse pronto después de eclosionar. El ciclo de vida completo desde la oviposición hasta la emergencia del adulto varía desde los 12-44 días. Los trips causan su daño más severo en plántulas jóvenes y durante la formación de la mazorca permitiendo la entrada de patógenos como *Fusarium* spp (SAGARPA, 2015).



Figura 2. Etapa adulta de *Frankliniella williamsi*.

- **Gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*).** Los adultos emergen en primavera y ponen sus huevecillos en la superficie del suelo y tallo de la planta. Las larvas permanecen ocultas durante el día y en la noche se alimentan. Presentan hasta siete instares de fase larval y su ciclo lo desarrolla en 30 días. Pupa en el suelo y dura de 12-15 días. El gusano cogollero selecciona hojas y brotes tiernos, especialmente de los cogollos para alimentarse, convirtiéndose en un masticador del tejido vegetal. En estado de plántulas puede causar la defoliación completa y además dañar el meristema apical en desarrollo (SAGARPA, 2015).



Figura 3. Gusano cogollero infectando la etapa temprana del maíz.

- **Barrenador del tallo (*Diatraea* sp.).** La larva en sus dos primeros instares se alimenta del follaje y en el tercero si la planta es chica penetra el cogollo y causa su muerte. En etapas avanzadas del cultivo penetra al tallo, por lo que la planta reduce su crecimiento. Además transmite enfermedades debido a esta situación de daño. Las larvas de los últimos instares se transforman en pupa dentro del tallo de la planta penetrando de dos a tres internudos lo cual provoca la muerte de la planta (SAGARPA, 2015).



Figura 4. Gusano barrenador invadiendo el tallo de una planta de maíz.

- **Frailecillo (*Macroductylus mexicanus*).** Presentan una generación al año. Los adultos se alimentan de estructuras reproductivas de maíz, alfalfa, frijol y manzano; viven de 3 a 6 semanas. Emergen del suelo en forma de adulto después de las primeras lluvias. Las hembras depositan sus huevecillos en el suelo. Las larvas se alimentan de la raíz de las plantas silvestres y cultivadas; el adulto provoca el daño al follaje cuando actúa como defoliador y destruye los cabellos del elote. Los adultos son escarabajos de cuerpo largo y de color gris con amarillo. Posee patas largas, delgadas, color rojizo y con espinas. Las larvas son más pequeñas y delgadas en relación con las de gallina ciega. Su identificación se efectúa por el raster (parte anal del insecto) (SAGARPA, 2015).



Figura 5. Frailecillo en cultivo de maíz.

- **Gallina ciega (*Phyllophaga* sp.).** El daño lo ocasiona al endospermo de las semillas germinadas, los puntos de crecimiento y en ocasiones también barrenan el tallo de plántulas. Las larvas son de color blanco cremoso, la cabeza es de color café, las patas son muy peludas y desarrolladas. Los adultos son de color pardo rojizo y otras tonalidades, emergen del suelo tres días después de que se establece el temporal y a los 25 días aparece la larva, durando hasta 6 meses en esta fase de desarrollo, para después pupar y formar una galería en el suelo como adulto. Presentan especies anuales y bianuales. Las primeras son las que afectan más al cultivo de maíz. Se desarrollan básicamente en suelos arenosos (SAGARPA, 2015).



Figura 6. Larva de la gallina ciega.

### 8.2.2. 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.

- **Carbón de la espiga (*Sphacelotheca reiliana*).** 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 (SAGARPA, 2015).



Figura 7. Carbón de la espiga en la etapa de floración del maíz.

- **Pudrición de la raíz (*Pythium aphanidermatum*, *Diplodia maydis*, *Fusarium spp*)**. La infección ocurre desde la fase de semilla, durante la germinación y el desarrollo del cultivo. La pudrición postemergente se caracteriza por contener el inóculo en la raíz de la plántula, presentando un color amarillento, falta de vigor y estrangulamiento a nivel de la base del tallo, ocasionando la muerte prematura de la misma. Las condiciones que favorecen la presencia de estos hongos son suelos pobremente drenados, con excesiva compactación y una temperatura base de 10-13 °C (SAGARPA, 2015).



Figura 8. Pudrición de la raíz del maíz por infección del hongo *Fusarium spp*.

- **Pudrición del tallo (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium spp*, *Diplodia maydis*, *Pythium aphanidermatum*)**. Después de la polinización y al aproximarse la madurez de las plantas, el micelio del hongo se activa e invade sus nudos bajos. Condiciones secas al inicio de la estación y temperaturas de 28-30°C, seguidas de tiempo húmedo, 2-3 semanas después del llenado de grano, favorece la pudrición. Alto contenido de nitrógeno y bajo de potasio además de una densidad excesiva de plantas son favorables al hongo. Al mismo tiempo el daño por insectos puede facilitar su penetración. Son una continuación de las pudriciones de raíz e intermedias para la pudrición de mazorcas. Con el uso cada vez más extenso de siembra de semillas híbridas en nuestro país se ha incrementado este problema (SAGARPA, 2015).



Figura 9. Tallo de maíz dañado por *Diplodia maydis*.

- **Roya del maíz (*Puccinia sorghi*, *P. polyspora*, *Physopella zae*).** Las variedades de maíz dulce son muy susceptibles al patógeno. Su área de distribución se limita a zonas calientes y húmedas, suelen ser problema si se presentan en estadios jóvenes de la planta y carecen de importancia en los avanzados. Estos hongos se presentan cuando la mazorca está formada, por lo que no son de importancia económica. Las temperaturas de 16 a 23 °C y humedades al 100 % favorecen el desarrollo de *P. sorghi* (SAGARPA, 2015).



Figura 10. Tallo de la hoja de maíz siendo infecto por *Puccinia sorghi*.

### 8.3. Complejo de la mancha de asfalto (CMA)

El complejo de la mancha de asfalto es una enfermedad causada por una sinergia de hongos, en la cual, la primera manifestación de esta, es el hongo *Phyllacora maydis*, que produce un punto negro levantado sobre las hojas de maíz, lo que le da el nombre a la enfermedad de mancha de asfalto; seguido por la infección del segundo hongo *Monographella maydis*, en donde se genera una necrosis

amarillenta alrededor de la mancha de *P. maydis*, lo que se le conoce como “ojo de pescado”; lo cual genera el secamiento de la planta (Quiroga-Madriga *et al.*, 2017).



Figura 11. Complejo de la mancha de asfalto en hoja de maíz, muestra de Guadalupe Victoria, Chiapas, México

### **8.3.1. Historia del CMA**

El CMA fue reportado por primera vez en México e el año de 1904, por Maublanc, y posteriormente en Colombia, Costa Rica, El Salvador, Panamá y Venezuela. Sin embargo, esta enfermedad no sería tan agresiva hasta el año de 1985, en donde, las pérdidas de producción llegaron hasta el 30% (Maublanc, 1904).

El avance en otras regiones de Centroamérica fue tan agresiva, lo que provocó que productores y técnicos empezaran a desarrollar nuevos híbridos comerciales resistentes a esta enfermedad. Sin embargo, estos no tomaron en cuenta la capacidad de variación y selección de hongos, por tanto, el uso desmedido de fungicidas generó una capacidad de resistencia a cientos de compuestos activos (Quiroga-Madruga *et al.*, 2017).

### 8.3.2. Agentes causantes de la enfermedad

El CMA es causada por la sucesión de tres hongos, donde *P. maydis* es el primero que se establece, luego se incorpora *M. maydis*, y finalmente, en los estromas de *P. maydis* se hace el hiperparásito *C. phyllachorae*.

Tabla 5. Taxonomía de los hongos causantes del CMA.

Taxón	<i>Phyllachora maydis</i> (parásito obligado)		<i>Monographella maydis</i> (parásito facultativo)		<i>Coniothyrium phyllachorae</i> (hiperparásito de <i>Phyllachora</i> )
	Fase sexual (teleomorfo)	Fase asexual (anamorfo)	Fase sexual (teleomorfo)	Fase asexual (anamorfo)	Fase sexual (teleomorfo)
Reino	Fungi	Fungi	Fungi	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Dothideomycetes
Orden	Phyllachorales	Phyllachorales	Xylariales	Xylariales	Pleosporales
Familia	Phyllachoraceae	Phyllachoraceae	<i>Incertae sedis</i>	Hyponectriaceae	Leptosphaeriaceae
Género	<i>Phyllachora</i>	<i>Linochora</i> = <i>Leptostromella</i>	<i>Monographella</i>	<i>Microdochium</i>	<i>Coniothyrium</i>
Especie	<i>P. maydis</i>	<i>Linochora</i> sp.	<i>M. maydis</i>	<i>M. maydis</i>	<i>C. phyllachorae</i>
Referencia	Maublanc, 1904	F. von Höhnel, 1910; Parbery, 1967	Müller & Samuels, 1984	Sydow, 1924	Maublanc, 1904

Fuente: Quiroga-Madruga *et al.*, 2017.

El desarrollo de la enfermedad se da en condiciones climáticas del rango de temperatura de 22.9 a 24.7 °C, con una humedad relativa de 83.5 a 91.6 %.

### 8.3.3. Importancia económica

En las regiones de Centroamérica, principalmente México y Colombia, han tenido problemas con esta enfermedad, en periodos donde la humedad llega a las condiciones óptimas de crecimiento de este consorcio de hongos, llegando a tener



pérdidas que van desde el 30 a 100% del área de siembra total (Quiroga-Madriga *et al.*, 2017).

#### **8.3.4. Proceso infeccioso y sintomatología**

El CMA empieza con la infección de *P. maydis* actuado como un punto negro levantado en la parte superior de la hoja de 0.5 a 2 mm de diámetro. Después de la infección de *P. maydis*, entre un periodo de 2 a 3 días es invadido por *M. maydis*, la cual genera un halo necrótico amarillento alrededor de la mancha negra de *P. maydis* (Hernández-Ramos & Sandoval-Islas, 2015).

Las condiciones climáticas dan paso a la sucesión de los síntomas entro 8 y 15 días, como es la extensión de la necrosis generando que la hoja se seque. La infección de esta enfermedad se expande desde las hojas inferiores hasta las hojas superiores de la planta (Quiroga-Madriga *et al.*, 2017).

Después de la extensión de la enfermedad, esta afecta a todo el follaje, generando que la planta sea más liviana y los granos flojos, en algunos casos es por una germinación prematura por la misma enfermedad (Quiroga-Madriga *et al.*, 2017).



Figura 12. Plana de maíz infectada por CMA, se puede observar el desarrollo de la enfermedad de hojas inferiores a hojas superiores.

### 8.3.5. Escalas daño de CMA.

Las escalas de daño o de severidad, nos sirven para indicar que tan avanzada esta la enfermedad, a diferentes niveles (a nivel de hoja y planta).

Al ser el CMA al ser conformado por tres diferentes microorganismos, se propone proporcionar una resolución adecuada para los diferentes tipos grados de severidad (Quiroga-Madruga *et al.*, 2017).

También ya que la enfermedad se expande por cada puno de infección de *P. maydis*, esta se distribuye en cinco grados de severidad; las cuales se muestran en la Figura 13.

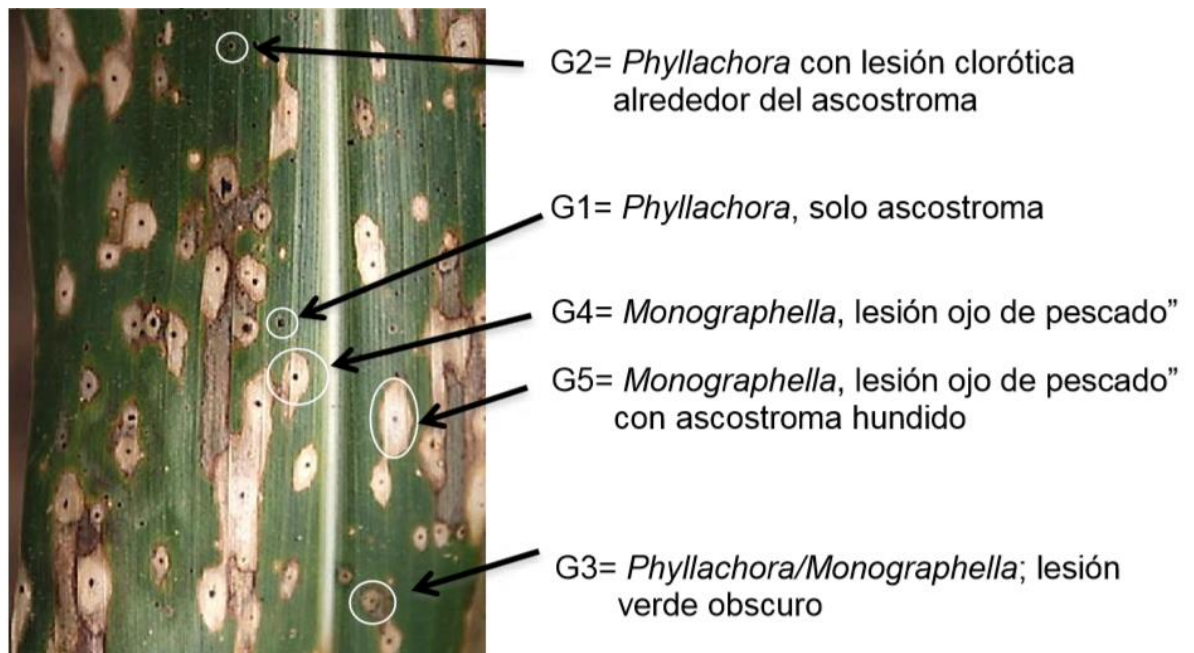


Figura 13. Desarrollo del proceso infeccioso (grados G1 y G5) del CMA.

Fuente: Quiroga-Madruga *et al.*, 2017

- **Escala de daño en hoja.** En esta se presenta el daño de la hoja reportado por Quiroga *et al.*, 2015, en donde describe el daño provocado por las múltiples lesiones del CMA partiendo de una hoja sana, a una hoja seca, como se puede observar en

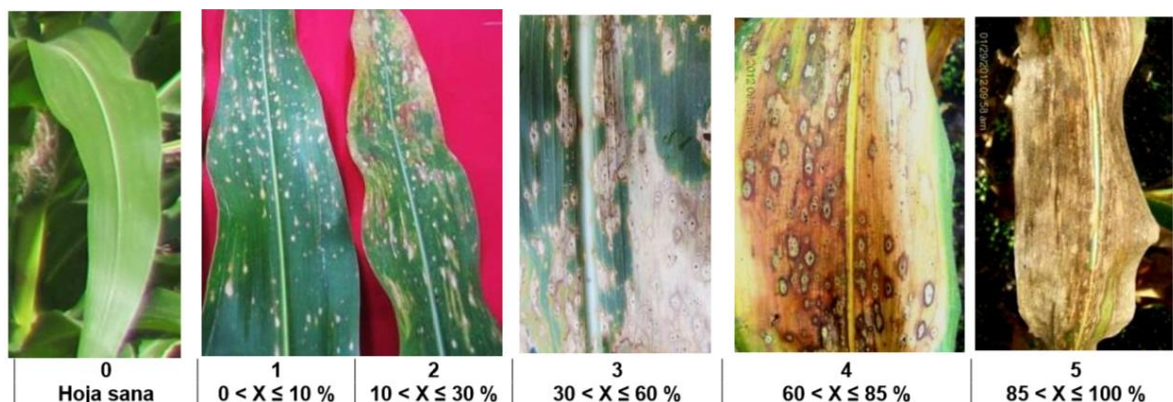


Figura 14. Severidad de daño de daño a nivel individual con valores en escala ordinaria y rango porcentual.

Fuente: Quiroga-Madrigal *et al.*, 2015

- **Escala de daño en planta.** Este sistema se refiere a como el CMA va secando a la planta, empezando por una planta sana seguido de la infección de *P. maydis* usando el halo necrótico en el punto negro de la infección.

Tabla 6. Clases de escala ordinal, índice de severidad y rango porcentual del CMA en planta completa.

Fuente: Quiroga-Madriga *et al.*, 2017

Clase	Índice de severidad	Rango (%)	Observaciones complementarias
0	Sin daño	0	Sin mancha alguna. Posibles pecas iniciales en hojas inferiores, menores a 0.1 mm sin confirmar presencia de hongos.
1	Daño ligero	$0 < X \leq 10$	Manchas con puntos negros brillantes y comienzo del halo necrótico alrededor del punto negro. Hasta un 10 % del tejido está dañado. En hojas inferiores solamente.
2	Daño moderado	$10 < X \leq 30$	Las manchas no alcanzan la hoja del punto de inserción de la mazorca. De 10 a 30 % de severidad de tejido foliar dañado.
3	Moderadamente severo	$30 < X \leq 60$	Las manchas necróticas alcanzan y superan la hoja del punto de inserción de la mazorca, pero no alcanzan las hojas superiores. De 30 a 60 % de severidad de daño del tejido foliar.
4	Severo	$60 < X \leq 85$	Las manchas necróticas se generalizan en la planta, excepto en dos a cuatro hojas superiores. De 60 a 85 % de severidad de daño del tejido foliar.
5	Muy severo	$85 < X \leq 100$	Necrosis generalizada de la planta. Hasta una o dos hojas superiores sin manchas o ninguna hoja (100 % de daño). Dependiendo de la fenología de la planta, se observan mazorcas sin grano o muy poco grano.

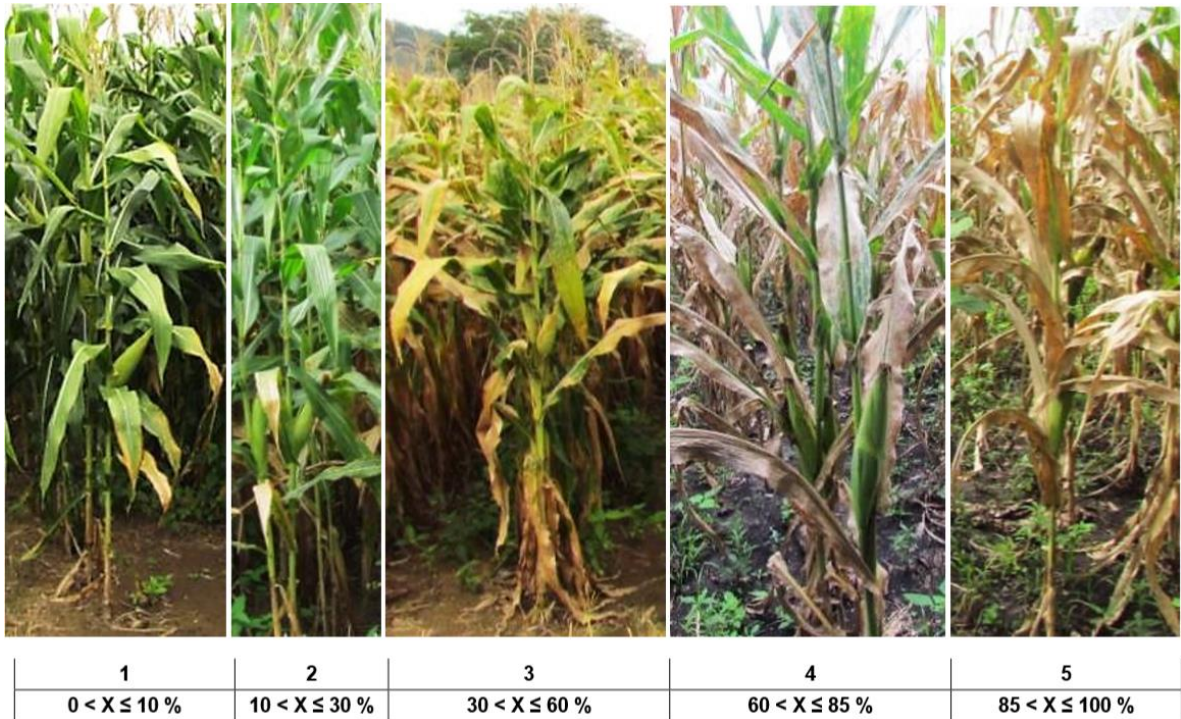


Figura 15. Escala pictórica de referencia de severidad de daño a nivel de planta individual con clasificación en rangos de 1 a 5 y rango de valores en porcentaje.

Fuente: Quiroga-Madruga *et al.*, 2017

#### 8.4. Técnicas de identificación de proteínas

Las proteínas de gran tamaño y peso molecular, formadas por formadas por cientos o miles de unidades más pequeñas llamadas aminoácidos, que están unidas entre sí por enlaces peptídicos en largas cadenas. Hay 20 tipos diferentes de aminoácidos que pueden combinarse para formar una proteína. La secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional única de cada proteína y su función específica (Dang & Van Damme, 2015).

Tabla 7. Función y descripción de las proteínas.

Función	Descripción
<b>Anticuerpo</b>	Los anticuerpos se unen a partículas extrañas específicas, como virus y bacterias, para ayudar a proteger el cuerpo
<b>Enzima</b>	Las enzimas llevan a cabo casi todas las miles de reacciones químicas que tienen lugar en las células. También ayudan con la formación de nuevas moléculas al leer la información genética almacenada en el ADN.
<b>Mensajero</b>	Las proteínas Messenger, como algunos tipos de hormonas, transmiten señales para coordinar procesos biológicos entre diferentes células, tejidos y órganos.
<b>Componente estructural</b>	Estas proteínas proporcionan estructura y soporte para las células. En una escala mayor, también permiten que el cuerpo se mueva.
<b>Transporte/almacenamiento</b>	Estas proteínas proporcionan estructura y soporte para las células. En una escala mayor, también permiten que el cuerpo se mueva.

La identificación de estas macromoléculas se puede dar, desde la reacción de los aminoácidos con algunos colorantes, hasta su identificación por espectrofotometría de masas (Cabello-Ruíz *et al.*, 2015).

#### 8.4.1. Método de Bradford

El método Bradford se usa para medir la concentración de proteína total en una muestra. El principio de este ensayo es que la unión de las moléculas de proteína al colorante de Coomassie en condiciones ácidas da como resultado un cambio de color de marrón a azul. Este método realmente mide la presencia de los residuos de aminoácidos básicos, arginina, lisina e histidina, lo que contribuye a la formación del complejo proteína-colorante. A diferencia del ensayo BCA, los agentes reductores (es decir, DTT y beta – mercaptoetanol) y los quelantes de metales (es

decir, EGTA) a baja concentración no causan interferencia. Sin embargo, la presencia de SDS incluso a bajas concentraciones puede interferir con la unión del colorante de proteína (Bradford, 1976).

#### **8.4.2. Electroforesis SDS – PAGE**

La separación de macromoléculas en un campo eléctrico se llama electroforesis. Un método muy común para separar proteínas mediante electroforesis utiliza un gel discontinuo de poliacrilamida como medio de soporte y dodecilsulfato sódico (SDS) para desnaturalizar las proteínas. El método se llama electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS - PAGE). El sistema más comúnmente utilizado también se conoce como el método Laemmli después de UK Laemmli, que fue el primero en publicar un documento que emplea SDS-PAGE en un estudio científico (Brunelle & Green, 2014).

SDS (también llamado lauril sulfato) es un detergente aniónico, lo que significa que cuando se disuelve, sus moléculas tienen una carga neta negativa dentro de un amplio rango de pH. Una cadena polipeptídica une cantidades de SDS en proporción a su masa molecular relativa. Las cargas negativas en SDS destruyen la mayor parte de la estructura compleja de las proteínas, y son fuertemente atraídas hacia un ánodo (electrodo cargado positivamente) en un campo eléctrico (Brunelle & Green, 2014).

Los geles de poliacrilamida impiden que las moléculas más grandes migren tan rápido como las moléculas más pequeñas. Debido a que la relación de carga a masa es casi la misma entre los polipéptidos desnaturalizados con SDS, la separación final de las proteínas depende casi por completo de las diferencias en la masa molecular relativa de los polipéptidos. En un gel de densidad uniforme, la distancia de migración relativa de una proteína ( $R_f$ ,  $f$  como subíndice) es negativamente proporcional al logaritmo de su masa. Si las proteínas de masa conocida se ejecutan simultáneamente con las incógnitas, se puede trazar la relación entre  $R_f$  y masa, y se pueden estimar las masas de proteínas desconocidas (Brunelle & Green, 2014).

La separación de proteínas por SDS - PAGE puede usarse para estimar la masa molecular relativa, para determinar la abundancia relativa de proteínas principales en una muestra, y para determinar la distribución de proteínas entre las fracciones. La pureza de las muestras de proteínas puede evaluarse y se puede seguir el progreso de un procedimiento de fraccionamiento o purificación. Se pueden usar diferentes métodos de tinción para detectar proteínas raras y aprender algo sobre sus propiedades bioquímicas. Las técnicas especializadas como Western Blot, electroforesis bidimensional y mapeo de péptidos se pueden utilizar para detectar productos genéticos extremadamente escasos, para encontrar similitudes entre ellos (Brunelle & Green, 2014).

- **Masa molecular versus peso molecular.** La masa molecular (símbolo  $m$ ) se expresa en Daltons (Da). Un Dalton se define como 1/12 de la masa de carbono 12. La mayoría de las macromoléculas son lo suficientemente grandes como para utilizar el kiloDalton (kDa) para describir la masa molecular. El peso molecular no es lo mismo que la masa molecular. También se conoce como masa molecular relativa (símbolo  $M_r$ , donde  $r$  es un subíndice). El peso molecular se define como la relación de la masa de una macromolécula a 1/12 de la masa de un átomo de carbono 12. Es una cantidad adimensional. Cuando la literatura da una masa en Da o kDa, se refiere a la masa molecular. Es incorrecto expresar peso molecular (masa molecular relativa) en Daltons. Sin embargo, encontrará el término peso molecular utilizado con Daltons o kiloDaltons en alguna literatura, a menudo usando la abreviatura MW para peso molecular.
- **Geles de poliacrilamida para SDS – PAGE.** Se han desarrollado muchos sistemas para la electroforesis de proteínas, y el aparato utilizado para SDS-PAGE varía ampliamente. La metodología utilizada en estas páginas emplea el método Laemmli. La referencia al método de Laemmli en una sección de materiales y métodos elimina la necesidad de describir los amortiguadores, fundición de geles, aparatos, etc. A menos que el documento emplee alguna modificación al método, los únicos detalles de SDS-PAGE que se deben informar en una la sección de métodos es porcentaje de acrilamida total (%)

T) en un gel, porcentaje relativo y tipo de reticulante (% C), y tal vez una referencia a las dimensiones del gel. Usamos un sistema de "mini-gel", con casetes de gel de 3 1/4 "x 4".

SDS - PAGE se puede realizar en geles prefabricados, lo que evita los problemas y el riesgo de trabajar con acrilamida. La siguiente descripción se aplica a los aparatos de colada y funcionamiento hechos en la tienda que son mucho más baratos que los equipos disponibles comercialmente. Además de la rentabilidad, la ventaja de hacer geles propios la primera vez es una comprensión más profunda del proceso. Independientemente del sistema, la preparación requiere fundir dos capas diferentes de acrilamida entre las placas de vidrio. La capa inferior (gel de separación o de resolución) es responsable de separar realmente los polipéptidos por tamaño. La capa superior (gel de apilamiento) incluye los pocillos de muestra. Está diseñado para barrer proteínas en una muestra entre dos límites móviles para que se compriman (apilan) en capas finas micrométricas cuando alcanzan el gel separador.

- **1D – SDS – PAGE.** La electroforesis unidimensional se puede realizar en ácidos nucleicos y proteínas. Una aplicación 1D muy famosa es la llamada electroforesis submarina en la que los ácidos nucleicos se separan en su longitud. La aplicación submarina se realiza en un sistema de electroforesis horizontal; están disponibles en muchos tamaños dependiendo del rendimiento requerido (Brunelle & Green, 2014).

Además de la horizontal, hay una electroforesis vertical, la horizontal se realiza principalmente con geles de agarosa, la vertical se realiza con poli acrilamida, por lo que a menudo se la denomina PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Dependiendo de la cantidad de muestras y otras aplicaciones, hay sistemas de electroforesis en diferentes tamaños disponibles. Algunos de los sistemas horizontales tienen un accesorio para realizar la transferencia del tanque.

- **2D – SDS – PAGE.** Actualmente, no hay ninguna otra técnica la cual sea capaz de resolver simultáneamente miles de proteínas en un procedimiento



de separación, la mejora más prometidas en la electroforesis (2-D) resulta de los geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG strip por sus siglas en inglés). 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 (Rabiloud & Lelong, 2011).

#### **8.4.3. Espectrofotometría de masas**

La proteómica es el estudio de todas las proteínas en un sistema biológico (por ejemplo, células, tejidos, organismos) durante eventos biológicos específicos. La genómica y la proteómica son considerablemente más difíciles de estudiar juntas que la genómica o incluso la transcriptómica sola, debido a la naturaleza dinámica de la expresión de proteínas. Además, la mayoría de las proteínas experimentan alguna forma de modificación postraducciona (PTM), aumentando aún más la complejidad proteómica. Durante los últimos 15 años, el amplio alcance de la proteómica apenas comienza a realizarse debido en gran parte a los avances tecnológicos en la espectrometría de masas (Di Girolamo *et al.*, 2013).

La espectrometría de masas es una técnica sensible que se utiliza para detectar, identificar y cuantificar moléculas en función de su relación masa / carga ( $m / z$ ). Originalmente desarrollado hace casi 100 años para medir los pesos atómicos elementales y la abundancia natural de isótopos específicos, la MS se utilizó por primera vez en las ciencias biológicas para rastrear isótopos pesados a través de sistemas biológicos. En años posteriores, se usó MS para secuenciar oligonucleótidos y péptidos y analizar la estructura de nucleótidos (Di Girolamo *et al.*, 2013).

El desarrollo de métodos de ionización de macromoléculas, incluida la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica

(APCI), permitió el estudio de la estructura de la proteína por MS. La ionización también permitió a los científicos obtener "huellas dactilares" de proteínas que podrían combinarse con proteínas y péptidos en bases de datos y ayudar a identificar blancos desconocidos. Los nuevos métodos de etiquetado isotópico condujeron a la cuantificación de proteínas diana tanto en cantidades relativas como absolutas. Todos estos avances tecnológicos han dado lugar a métodos que analizan con éxito muestras en estado sólido, líquido o gaseoso. La sensibilidad de los espectrómetros de masas actuales permite detectar analitos a concentraciones en el rango attomolar ( $10^{-18}$ ) (Di Girolamo *et al.*, 2013).

#### **84.4. 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 online. Si coincide con algún mapa teórico, la identificación es positiva (Di Girolamo *et al.*, 2013).

## **9. Metodología**

### **9.1. Material biológico**

#### **9.1.1. Muestras de CMA**

Las muestras realizadas en este experimento, fueron tomadas en la región de Guadalupe Victoria, en el municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas. Estas presentaban todos los niveles de infección de la enfermedad, en donde la mayor parte de este cultivo ya se encontraba seca.



Figura 16. Mancha de asfalto en cultivo de maíz en la zona de Guadalupe Victoria, municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas.

Las cepas del CMA se inocularon en plantas de la variedad H – 560, la cual es una variedad susceptible al complejo del CMA, sembradas en el periodo de Agosto – Octubre.

#### **9.1.2. Inoculación de las esporas del CMA**

Se preparó un extracto acuso de las esporas, macerando las muestras de hoja recolectadas y colocándolas en agua destilada usando una relación del 1:1 (m/v). Este extracto se filtró por gravedad usando gasas para retener la mayor cantidad de tejido vegetal posible. El extracto se observó en microscopio para verificar la presencia de alguno de los hongos.

Las muestras se colocaron en un aspersor atómico y se inocularon durante una semana en las plantas sanas con un mes de vida sobre la parte superficial de la hoja.

Las muestras se recolectaron después de 2 semanas de la aparición de *P. maydis*, las cuales presentaban los 5 grados de infección del hongo y se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 9.2. Obtención de extractos proteicos

Se cortaron las hojas con un bisturí de disección separando los diferentes grados de infección del CMA, hasta obtener 1 g de muestra. Después se colocó sobre un mortero y utilizando nitrógeno líquido se macero hasta obtener un y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Se añadió 1 mL del buffer de extracción (Ver Anexo) a cada tubo con la muestra, se agitó en vortex por un minuto y se incubó por 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El extracto se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recuperó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se guardó en congelación hasta su uso.

Cada parte del experimento se hizo por triplicado.

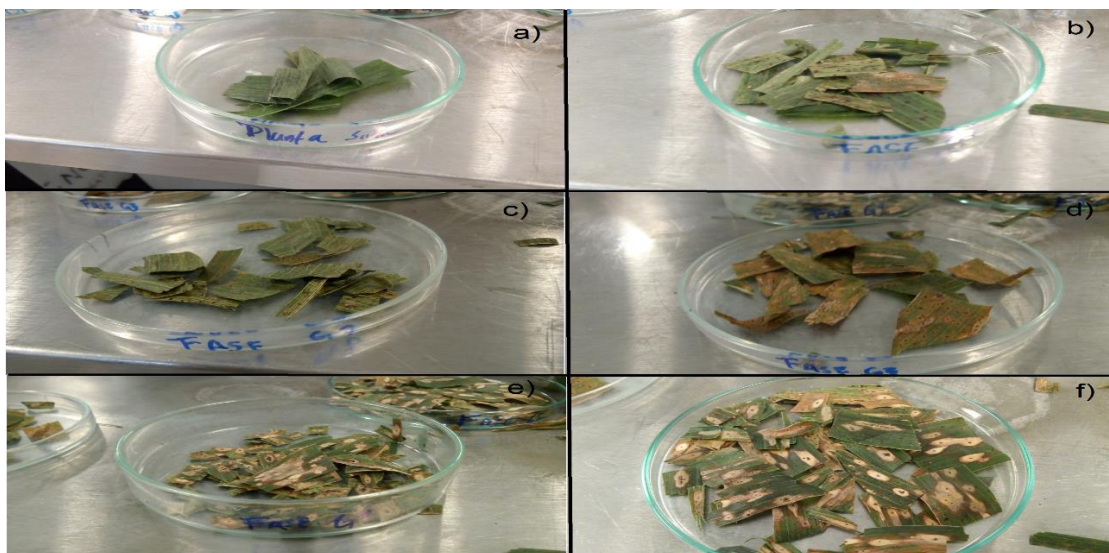


Figura 17. a) Planta sana, b) Fase G1, c) Fase G2, d) Fase G3, e) Fase G4, g) Fase G5.

### 9.3. Curva patrón de proteínas

En tubos de ensayo de 16x100 mm se agregaron las siguientes cantidades de albumina de suero bovino (BSA), partiendo de una solución patrón de 1 mg/mL agregando 1 mL de reactivo de Bradford en cada tubo y las cantidades de agua estéril correspondientes. Se leyó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm por triplicado como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de BSA para curva patrón de proteínas.

Concentración estándar BSA ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Volumen de solución Stock ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de agua ( $\mu\text{L}$ )	Volumen total ( $\mu\text{L}$ )
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
80	800	200	1000
100	1000	0	1000

### 9.4. Cuantificación de proteínas

En tubos de ensayo de 16x100 mm se adiciono 1 mL del reactivo de Bradford y 1 mL del extracto proteico. Se leyó la absorbancia a 595 nm y se calculó la cantidad de proteínas usando la ecuación de la recta generada por la curva patrón de proteínas.

### 9.5. Electroforesis 1D – SDS – PAGE

Con la finalidad de separar las proteínas por peso molecular, se utilizó la técnica de electroforesis de 1D – SDS – PAGE.

Se utilizó el equipo de electroforesis bidimensional (Bio-Rad): Protean IEF System para la primera dimensión, el cual, se esterilizo con alcohol al 70%.

### 9.5.1. Gel de separación

Se preparó al 4% a partir de una solución de Acrilamida-Bis 30%, Tris-HCl 1.5 M, SDS 10%, Persulfato de amonio 1%, agua destilada y TEMED ver cuadro 2, esta solución se mezcló igualmente por inversión, y se adicionó de igual manera que la solución anterior y se le colocó el peine para formar pozos de 1.5 mm, con las cantidades que se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición y cantidades del gel de separación.

Soluciones	Cantidad
<b>Acrilamida – Bis 30%</b>	0.32 mL
<b>Tris – HCl 1.5M pH 8.8</b>	0.62 mL
<b>SDS 10%</b>	25 µL
<b>Persulfato de amonio 1%</b>	125 µL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1.41 mL
<b>TEMED</b>	2.5 µL

### 9.5.2. Gel de apilamiento

Se preparó al 4% a partir de una solución de Acrilamida-Bis 30%, Tris-HCl 0.5 M, SDS 10%, Persulfato de amonio 1%, agua destilada y TEMED ver cuadro 2, esta solución se mezcló igualmente por inversión, y se adicionó de igual manera que la solución anterior y se le colocó el peine para formar pozos de 1.5 mm, con las cantidades que se muestra en la Tabla 9.

Tabla 10. Composición y cantidades del gel de apilamiento.

Soluciones	Cantidad
<b>Acrilamida – Bis 30%</b>	1.65 mL
<b>Tris – HCl 0.5M pH 6.8</b>	1.25 mL
<b>SDS 10%</b>	50 µL
<b>Persulfato de amonio 1%</b>	250 µL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	2.31 mL
<b>TEMED</b>	5 µL

### **9.5.3. Desnaturalización de las proteínas**

La desnaturalización de las proteínas se llevó mediante calentamiento a 95 °C durante cinco minutos en un termobloque.

Las muestras por cada grado de infección se prepararon colocando 10 µL del sobrenadante de la muestras + 10 µL de buffer Laemmli Sample 1x en tubos Eppendorf para PCR de 0.5 mL, mismo procedimiento se realizó para la albumina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL utilizado como control positivo. Después de transcurrida la desnaturalización se cargaron las muestras en cada uno de los pozos aproximadamente de 5 a 15 µL evitando que la muestra saliera del pozo; cargando en el primer carril una mezcla de marcadores de tamaño molecular seguido de BSA y las muestras en los carriles siguientes.

Una vez cargadas las muestras se ejecutó una corriente de 80 volts por 20 minutos y 120 volts por 40 minutos. Una vez que el tiempo de corrida transcurrió, se desmontó el equipo para extraer cuidadosamente del cassette los cristales y separarlos de manera que el gel quede posado sobre uno de los cristales, posteriormente se sumergió en una solución para teñir de colorante azul de coomassie por 20 minutos y una solución para desteñir por 40 minutos (Ver anexo).

## **10. Resultados y discusión**

### **10.1. Inoculación del CMA**

Se encontraron colonias de la fase asexual de *Microdochium maydis* (fase asexual de *Monographella maydis*) en la solución de esporas del CMA, las cuales tenían esporas alargadas ovoides y semitransparentes, que nos afirmaba la presencia de este hongo como se puede observar en la Figura 18.

Los resultados de la inoculación dieron respuesta a las 2 semanas después de la aplicación de esporas, donde estas ya presentaban la enfermedad del CMA con la fase inicial de *P. maydis* hasta la formación de halo necrótico provocado por *Monographella maydis*.



Figura 18. Fase asexual de *Monographella maydis* (*Microdochium maydis*) encontradas en la suspensión de esporas.

## 10.2. Curva patrón de proteínas

La ecuación de la recta generada por la curva patrón de proteínas por el método de Bradford, obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.9887 y una pendiente 0.0053 como se muestra en la Figura 19.

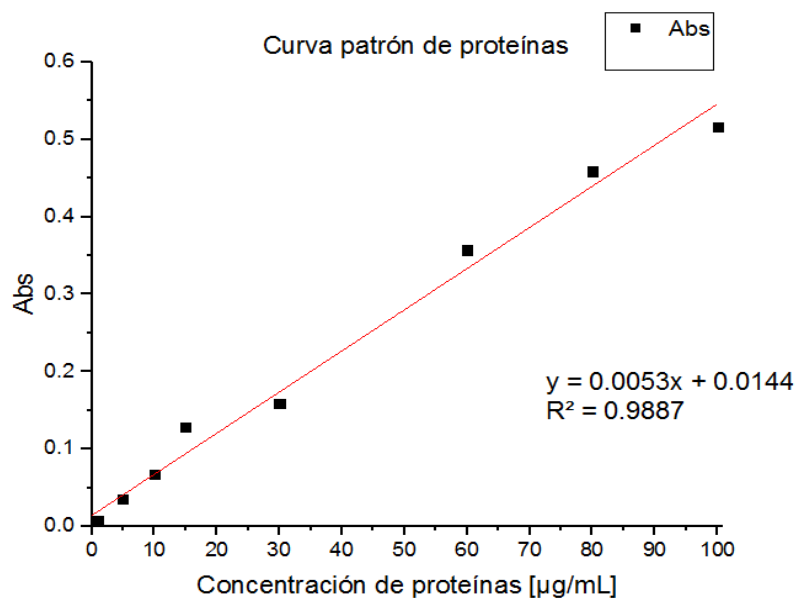


Figura 19. Curva patrón de proteínas por el método de Bradford.



### 10.3. Concentración de proteínas en CMA

Las concentración de proteínas se calculó usando la ecuación generada por la curva patrón de proteínas, después, se calculó el porcentaje de proteína encontrado en cada grado de la enfermedad usando como control positivo la planta sana, usando la siguiente formula:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{[\text{Concentración de proteína de CMA} \left(\frac{\mu\text{g de proteína}}{\text{mL de buffer}}\right)] [100\%]}{[\text{Concentración de hoja en buffer} \left(\frac{\mu\text{g de hoja}}{\text{mL de buffer}}\right)]}$$

En la Tabla 11 se puede observar que la cantidad de proteínas extraídas de las plantas dañadas, van disminuyendo conforme avanza el grado de infección del CMA, esto se debe a que la hoja se empieza a secar y por lo tanto los procesos metabólicos de la planta se desvían a otros sistemas que intentan detener la enfermedad y esta se seca, al punto de quedar una hoja marchita con una cantidad mínima de proteínas a comparación de la planta sana.

Tabla 11. Concentración promedio de proteínas por grado de infección del CMA y porcentaje de proteínas.

Grado de infección	Cantidad de proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de proteína
<b>Planta sana</b>	12,931.03	1.29
<b>G1</b>	9,413.79	0.94
<b>G2</b>	7,137.93	0.59
<b>G3</b>	6,655.17	0.66
<b>G4</b>	6,603.45	0.66
<b>G5</b>	5,913.79	0.59

### 10.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida 1D – SDS – PAGE

En la electroforesis se puede observar que a medida que la enfermedad va avanzando, la cantidad de proteínas presentes disminuye en comparación de una planta sana. Sin embargo, a partir del grado G3 se genera una nueva proteína entre los 20 y 15 kD, lo que nos puede indicar que es una toxina que provoca el

secamiento de la planta, debido a que a partir de este punto el halo necrótico es empieza a formarse como se ve en la Figura 19.

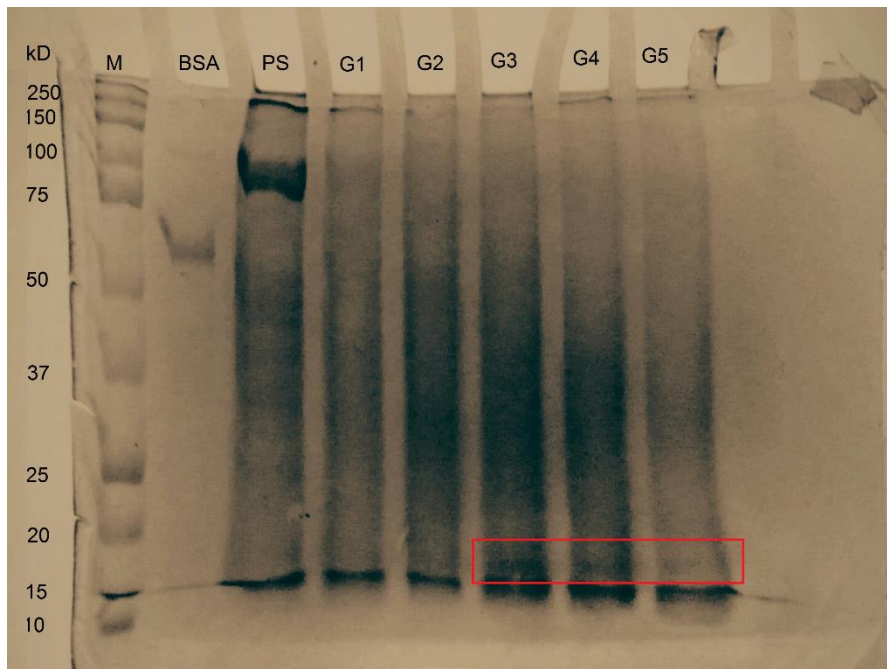


Figura 20. Electroforesis de las fases del CMA: M (marcador molecular), BSA (Albumina de suero bovino), PS (Planta sana), G1 – G6 (Grados de infección del CMA).

Debido a que no se cuenta con un equipo capaz de identificar el tipo de proteínas que es, podemos decir que esta es una cadena polipeptida pequeña.

Podemos descartar que sea una proteína que se genere por mecanismo de respuesta de la planta hacia la invasión de *P. maydis* e incluso como parte del sistema de infección del mismo hongo, ya que esta no se produce en los rangos de enfermedad G1 ni G2. Podríamos decir que el responsable directo de esta enfermedad se debe a la invasión de *Monographella maydis*, debido a que al inicio de la formación de halo necrótico la proteína empieza a sintetizarse hasta dejar seca a la planta. Dado que no conocemos la proteómica completa de ambos hongos no podemos dar un sistema de eliminación de quien la provoca o que grupo de proteínas pertenece.

## **11. Conclusión y recomendaciones**

El CMA es una enfermedad de avance desmedido que provoca un severo daño en la totalidad de la planta.

Las proteínas encontradas en el rango de 15 a 20 KD son responsables de la necrosis de la planta y así mismo de que esta se seque en su totalidad. La activación de los mecanismos de defensa del hospedador a la infección de *Monographella maydis* puede ser el causante de este grupo de proteínas que provoca su muerte, como también no se descarta la idea que sea una proteína que forma parte del metabolismo del huésped cuando este invade a la planta.

Es necesario conocer la estructura y composición de la proteína para poder determinar el agente causante de la muerte de la planta. La finalidad de este proyecto fue la identificación del genero correspondientes a las proteínas involucradas a la enfermedad del CMA, sin embargo, a falta del equipo que pudiese caracterizar a las proteínas esta no se pudo llevar a cabo.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la determinación del tamaño molecular de las proteínas producidas durante el desarrollo de la enfermedad de CMA.

### **Recomendaciones**

- Debido a que las proteínas de la planta del maíz son muy pocas, puede perderse gran parte de las proteínas totales en el transcurso del experimento, la maceración con nitrógeno líquido debe ser el mismo día de la toma de muestra.
- El tiempo en dominar la técnica de 1D – SDS –PAGE toma mucho tiempo, por lo que se recomienda paciencia y precisión al momento de aprender la técnica.
- Es preferible dar más tiempo de tinción al gel de electroforesis para tener bandas más nítidas.

## 12. Bibliografía

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. . *Analytical Biochemistry* , 72, 248-254.
- Brunelle, J., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods enzymol*, 151-159.
- Cabello-Ruíz, E. D., Molina-Salinas, G. M., Torres-de la Cruz, V. M., Núñez-González, M. A., Orandy-Cárdenas, A., Verde-Star, M. J., . . . Rivas-Morales, C. (2015). Actividad antimicrobiana del extracto proteico de hojas de Aloe vera. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41-46.
- Cázares-Sánchez, E., Chávez-Servia, J. L., Salinas-Moreno, Y., Castillo-González, F., & Ramírez-Vallejo, P. (2015). Variación en la composición del grano entre poblaciones del maíz (*Zea mays* L.) nativas de Yucatán, México . *Agrociencia*, 49: 15 - 30 .
- Corrales-García, L. L., & Ciro G., G. L. (2010). Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos. *Vitae*, 181-190.
- Dang, L., & Van Damme, E. J. (2015). Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*, 51-64.
- Di Girolamo, F., Lante, I., Muraca, M., & Putignani, L. (2013). The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current Organic Chemistry*, 17(23), 2891-2905.
- FIRA. (2016). *Panorama Agroalimentario*. México: Maíz.
- Hernández - Ramos, L., & Sandoval - Islas, J. S. (2015). Escala Diagramática de Severidad Para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33: 95-103.
- Hernández-Ramos, L., Sandoval-Islas, J. S., Mahuku, G., Benítez-Riquelme, I., & Cruz-Izquierdo, S. (2015). Genética de la resistencia al complejo mancha de asfalto en 18 genotipos tropicales de maíz. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 39-47.
- Hock J., K. J., & Renfro, B. (1995). Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology* , 44(3):490-502.
- Maublanc, A. (1904). Espèces nouvelles de champignons inferieurs. *Bulletin de la Société Mycologique de France*, 20-72.
- Orozco-Ramírez, Q., Perales, H., & Hijmans, R. J. (2016). Geographical distribution and diversity of maize (*Zea mays* L. subsp. *mays*) races in México. *Genet Resour Crop Evol*, 32-40.

- Parsons, D. (1982). Maíz: manuales para educación agropecuaria. *Trillas*.
- Quiroga-Madruga, R. R., Garrido-Ramírez, E. R., Rosales-Esquinca, M. d., & Salazar-Pinacho, W. M. (2017). *Manual técnico: Manejo integrado del complejo mancha de asfalto del maíz en México* (1 ed.). Tuxtla Gutiérrez: UNACH.
- Quiroga-Madruga, R., Garrido-Ramírez, E., Rosales-Esquinca, M., & Salazar-Pinacho, W. (2015). Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México: Universidad Autónoma de Chiapas-Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).
- Rabiloud, T., & Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal Proteomics*, 74(10), 1829-1841.
- Ríos-Herrera, E. N., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Landeros-Flores, J., Cepeda-Siller, M., & Rodríguez-Guerra, R. (2017). Hongos asociados a la mancha de asfalto en el cultivo de maíz en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 457-462.
- Ross-Ibarra, J., Sawers, R., & Hufford, M. B. (24 de Octubre de 2017). *Maize Diversity and Climate Change*. Obtenido de [escholarship.org](https://escholarship.org/uc/item/9v4627sv): <https://escholarship.org/uc/item/9v4627sv>
- SAGARPA. (2015). *Manual de plagas y enfermedades*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2017, de [http://www.cesaveg.org.mx/html/folletos/folletos\\_11/folleto\\_maiz\\_11.pdf](http://www.cesaveg.org.mx/html/folletos/folletos_11/folleto_maiz_11.pdf)
- SIAP. (2017). *Intención de siembra 2018*. Recuperado el 11 de Diciembre de 2017, de <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intension/Intenci%C3%B3n%20de%20siembraOI%202018porcultivo.pdf>
- USDA. (2016). *Corn production by country*. Recuperado el 5 de Noviembre de 2017, de <http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=corn>

### 13. Anexos

- Buffer de extracción

Solución	Cantidad
Tris – HCl	1.21 g
Ácido ascórbico	0.1 g
Glicerina	10 g
Polyvinylpolypirrolidona	1 g
B - mercaptoetanol	5 mL
<b>Ajustar pH 8 con HCl al 1% y aforar en matraz volumétrico de 100 mL</b>	

- Solución de laemmli 2X

Solución	Cantidad
Tris – base	65.8 mM
Glicerol	26.3%
SDS	2.1%
Azul de bromofenol	0.01%
<b>Ajustar pH 8 con HCl al 1%</b>	

- Buffer de corrida 1X

Solución	Cantidad
Tris – base	3 g
Glicerol	14.4 g
SDS	1 g
<b>Aforar en matraz volumétrico de 1 L</b>	

- Solución de tinción

Solución	Cantidad
Acido acético	10%
Metanol	40%
Azul de coomassie G - 250	0.1%
<b>Aforar con agua destilada al volumen requerido</b>	

- Solución para desteñir

Solución	Cantidad
Acido acético	10%
Metanol	40%
<b>Aforar con agua destilada al volumen requerido</b>	

- Solución de Bradford 5X
  - 1). 10 mg de azul de coomassie G-250.
  - 2). 5 mL de metanol.
  - 3). Filtrar en un filtro de fibra de vidrio.
  - 4). 10 mL de ácido fosfórico concentrado (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85%).
  - 5). Aforar a 20 mL con agua destilada.
- Esta solución es de una coloración rojiza oscura
- Es estable indefinidamente en botella ámbar y a 4°C.