

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRICOLAS
MARACAY

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
AISLAMIENTOS DE *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenber EN MAIZ
(*Zea mays* L.) DE ALGUNAS LOCALIDADES DE LOS ESTADOS
ARAGUA Y GUÁRICO DE VENEZUELA**

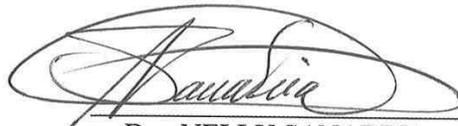
Félix Lorgio Manrique R.

Tutora: Dra. Nelly Sanabria

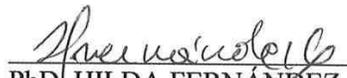
Maracay, Febrero de 2014

TESIS DOCTORAL PRESENTADA COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR AL
TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

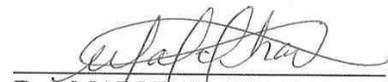
COMITÉ CONSEJERO



Dra. NELLY SANABRIA



PhD HILDA FERNÁNDEZ



Dra. MARLENY CHAVARRI



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
 FACULTAD DE AGRONOMÍA
 COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
 DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Agronomía y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: **FÉLIX MANRIQUE RODRÍGUEZ**, Cédula de identidad N° 4.512.333, bajo el título "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenher EN MAÍZ (*Zea mays* L.) DE ALGUNAS LOCALIDADES DE LOS ESTADOS ARAGUA Y GUÁRICO DE VENEZUELA" a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 20 de Febrero de 2014 a las 09:00 AM., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Salón "D" del Doctorado en Ciencias Agrícolas, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **aprobarlo**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa un aporte de información valiosa y actual de la presencia del patógeno en zonas para producción de semillas de maíz. Por primera vez en Venezuela, se implementa el uso de un marcador molecular específico que permite la identificación de *Fusarium verticillioides* de manera más confiable, sencilla y rápida.



[Handwritten signatures]

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 20 días del mes de Febrero del año 2014. Conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado la **Dra. Nelly Sanabria**.



CATALINA RAMIS JAUME
C.I. 5.614.038
FAGRO-UCV
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad



MARTA G. BARRIOS SÁNCHEZ
C.I. 5.276.035
FAGRO-UCV
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad



ALEX D. GONZALEZ VERA
C.I. 8.169.728
Fundación Agrícola DANAC
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



MARÍA SULEIMA GONZÁLEZ
C.I. 7.013.313
INIA-CENIAP
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



NELLY SANABRIA
C.I. 3.919.310
FAGRO-UCV
Tutor



/rya.-
20-02-14

DEDICATORIA

A Nuestro DIOS por sobre todas las cosas, quien siempre me guía y acompaña.

A mi MADRE por su eterno Amor de siempre.

A mi PADRE por su ejemplo de trabajo y tenacidad†.

A NEMESIA†, que no estando desde hace mucho, siempre esta presente en mis aciertos y desaciertos.

A FELIX LORGIO, JHOANYS VANESSA, DIEGO ALEJANDRO y LORGIO ALEJANDRO, mis hijos que son mi inspiración y me llenan de valor.

A mis hermanos RAMÓN, EDMUNDO, DANIEL Y DAVID†, quienes también sustentan mi vida.

Y especialmente a aquellos que han dado todo por nuestro país para que vivamos mejor.

AGRADECIMIENTOS

Nuevamente a DIOS, que ha dado a su hijo unigénito para que seamos salvos por su sangre derramada. Tengo pruebas de que existes Padre Nuestro.

Agradezco a CLELIA DEL CARMEN, mi madre que con su gran amor y esfuerzo de lo más íntimo de su ser, todavía guía mis pasos y me esfuerza para alcanzar siempre nuevas metas.

A NEMESIA, abuela y gran maestra, a quien también debo mis logros, que con sus consejos visionarios que trascendieron, aún en mucho tiempo de su ausencia física, siguen siendo la luz del camino que recorro.

A mis hijos, que aún habiendo tolerado mi larga ausencia, supieron llevar consigo las afrentas que hoy día me han dado luz para impartir a quienes debo por deber.

A mis Hermanos, quienes crecimos juntos bajo el calor de un hogar lleno de amor y que por sus esfuerzos he podido escalar un peldaño más en mi vida.

A mi Tutora, Dra. NELLY SANABRIA, quien con sus orientaciones acertadas hizo que este logro se hiciera realidad, aún en las adversidades que se presentaron.

A mi entrañable padre, amigo, hermano y profesor LUÍS SUBERO, que con su vasta experiencia también me guió acertadamente por este camino, que sin su ayuda habría sido mucho más difícil recorrer este camino.

A la profesora CATALINA RAMIS, que muy desinteresadamente se desprendió de muy importantes compromisos y actividades, para orientarme y ayudarme a desifrar circunstancias cruciales que están presentes en este largo recorrer.

A mí estimadísimo y siempre apreciado amigo y hermano, ejemplo de perseverancia JOSÉ A. LÓPEZ F.

Al Dr. EDUARDO GRATEROL, amigo entrañable y hombre de bien por su desinteresada ayuda prestada. Al Dr. ALEX GONZÁLEZ, por su valiosa ayuda y colaboración. A la Fundación DANAC, a sus excelentes investigadores Ing.M.Sc. NATALIA LABRIN, Ing. ROSELIA GALLUCHI y a la Técnico SARA.

A la profesora HELEN y profesor OLIVIER por su valiosa colaboración y orientación.

A la profesora JOSELIN ASCENCIO, por sus sabios consejos y por brindarme su amistad muy sincera. A las Profesoras GIOVANNA SANTANA y DAYANA PÉREZ por su colaboración.

A las Dras. HILDA FERNANDEZ y MARLENI CHAVARRI por sus orientaciones y recomendaciones.

A mi excelentísimo amigo profesor GANIMEDES por sus sabios consejos. A mí distinguido amigo profesor EDUARDO GÓMEZ RIVAS “JHON” por su colaboración durante mi estadía en la ciudad de Maracay. A mi estimadísimo amigo profesor e investigador CARLOS MARÍN, por sus orientaciones y por brindarme su excelente amistad.

A todos los Profesores del Doctorado en Ciencias agrícolas de la UCV por sus enseñanzas, estímulo y amistad.

A la Memoria del Dr. EDUARDO CASANOVA†, brillante profesor e investigador de quien aprendí mucho.

A mis excelentes amigas GABRIELA y MARITZA de la clínica de enfermedades.

A mi excelente amigo HÉCTOR VERDE por su valiosa colaboración y ayuda.

A mis excelentísimas amigas CATEARIS, JACKELINE y KARINA, del Doctorado y de Control de Estudios del Postgrado por sus orientaciones, apoyo y amistad.

A ZULY y ADOLFO del Postgrado en Agronomía por su apoyo y bella amistad.

A los Profesores Jesús Abreu y Luis José Marcano del IUT Tucupita por su apoyo y solidaridad.

A los profesores LUIS ALFREDO MARÍN, CHANEL y NERIDA TRILLO, directivos del IUT Dr. Delfín Mendoza, por su valiosa colaboración y ayuda, la cual sin ella no hubiera sido posible esta investigación.

Al Prof. José Medrano por su solidaridad y amistad.

A la Universidad Central de Venezuela (U.C.V) “la casa que vence las sombras” por darme la oportunidad y el apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
Pudrición de la mazorca de maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenber.	5
Importancia de la enfermedad.	6
Síntomas de la enfermedad.	8
Etiología.	9
Epidemiología.	11
Control.	12
Toxinas producidas por <i>F. verticillioides</i> y otros patógenos del maíz.	18
Fumonisinias.	20
Efectos de las fumonisinias y otras toxinas en humanos y animales.	23
Marcadores Moleculares.	25
Técnicas moleculares para la identificación de <i>F. verticillioides</i> y otros patógenos.	26
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	29

Identificación molecular de especies de <i>F. verticillioides</i> con el uso de marcadores moleculares.	31
BIBLIOGRAFIA CITADA	34
CAPITULO II. Identificación e incidencia de aislados de <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenber en maíz proveniente de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico.	60
INTRODUCCIÓN	60
OBJETIVO GENERAL	61
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
MATERIALES Y METODOS	62
Muestreo, procedencia del material a evaluar y ubicación de los ensayos.	62
Aislamiento de <i>F. verticillioides</i> presentes en las muestras colectadas.	62
Incidencia de <i>F. verticillioides</i> en los granos de maíz.	63
Evaluación de la patogenicidad de <i>F. verticillioides</i> en maíz.	65
Obtención del inóculo.	65
Preparación de las plántulas.	65
Inoculación.	65
Identificación Taxonómica de <i>F. verticillioides</i> .	66
Análisis estadístico de los resultados.	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
Muestreo, procedencia y aislamiento de <i>F. verticillioides</i> del material evaluado.	68
Incidencia de <i>Fusarium verticillioides</i> en los granos de maíz.	70
Evaluación de la patogenicidad de <i>Fusarium verticillioides</i> en maíz.	74
Identificación Taxonómica de <i>F. verticillioides</i> .	74
CONCLUSIONES	79
RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA CITADA	81
CAPÍTULO III. Caracterización Molecular de los aislamientos de	

<i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenber, procedentes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico.	85
INTRODUCCIÓN	85
OBJETIVO GENERAL	91
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	91
MATERIALES Y MÉTODOS	92
Ubicación de los ensayos.	92
Crecimiento y desarrollo del hongo en medio líquido.	92
Extracción del ADN de <i>Fusarium verticillioides</i> .	93
Detección del ADN por electroforesis y visualización del producto de PCR.	94
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	94
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
Análisis molecular.	97
Extracción y detección del ADN de <i>Fusarium verticillioides</i> .	97
Caracterización por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	98
CONCLUSIONES	104
RECOMENDACIONES	105
BIBLIOGRAFÍA CITADA	106

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Pág.
1	Toxinas producidas por <i>F. verticillioides</i> y otros patógenos en maíz.	21
2	Evaluación del porcentaje de incidencia de <i>F. verticillioides</i> en granos de maíz de diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.	64
3	Procedencia y número de aislados de <i>F. verticillioides</i> del muestreo realizado en las diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.	69
4	Análisis de la Varianza de los promedios de la incidencia de <i>F. verticillioides</i> en maíz provenientes de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente.	70
5	Porcentajes de incidencia de <i>F. verticillioides</i> en granos de maíz provenientes de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente.	71
6	Reativos para la reacción de amplificación en el PCR del ADN con los iniciadores VER1 y VER2 de aislados de <i>F. verticillioides</i> en maíz provenientes de diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.	95
7	Concentración del ADN (ng/ μ l) de cada uno de los aislados de <i>F. verticillioides</i> en maíz provenientes de diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.	98
8	Aislados de <i>F. verticillioides</i> en maíz provenientes de ocho y seis	

localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente, que amplificaron (+) con la banda esperada.

100

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	Estructura química de la fumonisina.	23
2	A y B. Plantas y mazorcas sin síntomas. C y D. Plantas y mazorcas con síntomas, muestreadas para aislamientos de <i>F. verticillioides</i> .	68
3	Incidencia de <i>F. verticillioides</i> en maíz de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente.	72
4	Granos de maíz colonizados por <i>F. verticillioides</i> . A. Vista de la cara superior de las colonias. B. Vista del reverso de las colonias.	73
5	Síntomas de la enfermedad causada por <i>F. verticillioides</i> en plantas inoculadas a los 21 días. A. Enrollamiento de la hoja. B. Mancha traslúcida de aspecto aceitoso.	75
6	Colonia de <i>F. verticillioides</i> de 7 días de creciendo en PDA. A. vista de la cara superior de la colonia. B. vista por el reverso.	75
7	A. Microconidios de <i>F. verticillioides</i> . B. Microconidios en monofiálides. C. Microconidios en cadena. D. Macroconidios.	76
8	Visualización de la calidad de los ADN de <i>Fusarium verticillioides</i> en gel de agarosa al 1,2 %. λ : 100 pb; λ : 50 pb.	97
9	Identificación de <i>F. verticillioides</i> mediante PCR. M1: Marcador de 100 pb; C+: Control positivo, (<i>F. verticillioides</i>); 1: F60; 2 F34; 3: F47; 4: F38; 5: F26; 6 F41; 7: F28; 8: F13; 9: F16; 10: F85; 11:	

F17; 12: F5; 13: F7; C-: Control negativo (*Piricularia*); M2:
Marcador 50 pb. 99

10 Identificación de *F. verticillioides* mediante PCR. M1: Marcador
de 100 pb; C+: Control positivo, (*F. verticillioides*); 1: F58; 2 F29;
3: F20; 4: F31; 5: F37; 6 F53; 7: F54; 8: F55; 9: F57; 10: F62; 11:
F63; 12: F91; 13: F75; C-: Control negativo (*Piricularia*); M2:
Marcador 50 pb. 99

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		Pág.
1	Planillas de identificación de los aislados de <i>F. verticillioides</i> caracterizados morfológicamente (1/15-15/15).	113
2	Reactivos, soluciones y cálculos necesarios para la extracción del ADN de <i>F. verticillioides</i> .	128
3	Concentración original de los ADN de <i>F. verticillioides</i> y cálculos para llevarlos a una concentración de 10 ng/μl.	130
4	Cálculos de los reactivos utilizados para el PCR de los aislados de <i>F. verticillioides</i> de acuerdo a Rahjoo <i>et al.</i> , 2008 y Mulé <i>et al.</i> , 2004.	133
5	Planillas para la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	137

RESUMEN

La presencia de *Fusarium verticillioides* y de altos contenidos de fumonisinas en los granos de maíz ha sido verificada consistentemente en los últimos años en Venezuela, por lo que es muy importante determinar la incidencia de este hongo en el cultivo y en los granos almacenados que se destinan para el consumo humano y animal. Este patógeno, caracterizado por su variabilidad en cuanto a las características morfológicas, moleculares y toxigénicas, afecta el cultivo de maíz en muchas localidades de los estados Aragua y Guárico. Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar morfológica y molecularmente aislados de *F. verticillioides* en maíz, provenientes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico, donde se muestrearon fincas en producción, colectando granos y plantas con y sin síntomas de la enfermedad causada por este patógeno. De estas muestras se realizaron aislamientos, con la finalidad de detectar la presencia de *F. verticillioides*. Para evaluar la incidencia del hongo en los granos, se tomaron 200 granos por cada tratamiento o localidad, con cuatro repeticiones de 50 granos cada una, colocando cinco granos por cápsula Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA). Se realizó un análisis de varianza y una prueba de medias de Tukey. Para la evaluación de la patogenicidad, el inóculo se obtuvo a partir de cada uno de los aislados puros de *F. verticillioides*, utilizando para ello plántulas de maíz sanas de siete días, del híbrido Dorado 5 de la empresa SEFLOARCA. Se asperjaron con la suspensión de conidios de cada uno de los aislados de *F. verticillioides* a la concentración de 1×10^6 conidios/ml, luego se colocaron en cámara húmeda por tres días. A los 14 días después de la inoculación se realizaron los reaislamientos respectivos, de plantas con y sin síntomas, con el propósito de verificar la patogenicidad de cada uno de los aislados. Para la caracterización morfológica del patógeno, se llevó a cabo la siembra en PDA de cada uno de los 101 aislados, realizando preparados microscópicos y microcultivos. Para confirmar la identidad de los diferentes aislados de *F. verticillioides* se consideraron las características macroscópicas y microscópicas, que permitieron realizar las descripciones. Para el análisis macroscópico se consideraron el color, relieve, forma y rapidez de crecimiento de la colonia. Para la caracterización microscópica se consideraron la forma y el tamaño de los macroconidios, microconidios, conidióforos, fiálides y la presencia o no de clamidosporas. Luego se realizaron comparaciones con las claves logrando caracterizar 101 aislados y ubicándolo dentro de la especie *F. verticillioides*. En cada uno de los aislados se procedió al análisis molecular por medio de la técnica de PCR. Se obtuvo ADN de cada uno de los aislados y se cuantificó, se verificó la calidad en geles de agarosa al 1,2%, se analizaron 77 aislados identificados y caracterizados morfológicamente. Para la identificación molecular se utilizaron los iniciadores VER1 y VER2. Los resultados encontrados confirman la identificación macroscópica y microscópica de los aislados de *F. verticillioides* en medio PDA al compararlas con las descripciones de las claves taxonómicas. De los 101 aislados caracterizados morfológicamente, todos fueron identificados como *F. verticillioides* y de los 77 aislados caracterizados morfológicamente, cuando se aplicó la prueba de PCR se confirmó su identificación. La presencia de *Fusarium verticillioides* en todas las localidades indicó que es un patógeno muy importante en los campos comerciales de maíz en los estados Aragua y Guárico.

Palabras clave: *Fusarium verticillioides*, maíz, incidencia, identificación molecular.

ABSTRACT

The presence of *F. verticillioides* and high levels of fumonisin in corn kernels have been consistently verified in recent years in Venezuela, thus it is very important to determine the incidence of the fungus in the field crop and in stored grains for human and animal consumption. The pathogen which is characterized by its variability in morphological, molecular and toxigenic traits affect the corn crop in many regions of Aragua and Guárico states. The present study is oriented towards the morphological and molecular characterization of isolates from *F. verticillioides* on maize plants sampled in the field, collecting grains and plants with and without the symptoms of the disease. Isolates were performed to detect the presence of *F. verticillioides* and in order to assess the impact of the fungus in grains, 200 grains were taken for each treatment or region, with 4 replicates of 50 grains each and five grains placed per Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA). Analysis of variance and Tukey test were performed and for pathogenicity evaluation the inoculum was obtained from each of the 101 pure isolates of *F. verticillioides*, using healthy 7 day old seedlings from corn hybrid Dorado 5 obtained from a commercial dealer (SEFLOARCA). Seedlings were sprayed with the conidia suspension of each of the isolates at a concentration of 1×10^6 conidia/ml and then placed in a moist chamber for 3 days. At 14 days after inoculation reisolation was performed in plants with and without symptoms, with the purpose of verifying the pathogenicity of individual isolates. Taxonomic identification of the pathogen was carried out on PDA using each of the 101 isolates, for microscopic preparations and microcultures. In order to confirm the identity of the different isolates of *F. verticillioides* macroscopic and microscopic features that allowed for descriptions were used, considering their color, relief, shape and speed of growth of the colony for the macroscopic analyses and the shape and size of macroconidia, microconidia conidiophores, phialides and the presence or absence of chlamydospores for microscopic characterization. Comparisons were performed using the appropriate keys for *F. verticillioides* species. For each of the isolates molecular analysis by PCR was performed and DNA from each of the isolates was obtained, which quality was tested and verified in agarose gel 1.2%, resulting in good quality, and 77 isolates were analyzed morphologically, identified and characterized. For molecular identification VER1 and VER2 primers were used. The results confirm the macroscopic and microscopic identification of the isolates of *F. verticillioides* on PDA when compared with the descriptions of taxonomic keys. Of the 101 isolates characterized morphologically, all were identified as *F. verticillioides* and 77 isolates characterized morphologically confirmed the identification of the pathogen when the PCR test was applied. The presence of *Fusarium verticillioides* in several sites indicates that this is a very important pathogen in commercial corn fields in Aragua and Guárico States.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, corn, incidence, molecular identification, PCR.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El maíz es originario de México y los tipos más desarrollados fueron llevados hacia otros lugares de América; Cristóbal Colón lo vio en la isla de Cuba en 1472. La primera publicación de su descripción fue por Pedro Martín de Angleria en 1511. Según Linneo, el maíz pertenece a la familia Poaceae según la clasificación hecha por Cronquist (antigua *Gramineae*), tribu *Maydeae*, género *Zea* y especie *Zea mays*. Morfológicamente la planta está conformada por un tallo simple con nudos compactos que pueden desarrollar hijos basales. Las hojas se desarrollan en la parte superior de los nudos en forma dística o alternada, son largas, de gran tamaño, lanceoladas y con nervaduras paralelas. Se encuentran abrazadas al tallo en la base (vainas) y por el haz presenta vellosidades. Los extremos de las hojas son muy afilados y cortantes. La inflorescencia masculina es una panoja la cual es la terminación del tallo, allí se encuentran las flores masculinas agrupadas en espiguillas pareadas. La mazorca o inflorescencia femenina, es el término de una o más ramas laterales que generalmente se desarrollan después de la mitad superior del tallo; las raíces son adventicias (Fontana y González, 2000; White, 2000).

El cultivo del maíz (*Zea mays* L.) es de importancia alimenticia a nivel mundial, tanto para humanos como para animales. Son plantas de una adaptabilidad muy amplia a las condiciones de clima y suelos, sin embargo con frecuencia son afectadas por muchos organismos fitopatógenos, los cuales ocasionan trastornos que alteran su fisiología, ocasionando modificaciones en su estructura, lo que repercute en una significativa disminución de sus rendimientos (Fontana y González, 2000; White, 2000).

Según Vander Merwe *et al.* (1981) existen evidencias arqueológicas encontradas en Parmana, en la Guayana Venezolana, las cuales indican que el maíz se convirtió en un alimento importante en toda la extensión del río Orinoco, entre los años 800 AC y 400 DC.

El maíz es el principal cereal que se utiliza como fuente de alimento (Segovia y Alfaro, 2009). En casi todos los países de América constituye el alimento de mayor importancia. Este cultivo tiene un amplio aprovechamiento en el consumo humano y animal, también en

la industria, se puede usar en forma directa tales como: cachapas, bollos, arepas de maíz pelado, caratos, chichas, mazorcas salcochadas, entre otros, y en subproducto entre los que destacan hojuelas, harinas precocidas para arepas, cachapas, alimentos para bebés entre otros (Fontana y González, 2000); por lo que es uno de los cultivos de mayor consumo en Venezuela, se cultiva en la mayoría de los estados, siendo los de mayor producción en orden descendente: Portuguesa, Guárico, Barinas, Yaracuy y Bolívar (Martin *et al.*, 2001; Raybaudi *et al.*, 2005; FAO, 2008; MAT, 2012). Para el año 2012 se sembraron aproximadamente 691.498 hectáreas, para una producción superior a los 2.459.513 millones de toneladas métricas (MAT, 2012).

El desarrollo y la producción del cultivo del maíz se ve afectado por las frecuentes enfermedades que lo afectan (Malaguti, 2000). Las más comunes son las causadas por factores bióticos, donde intervienen los insectos, hongos, bacterias y virus, como también las ocasionadas por factores abióticos debido a causas ambientales (Agrios, 2006; White, 2000).

Las condiciones climáticas tropicales, en las cuales está ubicada Venezuela, son propicias para el crecimiento y desarrollo de muchos hongos patógenos que afectan al maíz y algunos de estos producen micotoxinas (Angelo, 1997; Jones *et al.*, 1981; Magan, 2000).

En el cultivo del maíz se presentan muchas enfermedades que afectan el rendimiento y la calidad de las semillas, entre las cuales las más limitantes son las fúngicas tales como: Tizón del sur, agente causal: -Anamorfo (*Bipolaris maydis*) -Teleomorfo (*Cochliobolus heterostrophus*) (*Helminthosporium maydis*). Tizón del norte, -Anamorfo (*Exserohilum turcicum*, Leonar & Suggs) -Teleomorfo (*Setosphaeria turcica*, Lutrell). Mancha gris de la hoja o Cercosporiosis, -Anamorfo (*Cercospora zea maydis*, Tehon & Daniels) -Teleomorfo (*Mycosphaerella* sp.). Roya común del maíz, (*Puccinia sorghi*, Shwein). Roya americana, (*Puccinia polysora*, Underw). Roya tropical, (*Physopella zae*, Mains). Carbón del maíz, (*Ustilago maydis*) (DC). Fusariosis en maíz, Pudrición del tallo y la mazorca, -Anamorfo (*Fusarium verticillioides*) J. Sheld) -Teleomorfo (*Gibberella fujikuroi*) (Sawada), *Diplodia* sp., Falsa punta loca del maíz ó Mildiu lanoso, (*Peronosclerospora sorghi*), Mancha bandeada (*Rhizoctonia solani*) y Pudrición basal (*Pythium spp*). (White, 2000).

Entre los hongos que afectan a este cultivo en cualquiera de sus etapas de desarrollo está *F. verticillioides*, el cual es uno de los patógenos de mayor importancia ya que causa

daño a las plántulas, pudrición de la raíz, tallo, mazorca y espiga (Agrios, 2006; McGee, 1998; Riera, 1999), originando pérdidas económicas debido a las inversiones de preparación de tierras con el uso de maquinarias y mano de obra, costos de las semillas, uso de plaguicidas entre otros insumos que son requeridos para el establecimiento del cultivo de maíz (Wu, 2007).

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg. (Teleomorfo *Gibberella moniliforme* Winwland) (Sin. *Fusarium moniliforme*), es un patógeno de mucha importancia; del complejo *Gibberella fujikuroi*, estado perfecto asociado a las especies del género *Fusarium*, pertenece a la sección *Liseola* y *Elegans*. Su clasificación Taxonómica según Leslie y Summerell, 2006 se ubica en la División: *Ascomycota*, Subdivisión: *Pezizomycotina*, Clase: *Sordariomycetes*, Subclase: *Hypocreomycetidae*, Orden: *Hypocreales*, Familia: *Hypocreaceae*, Genero: *Fusarium*, Especie: *F. verticillioides*. Está ampliamente distribuido en todas las zonas tropicales y subtropicales donde el maíz es cultivado; tiene un amplio rango de hospederos de importancia económica además del maíz, como el sorgo, el trigo, espárragos, caña de azúcar, higo, pino, cebada. Este hongo afecta al maíz y el sorgo causando la enfermedad conocida como “Pudrición del tallo y de la mazorca” (McGee, 1988; Desjardins, 2006; Leslie y Summerell, 2006) y ocasionando la contaminación de los granos con fumonisinas, incluyendo los casos en que la enfermedad es asintomática (Pascale *et al.*, 1997). Es un hongo saprófito de mucha actividad tanto en los restos de cosecha como en el suelo. Desde allí y en condiciones ambientales favorables infecta al tallo, o bien a los granos a través de los estigmas cuando los conidios son transportados por el viento (Mazzani, 2002).

La presencia de *F. verticillioides* ha sido verificada consistentemente en los últimos años en Venezuela, como también altos contenidos de fumonisinas en los granos de maíz (Luzón *et al.*, 2003; 2007; Mazzani *et al.*; 2001). Así mismo, varias especies de hongos se detectaron en un ensayo de comportamiento de genotipos de maíz amarillo ante este patógeno en dos localidades de Venezuela. Aunque la frecuencia e incidencia fue baja, sin embargo, hubo predominancia de dicho hongo (Luzón *et al.*, 2003).

Es muy importante determinar la incidencia de *F. verticillioides* en los cultivos de maíz, así como en los granos almacenados que se destinan para el consumo humano y animal, como también de la semilla que se utilizará para las futuras siembras, porque si no

se toma en cuenta la sanidad de ésta, se podría trasladar al patógeno a lugares donde no existe; así mismo, no es menos importante la identificación precisa de las diversas especies de *Fusarium* que atacan al maíz. También, es de vital importancia realizar un diagnóstico de la presencia de otros patógenos tanto en el campo como en los granos almacenados lo cual garantizará al productor o agricultor una semilla sana.

La identificación taxonómica por medio del uso de claves de las especies, es importante para su determinación y clasificación, sin embargo en ocasiones existen organismos que al ser identificados por medio de estas claves aparentan ser idénticos cuando en realidad son diferentes genotípicamente, sin embargo pueden existir diferencias en cuanto a la capacidad de sintetizar algunas toxinas u otros elementos en mayor o menor proporción. Con las nuevas técnicas moleculares que se utilizan en la biología molecular para identificar y clasificar organismos con exactitud, se pueden descubrir nuevas especies, que antes se pensaba eran organismos de una misma especie. De allí la importancia de caracterizar por medio de la técnica de marcadores moleculares, los aislados que se obtengan de *F. verticillioides*, esto es fundamental porque puede ser una herramienta útil a la agroindustria y a los entes reguladores de alimento detectar organismos patógenos toxigénicos.

El hongo *F. verticillioides* afecta el cultivo de maíz en muchas localidades de los estados Aragua y Guárico; este patógeno presenta variabilidad en cuanto a las características morfológicas moleculares y toxigénicas. Con base a todo lo anterior se plantea como objetivo de esta investigación, caracterizar mediante descriptores morfométricos y marcadores moleculares, aislados de *F. verticillioides* provenientes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Pudrición de la mazorca por *Fusarium verticillioides*.

La pudrición de la mazorca del maíz causada por *Fusarium verticillioides*, está distribuida ampliamente en el mundo. Es una de las enfermedades más comunes en el maíz, afectando la planta y partes de ésta en todos sus estados de desarrollo. Puede causar pudrición en el tallo, la raíz y la mazorca (Vigier *et al.*, 1997; Cardwell *et al.*, 2000).

La infección de la semilla por *F. verticillioides* es asintomática y puede afectar a las plántulas (Headrick y Pataky, 1989). Los síntomas leves de infección endofítica son comunes y pueden existir a través de la planta. En muchos casos la presencia del hongo no es perceptible, pues no causa daño visible en la semilla y a la plántula (Singh y Singh, 1977).

Las interacciones biológicas entre plantas del cultivo de maíz y el hongo *F. verticillioides* son complejas y pueden tener resultados diametralmente opuestos. Bajo condiciones normales de crecimiento este hongo crece dentro de la planta como un endófito (Bacon y Hinton, 1996); se han encontrado interacciones que benefician el crecimiento de las plantas en otros miembros de esta familia cuando son colonizadas por organismos endófitos (Clay, 1990; Rice *et al.*, 1990). Estudios previos indican que *F. verticillioides* transmitido por la semilla, produce aceleración en la germinación de la semilla cuando este patógeno produce gibberelinas (Yates *et al.*, 1997; 2005). En ciertas condiciones de campo, el crecimiento y desarrollo de las plantas, se ve afectado por el estrés, la relación endofítica asintomática, entre otros, lo cual favorece el desarrollo de enfermedades causadas por este hongo y la producción de micotoxinas (Bacón y Nelson, 1994; Abbas *et al.*, 2006).

La colonización de la planta de maíz, por *F. verticillioides*, puede depender del tipo de tejido, su maduración y la composición química, entre otros (Headrick *et al.*, 1990; Hoenisch y Davis, 1994; Styer y Cantliffe, 1984; Yates y Jaworski, 2000).

Importancia de la enfermedad.

Las pérdidas causadas por *F. verticillioides* se ha estimado que alcanza el 1% de la producción mundial en granos y semillas de oleaginosas. Más aún en los países en vías de desarrollo estas pérdidas alcanzan el 15%, debido a que los granos que se encuentran almacenados sufren ataques de hongos e insectos (Escobar, 2000; IBCE, 2009). En Venezuela, este porcentaje representó aproximadamente 47 millones de bolívares fuertes para la producción del año 2012 (MAT, 2012).

F. verticillioides es el principal agente patógeno causante de la podredumbre de la mazorca de maíz (Levin *et al.*, 2003), la cual es una de las enfermedades más importantes de las zonas tropicales (Mazzani, 2002). La incidencia de esta enfermedad es uno de los principales problemas fitopatológicos en la producción de maíz en Venezuela (Mazzani, 2002).

En un cultivar de maíz amarillo duro y otro de maíz dulce, se encontró que, desde el inicio de la floración los órganos masculinos y femeninos son receptores eficientes de conidios de *F. verticillioides*, debido a la alta infestación ocurrida después de la formación de los granos en la mazorca; esto demuestra que el patógeno proviene del alto porcentaje de inóculos presentes en las inflorescencias (Pineda y Carrasco, 1997; Munkvold *et al.*, 1997).

En El Sombrero, estado Guárico, fueron evaluados según la incidencia de *F. verticillioides* y el contenido de fumonisinas, 12 híbridos dobles experimentales y 8 híbridos comerciales de maíz blanco y amarillo, encontrándose que todas las muestras de todos los híbridos fueron colonizadas por este patógeno y contaminados con fumonisinas, esto corrobora que este hongo y las fumonisinas son un problema importante en híbridos de maíz en Venezuela (Mazzani *et al.*, 1997). Este patógeno es capaz de afectar las plantas de maíz en todos sus estados de crecimiento y las diferentes partes de la misma. También provoca enfermedades de pre y postcosecha las cuales reducen los rendimientos y deterioran la calidad de la semilla (Schulthess *et al.*, 2002). Las infecciones producidas por *F. verticillioides* a la semilla pueden ser asintomáticas, las cuales se transmiten a la plántula afectando su emergencia (Yates *et al.*, 1997).

Muy consistentemente se ha comprobado en América Latina, la incidencia de *Aspergillus flavus* por sus altos niveles de aflatoxinas, sin embargo el problema se

acrecienta mucho más por el descubrimiento de nuevas especies de hongos que producen toxinas, entre éstas tenemos las fumonisinas sintetizadas por *F. verticillioides*, entre otros (Bacon y Nelson, 1994; Bean y Echandi, 1989; Cati y Mazzani, 1991).

De 76 muestras recolectadas en diez localidades de México, para determinar la presencia de fumonisinas en forma natural y evaluar la capacidad para producir fumonisinas de cepas de *F. verticillioides*, se encontraron e identificaron principalmente hongos de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, donde las cantidades mínimas de fumonisinas detectadas en los granos representaron un riesgo potencial, ya que excedían los límites permitidos (Gallardo *et al.*, 2006).

En trabajos realizados por muchos investigadores se ha confirmado la presencia de *F. verticillioides* en maíz sembrado en casi todas las zonas de Venezuela y América Latina (Bean y Echandi, 1989; Brown *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 1989; Magan, 2000; Marín *et al.*, 2004; Mazzani *et al.*, 2001; Shelby *et al.*, 1994; Viquez *et al.*, 1996).

De semillas de maíz provenientes de las localidades de San Javier (Edo. Yaracuy), El Sombrero (Edo. Guárico) y Jusepín (Edo. Monagas), se aisló un hongo y en su identificación, por las características morfológicas y de crecimiento descritas, coincidieron con las señaladas para la especie *F. verticillioides*, siendo este el primer señalamiento de este patógeno en semillas de maíz en Venezuela (Mazzani y Borges, 1993).

Varios investigadores han encontrado que *F. verticillioides* estaba presente con una alta incidencia en granos de maíz almacenados, en diferentes zonas productoras de los estados Anzoategui, Carabobo y Monagas (Mazzani *et al.* (2007)

Por otro lado, en trabajos realizados sobre incidencia de *F. verticillioides* en doce híbridos de maíz blanco, producidos en la región central de Venezuela (Aragua, Carabobo y Guárico), se encontró en todos los casos, que el porcentaje de infección por el hongo fue alto (Díaz *et al.*, 2007).

En semillas de dos híbridos comerciales (H-4002 y H-3005) procedentes de Chirgua, estado Carabobo, se detectó la presencia de *F. moniliforme* hasta en 86,5 % de las semillas. Éste patógeno se encontró hasta en 100 % en el endospermo y en el embrión de los híbridos hasta en 90 %. El menor porcentaje encontrado fue en el pericarpo con 15 % (Medina *et al.*, 2007a). En ensayos realizados con la finalidad de demostrar la capacidad de transmisión de dicho hongo en semillas de los híbridos antes mencionados, producidas en época seca, las

plántulas emergidas de las semillas presentaron síntomas de enfermedad y se detectó el patógeno cuando se realizaron aislamientos de las plántulas afectadas evidenciando hasta un 77 % de transmisión (Medina *et al.*, 2007b).

Mazzani *et al.* (2008), encontraron que la incidencia promedio de *F. verticillioides* en muestras de maíz amarillo y blanco de pequeñas explotaciones fueron superiores a las de explotaciones experimentales y comerciales encontradas en los estados Yaracuy y Guárico, confirmando su carácter endémico (Luzón *et al.* 2007; Mazzani *et al.* (1999; 2000; 2001; 2008). También Chavarri *et al.* (2009), detectaron a este patógeno en todas las muestras de híbridos de maíz cosechadas bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa. Este hongo ha sido considerado un patógeno de alto riesgo en maíz, al igual que *A. flavus*, debido a la alta frecuencia e incidencia encontrada en las zonas donde se siembra este cultivo en Venezuela y en otras regiones tropicales y subtropicales (Abbas *et al.*, 2006; Covarelli *et al.*, 2011; Fandohan *et al.*, 2005; Ghiasian *et al.*, 2006; Lino *et al.*, 2007; Paepens *et al.*, 2005; Shephard *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009).

Gómez (2008) señaló que de varios géneros que conformaron la micobiota en maíz, el encontrado en mayor porcentaje, fue el género *Fusarium*; siendo los granos de almacén los que presentaron mayor porcentaje de infección seguido por el maíz experimental y por último el comercial. El mismo autor encontró que en todos los tipos de maíz analizados, *F. verticillioides* fue el que se detectó en mayor cantidad con respecto a las demás especies de *Fusarium* detectadas en todas las muestras.

Síntomas de la enfermedad.

Los síntomas que se presentan con la enfermedad de la pudrición del tallo y de la mazorca, comienza desde la semilla, ocasionándole a muchas de ellas pudrición antes que ésta germine, manifestándose coloraciones pardas, para luego tomar una consistencia blanda (Sweets y Wrather, 2000). En las plántulas se presentan clorosis, más tarde marchitamiento que luego causa la muerte. En la raíz se pueden observar las lesiones de color marrón café claro (Agrios, 2006). Cuando este patógeno afecta al tallo, las lesiones van desde el color marrón claro, castaño, hasta el negro en y cerca de los entrenudos, produciéndose ablandamientos en la parte externa; en el tejido interno del tallo se puede

observar el micelio de color rosado salmón, esta lesión hace que el tallo se quiebre y la planta se doble. En el interior del tallo se pueden observar zonas algodonosas de color rosado salmón (Escande, 2000; Mazzani, 2002). En las hojas del cogollo se pueden observar manchas aceitosas, de apariencia húmeda, tornándose luego blanquecinas y alargadas. Estas hojas no se abren, permanecen en forma de espiral y de tubo alargado. Cuando la enfermedad avanza los tejidos se necrosan pudiéndose observar un micelio de color blanquecino, sobre todo en la zona de las hojas que envuelven los nudos (Malaguti, 2000). Cuando afecta la mazorca, en ella se desarrollan mohos con aspecto algodonoso de color rosado salmón, en ciertas áreas se pueden observar rayas blancas en la parte externa de las semillas cuando germinan prematuramente (Mazzani, 2002; CIMMYT, 2004).

Cuando las lesiones se observan en la planta enferma (forma sintomática), los granos y las plantas presentan deterioro y a veces hasta la muerte; bajo estas condiciones el patógeno produce sustancias fitotóxicas como las moniliformina, ácido fusárico, fumonisinas, fusarinas, tricocenos, zearalenona y reguladores de crecimiento entre otros (Carvajal *et al.*, 1997). Cuando la enfermedad es asintomática, el patógeno no es perceptible y puede ser transmitida por la semilla, pudiendo entonces desarrollar o no una infección sistémica (Mendoza *et al.*, 2006).

En un ensayo donde las semillas aparentemente sanas se inocularon con *F. moniliforme*, el porcentaje de germinación disminuyó y las plántulas que emergieron presentaron clorosis en las hojas y alargamiento en los entrenudos (Riera *et al.*, 1999).

La podredumbre de la mazorca de maíz, es iniciada con la formación de micelio de color blanco, los cuales descienden desde la punta originando una coloración de rojiza a rosada en los granos infectados. Seguido a esto, comienza la producción de micotoxinas, en especial las fumonisinas, las cuales tienen efectos tóxicos (Levin *et al.*, 2003; Bush *et al.*, 2004).

Etiología

El organismo causal de la pudrición de la raíz, el tallo y la mazorca del maíz es, *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenber. Estado sexual: *Gibberella moniliforme*

Wineland, sinónimos comunes: *Fusarium moniliforme*, *Gibberella fujikuroi* (Leslie y Summerell, 2006).

La colonia en PDA es de color blanco, esta crece con rapidez y generalmente se torna de color violeta o púrpura. El color de la colonia al ser observada por el fondo de la cápsula de petri puede manifestarse desde incolora hasta violeta oscuro. Los esporodocios pueden o no estar presentes; cuando lo están, dan una coloración de beige (marrón claro) a naranja. La colonia puede desarrollar esclerocios, generalmente de coloración azul oscuro cuando son abundantes. Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos solo constan de una sola célula conidiógena, en otros están ramificados o no, a veces en verticilos, monofiálides y no presentan clamidosporas. La forma y el tamaño de los conidios, es la principal característica para identificar el género *Fusarium*. Los macroconidios formados en el esporodocio, tienen forma curvada o de hoz a casi recto por el lado dorsal, son pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda, en muchas especies con una célula basal en forma de pie, presentando de 3 a 5 septos. Los microconidios son abundantes, comúnmente unicelulares, de forma oval, elipsoidales, fusiformes, claviformes, periformes o subglobosos, similares en el ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas; estos microconidios se forman apicalmente, formando cadenas largas sobre monofiálides (Booth, 1977; Trimboli y Burges, 1983; Seifert, 2001; Leslie y Summerell, 2006).

Características en Agar hojas de clavel (CLA): Macroconidio típico de especies de *G. fujikuroi*, son especies complejas formadas en esporodocios de color naranja pálido, que raramente pueden ser oscuros debido al micelio espeso de numerosas cadenas de microconidios. Los microconidios pueden ser raramente aisladas, son ovales formando masas con una base aplanada y sin septos, se encuentran formando cadenas largas. Ellas siempre son formadas sobre monofiálides que pueden estar en forma de pares formando una "V". No se producen clamidosporas, pero células turgentes en la hifa pueden ser falsas clamidosporas o pseudoclamidosporas. Los macroconidios se presentan como entidades separadas o como una masa pseudo-pionnotal. Su morfología general es relativamente larga y delgadas, ligeramente falciformes o rectas, y de paredes delgadas típico de macroconidios producidos por esta especie en el complejo de *Gibberella fujikuroi*. La morfología apical de

la célula es curva y la basal en forma de muescas, el número de septos es de 3 a 5 (Leslie y Summerell, 2006).

Epidemiología.

F. verticillioides es un patógeno que sobrevive en los restos de cosecha, que permanecen sobre la superficie del suelo; bajo condiciones ambientales favorables, los conidios son transportados por el aire (Mazzani, 2002; Pineda y Querales, 1999; Pineda *et al.*, 2001). El tiempo de mayor descarga de los conidios de las especies de *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. longipes* y *F. roseum var. graminearum* en maíz, está comprendido desde las 8 pm hasta las 7 am (Pineda y Querales, 1999; Pineda *et al.*, 2001). Cuando son transportados por insectos llegan a los estigmas, donde penetran para alojarse luego en el pedicelo, endospermo y en el embrión de la semilla (Mazzani, 2002).

La localización y los patrones de transmisión de *F. verticillioides* dentro de la planta del maíz han sido objeto de investigaciones desde 1942 (Koehler, 1942; Munkvold *et al.*, 1997).

Las semillas que se utilizan en el cultivo del maíz son una fuente potencial de inóculo de *F. verticillioides* (Bacón y Hinton, 1996). Los restos de cosecha, el suelo donde permanece el patógeno, las estructuras que contienen al hongo, pueden colonizar las plantas en desarrollo (Leslie *et al.*, 1990; Cotten y Munkvold, 1998). Los conidios pueden ser dispersados por factores bióticos, tales como los insectos o los factores abióticos, como el viento y la lluvia. Ambos factores se han asociado con la transmisión del inóculo fúngico en la infección de las plantas sanas. Por otra parte, el estrés hídrico y el ataque de insectos, se han relacionado con la aparición de los aspectos nocivos de la interacción hongo-planta (Dowd, 2003; Yates y Sparks, 2008).

Yates y Sparks (2008) inocularon varias mazorcas de maíz en el canal de los estigmas, también a través de las brácteas de las mazorcas y a través de la vaina de la hoja que recubre la mazorca con suspensiones conidiales, encontrando que la transmisión de *F. verticillioides* fue mínima, por lo que suponen que la transmisión del patógeno entre mazorcas puede ocurrir por lesiones mecánicas, las cuales proporcionan un punto de entrada de los conidios dispersados por factores abióticos como la lluvia o el viento.

La transmisión a través de la semilla de maíz y la infección, ha sido documentada para *F. verticillioides* (Wilke *et al.*, 2001). La principal vía de infección es por la semilla, la cual puede causar una infección sistémica, sin embargo, la frecuencia de estos fenómenos ha variado ampliamente entre y dentro de los estudios individuales. La transmisión de la enfermedad por semillas, es frecuente y asintomática y la infección sistémica puede ser iniciada bajo una amplia gama de condiciones de temperatura, éste patógeno sobrevive durante largo tiempo en los residuos de cosecha, depositados en el suelo. El hongo ha sido detectado en el pedúnculo del grano aparentemente sano (Suárez, 1993; Wilke y Bronson, 2007).

La acumulación del micelio del hongo es más rápida y extensa en los tejidos reproductores de la planta que en los vegetativos. Los conidios cubren con mayor densidad las semillas menos maduras (más tiernas y con mayor contenido de agua) que las más maduras, (con menor contenido de agua), a menos que presenten heridas. Por lo tanto la madurez y la condición física de los tejidos de las plantas de maíz son los responsables de las diferencias *in vitro* con respecto a la proliferación micelial (Yates y Jaworski, 2000). También *F. verticillioides* puede penetrar a la planta a través de las heridas causadas por Lepidópteros taladradores del tallo y por Coleópteros que perforan la semilla para alimentarse de ellas (Schulthess *et al.*, 2002).

Control

Las medidas y estrategias de control son necesarias para reducir los aspectos nocivos en la relación planta-hongo, especialmente en lo que respecta a la infección de los granos de maíz, tejidos de la planta en el que las fumonisinas son principalmente sintetizados y que es una parte importante de alimento mundial y el suministro base de alimento para humanos y animales (Magan y Aldred, 2007; Woloshuk y Shim, 2000). Entre las medidas generalmente utilizadas para controlar a *F. verticillioides* se han mencionado el control genético, las prácticas culturales, el control químico y el biológico (Agrios, 2006).

Para realizar investigaciones que ayuden al control, es importante tener presente que *F. verticillioides* produce infecciones naturales en maíz de manera endémica, por lo que en condiciones de campo, es muy difícil lograr un testigo libre de infección (Reid y Hamilton,

1996). Prevenir la infección y la síntesis de micotoxinas es lo más lógico y económico, puesto que la colonización del maíz por este hongo y *A. flavus*, así como la contaminación con sus toxinas se originan en el campo (Mazzani *et al.*, 1999; 2000).

Generalmente la infección ocurre en el campo por semillas contaminadas o bien porque el patógeno proviene del suelo o del aire cargado de conidios. Esta situación puede tratarse para minimizar el problema utilizando cultivares de maíz resistente, lo cual garantiza la utilización de semillas sanas libres de éste patógeno (Wicklow, 1991; Widstrom, 1996).

El control genético es importante, ya que se pueden generar características genéticas de reacción por parte del hospedero, para ofrecer resistencia al patógeno (Jugenheimer, 1990), lo que representa una alternativa económica y segura (Mazzani, 2005). En plantas sanas, se han realizado inoculaciones con *F. verticillioides* para inducir síntomas de la enfermedad y poder evaluar y realizar selecciones de híbridos por su resistencia a la pudrición de la mazorca por *Fusarium*, rendimiento y concentración de fumonisinas (Kleinschmidt *et al.*, 2005; Presello *et al.*, 2007; Presello *et al.*, 2008; Sampietro *et al.*, 2009).

Interesantes resultados fueron obtenidos por Zummo y Scott (1992), Hoenish y Davis (1994), Shelby *et al.* (1994), Doko *et al.* (1996), Lanubile *et al.* (2010) y Pascale *et al.* (1997), sobre la reacción de resistencia de híbridos de maíz ante *F. verticillioides* y las fumonisinas. De la misma manera se ha demostrado que el comportamiento de *A. flavus*, *F. verticillioides* y la producción de toxinas, está muy influenciado por factores ambientales y la presencia de insectos que afectan al maíz (Wallin *et al.*, 1991; Widstrom, 1996). Cuando se quieren hacer selecciones por resistencia, basadas en evaluaciones visuales, la infección asintomática dificulta esta actividad (Giorda y Peiretti, 2006; Duvick, 2001). En diversos trabajos de investigación realizados en Venezuela a nivel de campo, en ensayos y en siembras comerciales, para el control por *A. flavus* y *F. verticillioides*, se ha evidenciado diferencias significativas entre genotipos, como también la influencia del ambiente (Luzón *et al.*, 2003; Mazzani *et al.*, 1999).

Otro medio de controlar la incidencia de este patógeno es realizar la siembra de maíz en época seca, lo cual es conveniente siempre que se tenga riego, ya que hay menor humedad relativa en el dosel del cultivo, lo que desfavorece las condiciones ambientales para el desarrollo del hongo (Mazzani *et al.*, 2001; 2005). También hay que tener en

consideración los elementos meteorológicos como la temperatura, la humedad relativa, velocidad del viento y la intensidad del viento, así como la actividad del agua, la fecha de siembra, la información del desarrollo fenológico del cultivo (García *et al.*, 2011; Maiorano *et al.*, 2009; Samapundo, 2007a y 2007b; Torres *et al.*, 2003b).

Fanelli *et al.* (2011), afirmaron que la influencia de la luz en diferentes longitudes de onda y su intensidad, afectan el crecimiento, la formación de conidios y la biosíntesis de fumonisina B1, B2, y B3 de *F. verticillioides*; ellos mostraron que en incubación bajo luz azul de onda corta (390 nm) el crecimiento del hongo y la producción de fumonisinas se redujo hasta en un 85%.

Por otra parte, un control efectivo se puede lograr aplicando desinfección solar fotocatalítica (TiO₂) por lotes de granos almacenados con la finalidad de inactivar los hongos patógenos del género *Fusarium*, entre ellos *F. verticillioides* (Sichel *et al.*, 2007), como también el uso de radiaciones gamma (Aziz y Moussa, 2004; Aziz *et al.*, 2006).

Ferreira-Castro *et al.* (2007), demostraron la eficacia en el control de *F. verticillioides* y la producción de fumonisinas mediante irradiaciones gamma en muestras de maíz contaminado, como un método de descontaminación de granos, bajo condiciones controladas de humedad relativa.

Cuando a las semillas infectadas se les aplica tratamientos externos con fungicidas, no se logra un control efectivo, pues, el patógeno se encuentra tanto en el embrión como en el endosperma de la semilla de maíz (Suárez, 1993). Sin embargo, se recomienda porque protege la semilla tanto en el almacén como en el suelo y estimula la germinación (Malaguti, 2000; Jugenheirmer, 1990; González, 2002). Los productos químicos disminuyen la incidencia y la severidad de los hongos patógenos en la semilla (Alezones y González 2009).

Actualmente se utiliza el control químico preventivo de la enfermedad, el cual consiste en asperjar las semillas en la planta procesadora de semillas con el fungicida “Vitavax” (carboxin+thiran). Este producto es de acción sistémica y la dosis de aplicación es de 2 litros por tonelada de semilla. Los productores pequeños pueden utilizar 2 cc/Kg de semillas (Recomendaciones por la casa comercial “AgroIsleña”, 2010 ahora “Agropatria”). Por otra parte, De Curtis *et al.* (2011) lograron una reducción significativa de la

contaminación por fumonisinas producidas por *F. verticillioides* en tres híbridos de maíz durante dos años utilizando tres fungicidas diferentes en combinación con un insecticida.

El control biológico de esta enfermedad es muy importante ya que se protege al cultivo sin afectar negativamente el ambiente, en esta actividad se utilizan microorganismos antagonistas y otros de origen biológico y plantas superiores, entre otros (Zabaletas, 2003; Giorni *et al.*, 2009).

Aislamientos de *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens* fueron probados para evaluar el efecto antagónico sobre *Fusarium* sp. en plantas de frijol (*Vigna unguiculata*), encontrándose que cuando se trataron las semillas y el suelo con los antagonistas, se obtuvo una rápida germinación, lo que indica que el uso de materia orgánica y tratamiento de las semillas con estos antagonistas ofrece una mayor protección y ventaja en la germinación y desarrollo de las plántulas (Rodríguez *et al.*, 2003). Por otra parte, Wicklow *et al.* (2005), afirmaron que las interacciones antagónicas entre *Acremonium zeae* y *F. verticillioides* en maíz se consideran de importancia ya que el primero afecta la producción de fumonisinas en los granos de maíz antes de la cosecha.

Castillo (2009), obtuvo aislamientos de *Trichoderma* spp. correspondientes a tres especies: *T. koningii*, *T. harzianum* y *Trichoderma atroviride* adaptadas en varias zonas productoras de maíz del estado Aragua, las cuales tienen efecto antagónico sobre *F. verticillioides*. También determinó que *T. koningii*, con respecto a las otras especies se comportó como el mejor antagonista, presentando el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento y de esporulación del patógeno en ensayo *in vitro*. De la misma manera concluyó que éste patógeno aplicado a las semillas por inmersión y semanalmente al suelo es muy efectivo para reducir la incidencia de *F. verticillioides*.

La utilización de *Bacillus thuringiensis* en el control biológico de *F. verticillioides*, reduce la incidencia de este patógeno en maíz hasta en un 41%, minimizando el contenido de fumonisinas en los granos (Goyo *et al.*, 2005a). Por otro lado, Cavaglieri *et al.* (2005), en un ensayo de invernadero, encontraron que la bacteria *Bacillus subtilis*, debido a su amplio espectro de sus antibióticos, redujo la colonización de la rizósfera y la endorizósfera de *F. verticillioides*, así como la acumulación de fumonisinas B₁.

Por otra parte, Pereira *et al.* (2007; 2010; 2011); Bevivino *et al.* (2005) y Sartori *et al.* (2010), encontraron que semillas de maíz, tratadas con *Bacillus amyloliquefaciens*,

Enterobacter hormaechei, *E. oleovorans*, *Burkholderia cepacia*, *Microbacterium oleovorans* pueden mejorar la calidad, reduciendo el desarrollo de *F. verticillioides* y el contenido de fumonisinas.

Cavaglieri *et al.* (2004b), observaron que *Atrobacter spp.*, *Azobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Basillus spp.*, son agentes bacterianos con potencial de control biológico contra *F. verticillioides* en la rizosfera del maíz y Dalié *et al.* (2012), utilizaron como agente antagonista a la bacteria *Pediococcus pentosaceus* y sus metabolitos en la biosíntesis de fumonisinas por *F. verticillioides*, logrando la inhibición de la producción de la micotoxina por parte de este patógeno. De la misma manera, Hernández-Rodríguez *et al.* (2008), utilizaron la actividad antagonista de las cepas de rizobacterias *Burkholderia sp.* MBf21, MBp1, MBf15 y *Pseudomonas fluorescens* MPp4, logrando un control de la enfermedad causada por *F. verticillioides* hasta un 80%.

Sanabria *et al.* (2003), encontraron que extractos etanólicos de *Phyllanthus nuriri* inhibió *in vitro* el 100% del crecimiento de las colonias de *F. verticillioides*, *Sclerotium rolfsii* y *Alternaria solani* con 25% de concentración de este extracto. Por otra parte, los extractos etanólicos vegetales de *Citruspar*, *Phyllanthus nururi*, *Heliotropium indicum* y *Ricinus cumunis*, produjeron un alto porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) y de esporulación (PE) para *F. oxysporum f. sp. cubense*, constituyendo éstos, opciones promisorias para el control biológico de este patógeno (Araujo *et al.*, 2003a; Araujo *et al.*, 2003b). Menniti *et al.* (2010), demostraron que semillas de maíz fumigadas postcosecha con el compuesto natural, trans-2-hexenal fue eficaz en el control de *F. verticillioides*, así como también Naeini *et al.* (2010) y Velluti *et al.* (2004) redujeron el crecimiento y desarrollo de este patógeno utilizando aceites esenciales de cinco plantas medicinales.

Dambolena *et al.* (2010a), encontraron que el mentol estereoisómero, un alcohol de terpeno cíclico, natural de origen vegetal de la familia *Lamiaciacae*, tiene actividades fúngicas estereoselectivas que afecta negativamente el crecimiento, la esporulación y la producción de fumonisina B1 de *F. verticillioides*. También Dambolena *et al.* (2010b), afirmaron que los aceites esenciales de las hojas y flores de *Ocimum basilicum* y *Ocimum gratissimum* presentan alguna actividad fúngica atribuida al compuesto fenólico del eugenol que afecta el crecimiento y la producción de fumonisinas de *F. verticillioides*.

Por otra parte, Dambolena *et al.* (2008 y 2011), evaluaron ciertos compuestos fenólicos como el carvacrol, eugenol, isoeugenol, limoneno, mentol, mentona, timol, y el tirmol, los cuales pueden causar una reducción de la producción de fumonisina B1 interfiriendo en la relación estructura-propiedad-actividad de esta micotoxina.

Nesvorná *et al.* (2012), afirmaron que los granos almacenados frecuentemente son infectados por ácaros, entre ellos *Fyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro* y *Lepidoglyphus destructor*. Estos fueron capaces de alimentarse intensamente y reproducirse de *Fusarium poae*, *F. colmodorum*, *F. verticillioides* y *F. avenaceum*, reduciendo de esta manera el crecimiento de estos hongos.

Thompson (1994) y Thompson *et al.* (1993), encontraron que los antioxidantes butilhidroxianisol (BHA) y propilparabeno (PP) redujeron de manera significativa el porcentaje de germinación de conidios de especies de *Fusarium* y *Penicillium*. Estos antioxidantes a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ reducen de manera significativa la germinación de la cepas de *F. verticillioides* productoras de moniliformina sobre PDA, y una inhibición completa del crecimiento micelial sobre dicho medio de cultivo se obtiene con concentraciones de 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de BHA y 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de PP. El BHA y el PP actúan sobre la membrana celular, afectando la traducción de energía y el transporte de sustratos (Adams y Moss, 1995). Sin embargo, debido a que las enzimas hidrolíticas intervienen en la colonización de los cereales por especies de *Fusarium* (Marín *et al.*, 1998), cualquier efecto de los antioxidantes se manifiesta por cambios en la producción de dichas enzimas. Por lo tanto se produce una reducción significativa de la actividad de ciertas enzimas involucradas en facilitar la colonización de los granos cuando las cepas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se encuentran en presencia del antioxidante PP, solo o en combinación con otros antioxidantes (butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno) (Torres *et al.*, 2003a).

Por otra parte, Figueroa-Gómez (2007) consiguió que el antioxidante butilhidroxianisol (BHA) tiene potencial para controlar el crecimiento y la producción de fumonisinas de *F. verticillioides* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua en el medio de cultivo agar harina de maíz. Etcheverry *et al.* (2002), Farnochi *et al.* (2005), Reynoso *et al.*, (2002) y Torres *et al.* (2003b), demostraron *in vitro* e *in situ* que dichos antioxidantes controlaron el crecimiento y producción de fumonisinas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en diferentes condiciones de temperatura y actividad del agua (a_w).

Marín *et al.* (1996) y Marín *et al.* (1998), en un estudio realizado mostraron que el ácido propiónico al 0.07%, a nivel comercial recomendado, tiene algunos efectos sobre el crecimiento de cepas de *F. verticillioides*, pero no sobre la producción de fumonisinas.

Samapundo *et al.* (2007a y 2007b), mediante resultados obtenidos, demostraron que las atmósferas modificadas que contienen altos niveles de CO₂, potencialmente podrían ser empleados para la protección de los granos de maíz postcosecha contra el deterioro y la contaminación de fumonisinas de *F. verticillioides*.

Toxinas producidas por *F. verticillioides* y otros patógenos en maíz.

Los géneros de hongos que con mayor frecuencia infectan los granos de maíz son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y muchas de sus especies producen micotoxinas (Samson *et al.*, 1995), tales como: Fumonisinas B1, B2, B3, B4, A1 y A2, Tricotecenos, Ochratoxinas, Toxina T-2, Citrinina, Deoxinivalenol, Patulina, Zearalenona, Esterigmatocistina, Fusaproliferina, Beaciboricina, Fusarinas, Ac. Fusárico, promotores o reguladores de crecimiento (auxinas y gibberelinas) (Suárez, 1993; Mazzani *et al.*, 1999; 2001; Kuldao *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2005; Malonek *et al.*, 2005; Desjardins, 2006).

La mayor producción de fumonisinas tiene lugar en sustratos con altos contenidos de agua y a una temperatura comprendida entre 15 y 25 °C. En general, *Fusarium* es un moho que forma parte de la flora de campo (sustratos, plantas vivas) y de la flora intermedia (sustratos de cereales recién cosechados y aún húmedos) (Mallmann y Dilkin, 2007).

F. verticillioides puede sintetizar algunos promotores o reguladores del crecimiento de las plantas, tal es el caso de las auxinas y las gibberelinas (Suárez, 1993). Es de vital importancia determinar la incidencia de *F. verticillioides* por la producción de toxinas en los alimentos y en las materias primas que se utilizan en la elaboración de alimentos tanto de humanos como animales (Mazzani, 2007).

En la salud es muy importante tener en cuenta la inocuidad de los alimentos, el cual es un aspecto fundamental y esencial para controlar la calidad de los alimentos. Esto debe ser un elemento de prioridad de todos los gobiernos. En nuestro país esta situación requiere de una importante atención, debido a las implicaciones para la salud, lo cual alcanza a todos los estratos de la población (Arispe y Tapia, 2007).

Las micotoxinas son metabolitos producidos por hongos, las cuales inducen respuesta tóxica cuando son consumidos en bajas concentraciones por humanos y animales. Muchos de estos metabolitos tienen diversos efectos como fitotoxicidad y síndromes antimicrobianos (Bennett, 1987).

Los hongos del género *Fusarium* producen micotoxinas como la Zearalenona producida por *F. oxysporum*, *F. avenacearum*, *F. graminearum*, fumonisinas producidas por *F. verticillioides*, moniliforminas por *F. subglutinans* y *F. avenacearum* y deoxinivalenol por *F. verticillioides* y *F. graminearum* (Marasas, 2001; FAO, 2000; Willians *et al.*, 2006).

Las toxinas que con mayor frecuencia se presentan en los granos de maíz son las aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *Aspergillus parasiticus* y las fumonisinas (Mazzani *et al.*, 1999; 2001). Hassan *et al.* (1991) realizaron varios aislamientos de diferentes especies de *Fusarium*, procedentes de siembras de maíz del campo, entre ellos *F. subglutinans*, *F. graminearum* y *Fusarium sambucinum*, entre otros, los cuales produjeron mico al mismo tiempo. En los últimos años se han hecho muchísimos reportes de la capacidad productora de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* (Sánchez *et al.*, 2005), así como de otros hongos patógenos. Algunos hongos productores de micotoxinas se resumen en el cuadro 1.

El ácido fusárico es producido por especies del género *Fusarium*, existen indicios de que el ácido fusárico tiene un efecto sinérgico sobre la ocurrencia de otras micotoxinas, también existen numerosas investigaciones sobre la producción de ácido fusárico por diferentes formas especiales de *F. oxysporum* y por miembros del complejo de *G. fujikuroi*; sin embargo no hay suficientes datos disponibles de que esta molécula sea un rasgo universal del género *Fusarium*. No obstante, se conoce la existencia de especies de *Fusarium* con habilidad para producir ácido fusárico. La producción *in vitro* de ácido fusárico por *F. verticillioides* es influenciada por concentraciones de iones metálicos en medios de crecimiento (Kuldao *et al.*, 2001).

Fumonisin.

Las fumonisin son producidas principalmente por *F. verticillioides* (sin. *F. moniliforme* estado sexual *G. fujikuroi*) (Dejardins y Plattner, 2000) y *F. proliferatum* (Martin, *et al.*, 2001), así como también por otras especies de este género (Desjardins y Proctor, 2007). Las fumonisin son micotoxinas derivadas de policétidos (metabolitos secundarios de acetilo y propionilo), producidas por varias especies de *Fusarium* y su ruta biosintética es controlada por el clúster FUM que es un grupo de genes que muestran un patrón de expresión común durante la biosíntesis de estas micotoxinas (Brown *et al.*, 2005; Proctor *et al.*, 2004; Sanches-Rangel *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2001; Stepien *et al.*, 2011).

Según Mule *et al.* (1994); Desjardins y Plattner, (2000), en 1988 se descubrieron las fumonisin, las cuales son producidas por *F. verticillioides* (sin. *F. moniliforme* estado sexual *G. fujikuroi*) (Desjardins y Plattner, 2000) y *F. proliferatum* (Martín *et al.*, 2001), por dos grupos de trabajo de manera independiente. El primero se logró cuando investigaba la causa del cáncer de esófago en humanos en ciertas partes de Sudáfrica (Bezuidenhout *et al.*, 1988); el segundo procuraba encontrar la etiología de una de las enfermedades bien conocidas que afectan a los caballos, la ELEM (leucoencefalomalacia) (Laurent *et al.*, 1990). Las micotoxinas en su mayoría son moléculas relativamente pequeñas, formadas por una gran diversidad de estructuras químicas. Se tiene información de 350 a 400 metabolitos de hongos con características toxigénicas. Las características estructurales de las aflatoxinas es una de las primeras de las que se tiene referencia, en cambio las fumonisin son unas de las más recientemente descubiertas (Marasas *et al.*, 1988).

La estructura química de las fumonisin es un diéster del ácido tricarbóxico y del 2-amino-12,16-dimetilpolihidroxi-eicosano. Químicamente las fumonisin se caracterizan por poseer 20 átomos de carbono en su estructura central, 2 grupos de ácido tricarbóxico (TCA), de 1 a 3 grupos hidroxilo y 1 grupo amino (Barna-Vetro *et al.*, 2000). Varios investigadores han señalado más de veinte tipos diferentes de fumonisin en varias especies del género *Fusarium* (Figura 1) (Reeder *et al.*, 2005).

Cuadro 1.-Toxinas producidas por *F. verticillioides* y otros patógenos en maíz.

Patógeno	Toxinas	Referencia
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisinias B1, B2, B3, B4, A1 y A2, Tricotecenos Ochratoxinas, Citrinina, Deoxivalenol, Patulina, Zearalenona, Esterigmolocistina, Fusaproliferina, Beaciboricina, Fusarinas, Ac. Fusárico, Fusaproliferina, promotores o reguladores de crecimiento (auxinas y gibberalinas)	Sánchez <i>et al.</i> , 2005; Mazzani <i>et al.</i> , 1999; 2001; Kuldao <i>et al.</i> , 2001; Desjardins, 2006; Malonek <i>et al.</i> , 2005; Mazzani <i>et al.</i> , 1999; 2001.
<i>F. subglutinans</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. sambusinum</i> <i>F. solani</i> <i>F. proliferatum</i>	Moniliforminas, Dioxinivalenol, Diacetoxicispermol, toxina T-2, Zearelenona, Ac. Fusárico.	Hassan <i>et al.</i> , 1991; Kuldao <i>et al.</i> , 2001; Hassan <i>et al.</i> (1991).
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas, Ochratoxinas	Sánchez <i>et al.</i> , 2005.
<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxinas, ác. penicílico	Bacón y Nelson, 1994.
<i>Aspergillus veridicetum</i>	Citrinina	Patterson y Damoglou, 1986.
<i>Aspergillus versicolor</i>	Esterigmatocistina	Patterson y Damoglou, 1986.
<i>Penicillium aurantiogrisem</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxinas, ác. penicílico	Patterson y Damoglou, 1986.
<i>Penicillium patulum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium clavatus</i>	Patulina	Patterson y Damoglou, 1986. Daoglou, 1986.
<i>Penicillium commune</i>	Ac. ciclopiazónico	Gqaleni <i>et al.</i> , 1997.

La fumonisina B1 es el componente más activo aislado de cultivos de *F. verticillioides*. Las fumonisinas B2 y B3 son muy similares a la FB1, sólo que carecen de un grupo hidroxilo en el carbono 10 y el carbono 5 respectivamente. Estas tres fumonisinas son las que se encuentran en forma natural contaminando al maíz y sus derivados (Velluti, 2004).

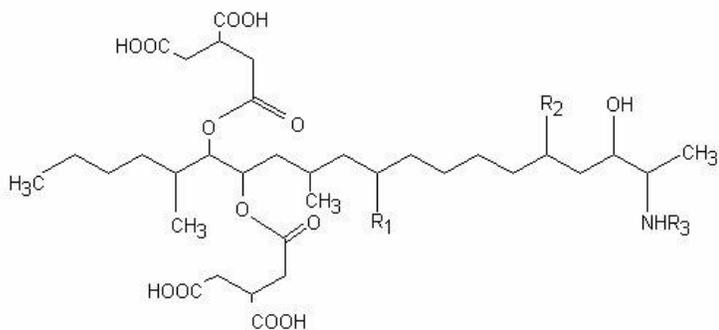
Homsí (2002) y Rangel (2005), encontraron que todos los aislamientos efectuados de *F. moniliforme*, fueron capaces de sintetizar fumonisinas *in vitro*. Este patógeno produce algunos compuestos tóxicos, como el ácido fusárico, moniliformina, promotores o reguladores de crecimiento (auxinas y gibberelinas) y fumonisinas (Suárez, 1993). También se ha evidenciado la relación entre las concentraciones de algunos metales en el suelo y en granos de maíz y la concentración de micotoxinas (Cuero, 2000).

Existen varios tipos de fumonisinas entre ellas tenemos (B1, B2, B3, B4, A1 y A2), sin embargo, las más frecuentes e importantes por su toxicidad son la fumonisina B1 (FB1) y la fumonisina B2 (FB2). Éstas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (de preferencia en el maíz y sus subproductos). Las condiciones ambientales como la temperatura, el pH del sustrato, la humedad relativa, el pH del suelo, la actividad del agua, período de sequía, la cantidad de agua que cae por efecto de las lluvias antes de la cosecha y durante la cosecha, juegan un papel importante en el desarrollo de la infección de los granos por los hongos, así como la contaminación con micotoxinas (Marín *et al.*, 2004).

La fumonisina es la micotoxina de mayor importancia que sintetiza *F. verticillioides* (Malonek *et al.*, 2005; Desjardins, 2006). La contaminación con fumonisinas en su mayor parte, ocurre en el campo, lo cual está asociada con la severidad de los síntomas observados (Presello *et al.*, 2005).

Las fumonisinas B₁ y B₂, están relacionadas en su estructura química y se han caracterizado como alquiamina hidrolasa de cadenas largas en la que se unen a través de uno o dos ácidos tricarbóxicos. La fumonisina B₂ se diferencia de la fumonisina B₁ en que la primera carece de un grupo hidroxilo en el carbono 10 (Shier *et al.*, 1991). Ambas fumonisinas han sido caracterizadas por Norred *et al.* (1992) como diésteres de ácidos tricarbóxicos y alcoholes polihídricos, siendo sus estructuras muy parecidas a la de la esfingosina, lo que permitió inferir que estas fumonisinas interfieren con el metabolismo de la esfingosina y muchas, como las B₁, son inhibidores fuertes de la ceramida sintetasa; esta

interferencia en el metabolismo de los esfingolípidos contribuye de manera importante en la toxicidad y la carcinogénesis, por lo que trae deterioro en la salud de quienes lo consuman.



Fumonisina	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₃ CO
A2	H	OH	CH ₃ CO

Figura 1.- Estructura química de la fumonisina. Fuente: Reeder *et al.* (2005).

La esfingomielina, ceramidas y gangliósidos son esfingolípidos cuya estructura vertebral química es la esfingosina. Estos esfingolípidos tienen un papel muy importante en diversas funciones celulares como la comunicación entre células en los receptores de los factores de crecimiento y en la diferenciación y transformación celular, entre otros (De Alfred *et al.*, 2001).

Efectos de las fumonisinas y otras toxinas en humanos y animales.

F. verticillioides produce fumonisinas las cuales se han relacionado con algunas enfermedades tanto en los humanos como en los animales. De acuerdo con la FDA (Food and Drug Administration (EE.UU)), los niveles de tolerancia del contenido de fumonisinas en granos de maíz que permitan la autorización para su consumo son: 1 µg/g para humanos, 50 µg/g para bovinos, 5 µg/g para equinos y 10 µg/g para porcinos (Cocchi *et al.*, 2011).

La contaminación de los cereales con metabolitos secundarios tóxicos de los hongos, como las micotoxinas, es un reto permanente en la alimentación animal, la salud el rendimiento de los animales, así como la calidad de los alimentos de origen animal (Doll y Danicke, 2011).

La inmunosupresión, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis son algunos de los efectos adversos que producen las micotoxinas y entre ellas las más frecuentes que se han encontrado en cantidades significativas en los alimentos (maíz, maní, semillas de algodón y nueces) son las aflatoxinas, deoxinivalenol (DON), zearalenona y fumonisinas (Glenn, 2010; Garcia *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2001; Voss *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Los síndromes de mayor importancia que producen las toxinas según la especie animal que lo consume son neurotóxicos como la leucoencefalomalacia la cual es una enfermedad fatal del cerebro de los caballos, mulas, asnos y conejos; nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral en cerdos (PPE); duodenitis en equinos; hepatotóxicos, mutación de genes en roedores. Estas micotoxinas interfieren con el metabolismo de la esfingosina y esfinganina, por lo que perturban el metabolismo de los esfingolípidos, que son constituyentes del hígado y de las lipoproteínas (Merrill *et al.*, 2001; Dersjant-Li *et al.*, 2003; Lino *et al.*, 2004; Leslie *et al.*, 2005; Theumer *et al.*, 2008). También la fumonisina B1 tiene efectos sobre la expresión de citoquinas y quimiocinas en células dendríticas humanas (Gelderblom *et al.*, 2001; Stockmann-Juvala *et al.*, 2008).

En áreas de Nigeria y Benin existen altos riesgos de ingesta de granos de maíz contaminados con aflatoxinas en la población de pocos recursos (Hell *et al.*, 2000; Udoh *et al.*, 2000), también en Centro América, África y Asia (Viquez *et al.*, 1996). De la misma manera, por la ingesta de maíz contaminado con fumonisinas en algunas zonas del sur de Brasil se efectuó un estudio epidemiológico que se correlacionó con una alta incidencia de cáncer esofágico en la población rural, lesiones cardíacas y otros tipos de cáncer, así como anomalías en el tubo neural, riñones y pulmones (Merrill *et al.*, 2001; Lino *et al.*, 2004; Leslie *et al.*, 2005; Scussel, 2006; Schwerdt *et al.*, 2009).

Los granos de maíz altamente contaminados con micotoxinas que son rechazados por la agroindustria, posiblemente son procesados para el consumo de la población de menores recursos y para el consumo animal (Sabino, 2006). La producción de maíz en forma artesanal no es controlada con respecto a evaluaciones sobre el contenido de micotoxinas y

este grano es consumido en forma directa por humanos y animales. En Venezuela hay pocos trabajos de investigación que evalúen los riesgos a lo que están expuestos quienes lo consuman (Placinta, 1999; Mazzani *et al.*, 2008).

Así mismo, existe un alto riesgo de consumo de maíz contaminado con fumonisinas por parte de la población rural de escasos recursos en algunas zonas de Venezuela donde este cultivo es producido en pequeñas explotaciones y conucos, debido a que toda o una gran parte de la cosecha se destina al sustento del grupo familiar y animal (Mazzani *et al.*, 2008).

Vanara *et al.* (2009), obtuvieron los siguientes resultados acerca del destino de las fumonisinas B1 en el procesamiento de granos de maíz enteros durante molienda seca: a) la harina animal y el germen tenían un contenido de fumonisina más alto que el grano no procesado, b) que existe una relación inversa entre el tamaño de la partícula y el contenido de fumonisina en las harinas, c) la toxina tiende a concentrarse en el tegumento y el embrión, mientras que el endospermo es contaminado parcialmente.

Ruíz-Cendoya *et al.* (2011), utilizando 10 mg/Kg de peso corporal una vez al día de liposomal anfotericina (L-AmB) y terbinafina (TRB) 150 mg/kg de peso corporal dos veces al día en ratones, lograron prolongar la supervivencia y la tolerancia del hongo *F. verticillioides* localizado en el vaso y los riñones de estos roedores infectados, lo que los llevó a sugerir que esta combinación puede tener un papel en el tratamiento de la infección de *F. verticillioides*.

Kim y Woloshuk (2008), encontraron que la biosíntesis de fumonisinas B1 (FB1), se reduce en cultivos que contienen amonio como fuente de nitrógeno en las primeras etapas de desarrollo de las mazorcas y a un pH de aproximadamente 8.0 en los tejidos de los granos ocasionado por efecto de la relación desfavorable carbono/nitrógeno. Situación que reduciría la cantidad de fumonisinas para consumo humano y animal.

Marcadores Moleculares.

A mediados de los años sesenta los marcadores moleculares fueron utilizados para el estudio genético y de mejoramiento, los cuales estaban controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, que eran de fácil identificación visual. Su uso estuvo limitado a

los programas de mejoramiento genético, debido a que estos genes ocasionalmente se asociaron a genes de importancia económica. Por otra parte, la disponibilidad para el uso de estos marcadores estuvo esencialmente restringida a un reducido grupo de especies de plantas que se utilizaron como sistemas modelos para los estudios genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

Los avances tecnológicos han sido extremadamente rápidos y fascinantes. Los marcadores isoenzimáticos fueron los que iniciaron esta revolución aumentando la cantidad de marcadores genéticos disponibles para realizar estudios genéticos de todas las especies de plantas. A medida que estas técnicas de biología molecular se han desarrollado, han surgido diversos métodos de detección del polimorfismo de la longitud de los segmentos de restricción (RFLP) del ADN, luego amplificación en cadena utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que llevó a la descripción de otras clases de marcadores moleculares (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

Los marcadores moleculares son todas las variabilidades de naturaleza bioquímica/molecular susceptibles de ser de algún modo asociado con la variabilidad de un determinado morfológico agronómico. Se han utilizado diferentes técnicas de biología molecular para determinar las distintas clases de marcadores moleculares, cuyo fin principal es obtener información genética para poder definir acciones estratégicas (Campos, 1995; Campos y Salvo, 1995).

Técnicas moleculares para la identificación de *F. verticillioides* y otros patógenos

La caracterización morfológica por sí sola no es suficiente, para identificar con precisión a un determinado individuo. Además, los conocimientos y la experiencia son importantes en la identificación morfológica precisa de las especies de *Fusarium* ya que el proceso hace hincapié en las diferencias de las características morfológicas, tales como las formas y el tamaño de los macro y microconidios, así como las células conidiógenas, la pigmentación y las tasas de crecimiento que podría ser fácilmente alterada por factores ambientales y culturales. Para compensar estas debilidades, los métodos de biología molecular con técnicas basadas en Reacciones en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés PCR como ADN, Amplificación Polimorfica al Azar (RAPD) (De Oliveira-Rocha *et*

al., 2011), PCR-RFLP de Espaciadores Internos Transcritos (ITS) (Fanelli *et al.*, 2011; Sampietro *et al.*, 2010; Visentin *et al.*, 2009), PCR en tiempo real y Espaciadores Intergénico (IGS) (Bertechini-Faria *et al.*, 2012; Nicolaisen *et al.*, 2009; Suanthie *et al.*, 2009), Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias-PCR (ERIC-PCR) (Edel *et al.*, 1995) y Amplificación Microsatelital (RAMS) (Abd-El Salam *et al.*, 2011), estos análisis han sido utilizados en la caracterización de las especies de *Fusarium*. Por otra parte Visentin *et al.*, 2009, diferenciaron a *F. verticillioides* de *F. proliferatum* utilizando otra técnica como la de ITS-RFLP (Restricción de la Longitud del Fragmento Polimórfico).

Los avances técnicos de los últimos años han estimulado el uso de marcadores moleculares. A través de los mismos, se puede lograr la obtención del polimorfismo en la longitud de la cadena de ADN, lo cual permite distinguir entre las diferentes especies de *Fusarium*. Esto, en combinación con el análisis morfológico, puede aplicarse para la identificación de especies de *Fusarium* desconocidas, o bien para asegurarse con mayor confiabilidad de la presencia de una determinada especie de *Fusarium*, así como lograr caracterizar aquellas especies que producen fumonisinas, lo cual sería muy útil en la tecnología de alimentos (Jiménez *et al.*, 2000).

Mediante el desarrollo de métodos de detección molecular por la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) para identificar cepas de *Fusarium* potencialmente toxigénicas, aplicadas a cultivos puros del hongo y a harina de maíz contaminada naturalmente, se encontró que 70 % de las cepas se identificaron como *F. verticillioides* y muchas sintetizaron fumonisinas B₁ en niveles que variaron de 0,1 µg/g hasta 4,000 µg/g. Esta prueba molecular permitió la identificación de la mayoría de las cepas toxigénicas en cultivo puro y las que estaban en la harina de maíz que contenían fumonisinas (Sánchez, 2005).

Patiño *et al.* (2006) realizaron caracterizaciones y estudios filogenéticos de aislados de *F. verticillioides* con esta técnica. De la misma manera Xu y Leslie (1996) realizaron la construcción del mapa genético de *G. fujikuroi*. Las regiones comúnmente secuenciadas y comparadas son las porciones del ADNr cuando se va a realizar un análisis filogenético, los cuales incluyen las regiones ITS1, ITS2, IGS, 18S y 28S, que permanecen muy conservada en una especie y son variables entre dichas especies (Desjardins, 2006).

La aplicación de la técnica de PCR-RFLP en la región IGS del ADNr ha permitido a muchos investigadores agrupar con un elevado grado de similitud, la identificación de especies y estudios filogenéticos de aislados de muchas especies de *Fusarium*, así como distinguir aislados de *G. fujikuroi* en diferentes hospederos (Mishra *et al.*, 2002; Hinojo *et al.*, 2004; Konstantinova y Yli-Mattila, 2004; Fouquaert *et al.*, 2011).

La utilización del ADN-ribosómico (ADNr) se debe a que en los organismos eucariotas su ADNr está conformado por diversos cientos de copias repetidas en tándem de una unidad de transcripción, más varios espacios adyacentes no transcritos. Según sea el organismo, el número de copias puede variar. Entre los organismos existen fragmentos que tienen distinto grado de conservación, como los genes 18S, 5.8S y 28S, y regiones variables, los espacios intergénicos (Intergenic Spacers IGS) y las regiones internas que se transcriben (Espaciador Interno Transcrito ITS). Estas regiones son una herramienta de identificación ya que son variables en su composición y tamaño, como también sirven para la diferenciación y clasificación de hongos, efectuar estudios a diferentes niveles, discriminar entre géneros, especies o bien a nivel intraespecífico. La tasa de sustitución nucleotídica presenta ritmos diferentes en las distintas regiones, lo cual es otra característica que lo hace importante (O'Donnell, 1992; Radford, 1993; Tsai *et al.*, 1994).

López-Irrasquín *et al.* (2007), mediante la técnica de Tiempo Real de PCR (TR-PCR por sus siglas en inglés) pudieron cuantificar el nivel de expresión de dos genes de la agrupación biosintética de las fumonisinas en *F. verticillioides* *fum1* (que codifica una enzima sintetasa de polipeptido) y el gen transportador ABC que codifica *fum19*. El nivel de expresión de ambos genes se comparó con la cantidad de la fumonisina B1 medida por HPLC, producida por varias cepas de *F. verticillioides* en cultivo líquido. Por otra parte Yu *et al.* (2005) a través de métodos desarrollados de mecanismos biosintéticos de sistemas genéticos han logrado manipular las funciones del gen PKS implicado en la biosíntesis de fumonisinas de *F. verticillioides*.

Por primera vez en 1980 se utilizó la técnica de los RFLP's (Polimorfismo de la longitud de los segmentos de restricción) en estudios genéticos de organismos eucarióticos, teniendo su primera aplicación en la genética humana (González y Simpson, 1991). Estos marcadores RFLP se convirtieron en una herramienta muy útil e importante en un tiempo

muy corto en áreas de la biología, las cuales han sido utilizados con mucha eficiencia en investigaciones biológicas (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

El uso de técnicas que se basan en polimorfismo del ADN ha tenido un incremento considerable en el presente. Se ha convertido en una herramienta fundamental para realizar estudios de hongos que presentan una gran variabilidad genética y filogenia. La técnica de RFLP ha tenido mucho uso en la determinación de la huella molecular de muchos microorganismos. Esto se debe a que esta técnica combina la simplicidad de los marcadores basados en PCR y el potencial basado en las enzimas de restricción. La técnica que utiliza los marcadores RFLP constituyen una herramienta muy poderosa para realizar estudios de diversidad genética y análisis de estructuras de poblaciones de géneros complejos (Sanz, 2007). Muchos estudios demuestran, que los métodos moleculares pueden ser útiles para una rápida identificación de especies de *Fusarium* y sus niveles de producción de toxinas (De Oliveira Rocha *et al.*, 2011; Jurado *et al.*, 2006; Niessen, 2007).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Kary Mullis, en la década de los 80, junto con un equipo de investigadores pudieron desarrollar un método que amplificó *in vitro* el ADN en más de un millón de veces. Este método o técnica se denominó “Reacción en cadena de la polimerasa”, cuyas siglas en inglés son PCR, permitiendo esta técnica un procedimiento rápido y eficaz para la amplificación enzimática de segmentos de ADN específicos de secuencia conocida, Este método es automatizado en el cual se realiza la síntesis enzimática de secuencias de ADN. La reacción involucra el uso de un segmento de ADN (de 15 a 30 bases) de cadena doble, los cuales van a ser complementarios a los que van a ser amplificados, dos oligonucleótidos cebadores (primers) de cadena sencilla, se hibridizarán respectivamente con los segmentos iniciales y finales de la secuencia que se quiere amplificar. La enzima ADN-polimerasa coordinará la polimerización y construirá la nueva cadena de ADN mediante la adición de desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), esto es en la presencia de un buffer de reacción adecuado para la enzima específica con la presencia de algunas sales o iones, especialmente Mg^{++} (Arnheim y Erlich, 1992; Slightom *et al.*, 1995; Ferreira y Grattapaglia, 1996; Salazar, 1998).

El método o técnica de PCR (restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), se basa en la amplificación por PCR de una secuencia conocida de ADN, en la que se utilizan dos iniciadores idénticos en sus regiones externas. Las enzimas de restricción son las que digieren las secuencias de ADN amplificadas por PCR. Estas enzimas reconocen una secuencia de ADN y cortan las cadenas de ADN original en los lugares o puntos donde se encuentre dicha secuencia. Estas enzimas de restricción cortan las dos cadenas de ADN porque son secuencias polidrómicas, y se obtienen fragmentos de tamaños diferentes, que se pueden visualizar en un gel de agarosa a través de la técnica de electroforesis, lugar en el que se produce un desplazamiento de los fragmentos de ADN cuando se les aplica una diferencia de potencial eléctrico. Este desplazamiento en el gel de electroforesis se realiza en función del largo o tamaño de los fragmentos, lo que basado en la medición y en la cantidad de fragmentos permite identificar parcialmente la muestra. Como los patrones de restricción se forman con base solo al tamaño de los fragmentos de ADN generados y su número, se pueden obtener patrones de restricción iguales para hongos distintos a los que se estudian, entonces esta situación amerita utilizar otras enzimas que diferencien unos hongos de otros, generando patrones diferentes (Hausner *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001).

Las enzimas de restricción endonucleasas, se obtienen principalmente de organismos procarióticos, éstas reconocen una secuencia entre 4-8 pb en ADN, las endonucleasas cortan las dos cadenas de ADN en determinadas secuencias de nucleótidos en el sitio de reconocimiento o diana de restricción. En la actualidad existen más de 2.300 endonucleasas de restricción disponibles para la tipificación (Mirhendi *et al.*, 2001; Hausner *et al.*, 2000).

Las endonucleasas más utilizadas en la tipificación de hongos son: *AluI*, *HhaI*, *HapII*, *MboI*, *EcoRI*, *PstI*, *XhoI*, *BsuRI*, *cofI*, *BglII*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HincII*, *HindIII*, *HinfI*, *KpnI*, *MspI*, *NruI*, *PstI*, *Sall*, *SacI*, *Sau3AI*, *Small*, *SphI*, *StuI*, *TaqI*, *XbaI*, *NotI*, *RsaI* (Ferrer *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001; Carter *et al.*, 2002; De las Heras, 2004; Desjardis, 2006; Patiño *et al.*, 2006; Lorens *et al.*, 2006).

Gómez (2008) confirmó que la técnica de PCR es una herramienta adecuada para la identificación de los hongos que pertenecen al género *Fusarium*; también confirmó la identificación previa por este método, de todos los aislados de *F. verticillioides* analizados.

En la actualidad, el estudio sobre las fumonisinas ha llegado a niveles moleculares. Se han clasificado 4 grupos de genes, *fum1*, *fum2*, *fum3* y *fum4*, asociados con la biosíntesis

de fumonisinas, estos se identificaron mediante estudio genético sobre las cepas de *F. verticillioides* productoras de fumonisinas. El resultado de la PCR con cebadores basados en el gen polipéptido sintetasa (PKS), demostró que el gen *fum5* PKS es el requerido para la biosíntesis de las fumonisinas. Se realizaron estudios sobre la biología molecular de cepas productoras de fumonisinas. Además se utilizaron transgénicos como estrategias para aumentar la resistencia a *Fusarium* y reducir la contaminación de fumonisinas en las plantas y disminuir el riesgo de salud de los humanos y animales así como la seguridad alimentaria (Wang y Liu, 2005).

Por otra parte Zhang *et al.* (2011), demostraron que el gen *FvMK1* juega un papel muy importante en la regulación del crecimiento vegetativo, producción de macroconidios, biosíntesis de fumonisinas y patogenicidad de *F. verticillioides* en maíz, por lo que sugieren que este gen es esencial para la infección de la planta. También Sekhon *et al.* (2006), caracterizaron los genes PR-4 y PR-5 que están involucrados en la incidencia de la pudrición de la mazorca de maíz en el campo.

Gómez (2008), concluyó que en las poblaciones de *Fusarium spp.* encontradas y analizadas a través de la utilización de la región IGS ribosomal, mediante el estudio de PCR-RFLP de las especies de *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *Fusarium equiseti* existe una gran variabilidad de varios tipos genéticos, aún dentro de una misma especie. Esta diversidad fue encontrada dentro y fuera de la sección donde estas especies están ubicadas.

Identificación molecular de especies de *F. verticillioides* con el uso de marcadores moleculares.

Las secuencias de los genes de ADN ribosómico (ADNr) incluyendo los espaciadores internos transcritos ITS1 y ITS2 que circundan la región 5,8 del gen calmodulina se han utilizado para desarrollar primers específicos para la detección de varios hongos fitopatógenos (O'Donnell *et al.*, 1998; 2000). Por lo que Mulé *et al.* (2004), se concentraron en la región del gen calmodulina con la finalidad de obtener fragmentos de ADN para distinguir entre las especies de *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, basándose en el estudio de la variabilidad del ADN dentro de la región de la

calmodulina de aislados de *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* provenientes de maíz. Ellos desarrollaron primers para especie-específica de estas especies de *Fusarium* y desarrollaron un método de PCR rápido para la identificación de estos patógenos en maíz. Los primers específicos para cada especie fueron diseñados utilizando un Software Primer Express (Applied Biosystems). Estos primers fueron seleccionados de las regiones divergentes, dentro de las secuencias que codifican la calmodulina resultante de la alineación múltiple de secuencias obtenidas en su estudio (Mulé *Et al.*, 2004).

Tres pares de iniciadores de especie específicas, fueron diseñados: PRO1/2, SUB1/2 y VER1/2 para *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, respectivamente. Estos iniciadores fueron diseñados para funcionar a temperaturas altas de hibridación (56°C), evitando de este modo la amplificación de ADN no específico. Los iniciadores específicos para cada especie se eligieron cercano a la región 3'. Los productos secuenciados se compararon con las secuencias existentes en los bancos de genes, EMBL, DDBJ y PDB y el resultado de BLAST (Basic Local Alineation Search Tool) mostraron un 100% de homología con secuencias de aislados pertenecientes a las especies para las que fueron diseñados estos iniciadores. Fragmentos individuales de tamaño correcto se obtuvieron con los iniciadores específicos de la especie, de todas las cepas que pertenecen a las tres especies. El producto de PCR de *F. subglutinans* fue de 631 pb, para *F. proliferatum* fue de 585 pb y para *F. verticillioides* fue de 578 pb. Para confirmar la especificidad de los primers, fragmentos derivados de las especies estudiadas fueron secuenciados. La comparación de las secuencias obtenidas previamente con secuencias de calmodulina, que se utilizaron para el diseño del iniciador, confirmó la especificidad de especie de los iniciadores, ya que las secuencias eran 100% homologas. Con la finalidad de validar los primers, la especificidad de los pares de cebadores se probó en 50 cepas de cada una de las tres especies. No hubo reacciones cruzadas con las otras especies utilizadas. Con el fin de evitar resultados falsos negativos, algunas pruebas de PCR se realizaron al menos tres veces. La sensibilidad de los cebadores fue de 12,5 pg cuando se analizó el ADN genómico total de cada especie pura. Finalmente, las secuencias de los primers específicos de la especie se patentaron: MI2003A000375, en 03/03/2003.

Con miras a utilizar la PCR para detectar estos agentes patógenos en los tejidos del maíz, los primers sobre el ADN genómico total extraídos de granos de maíz sanos se

probaron para evitar resultados falsos positivos para reacción cruzada con el ADN de la planta. Diez muestras de cinco compañías diferentes generaron fragmentos en cualquier experimento. Por último, el análisis de ADN genómico total extraído de cultivos puros de cada especie cultivadas en granos de maíz genera los fragmentos esperados para cada uno de los conjuntos de iniciadores probados.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abbas, H. K., R. Cartwright and W. Shier. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot.* 25:1-9.
- Abd-Elsalam, K. A., A. H. Bahkali, M. A. Moslem and J. A. Verreet. 2011. Development of di- and tetranucleotide repeat primer for discrimination of *Fusarium* species. *Journal of Food Safety.* 31:35-40.
- Adams, M. R. and M. O. Moss. 1995. Food Microbiology Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry.
- Agrios, G. 2006. Fitopatología. Ediciones Limusa. Segunda Edición. México. 838 p.
- Alezones, J. y A. González. 2009. Efecto de diferentes fungicidas sobre la incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas de un híbrido de maíz de grano blanco. *Fitopatología Venezolana.* 22:31-32
- Angelo, M. 1997. Accumulations of fumonisins in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon. *J. Sci. Food Agric.* 74:1-6.
- Araujo, D., M. Sanabria, B. Camacho, N. Sanabria y G. Martínez. 2003a. Efecto de extractos vegetales en el control de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense in vitro*. *Rev. Fitopatología Venezolana* 16:32 (Resumen).
- Araujo, D., D. Rodríguez, M. E. Sanabria, B. Camacho, N. Sanabria y G. Martínez. 2003b. Efecto de extractos vegetales sobre la germinación de microconidios de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Rev. Fitopatología Venezolana* 16:56 (Resumen).
- Arispe, I. y M. S. Tapia. 2007. Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalim.* 12:105-118.
- Arnheim, N. and H. Erlich. 1992. Polimerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131-156.
- Aziz, N. and A. Shain. 1997. Influence of other fungi on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize kernels. *J. Food Safety* 17:113-123.
- Aziz, N. H. and L. A. A. Moussa. 2004. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *Journal of Food Safety.* 24:109-127.

- Aziz, N. H., Z. A. Mattar and S. R. Mahrous. 2006. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. *Journal of Food Safety*. 26:184-201.
- Bacon, C. W. and P. E. Nelson. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.* 57:514-521.
- Bacon, C. W. and D. M. Hinton. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can. J. Bot.* 74:1195-1202.
- Barna-Vetro, I., E. Szabo, B. Fazekas and L. Solti. 2000. Development of sensitive ELISA for the determination of fumonisin B₁ in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 48:2821-2825.
- Bean, G. A and R. Echandi. 1989. Maize micotoxinas in Latin American. *Plant Dis.* 73:597-600.
- Bennett J. 1987. Mycotoxins, mycotoxicosis, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathologia* 100:3-5.
- Bertechini Faria, C., Lumi Abe, C. A., Novais da Silva, C., Tessmann, D. J. and Barbosa-Tessmann, I. P. 2012. New PCR Assays for the Identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and Other Species of the *Gibberella fujikuroi* Complex. *International Journal of Molecular Sciences*. 13:115-132.
- Bevivino, A., V. Peggion, L. Chiarini, S. Tabacchioni, C. Cantale y C. Dalmastri. 2005. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. *Research in Microbiology*. 156:974-983.
- Bezuidenhout, S. J., W. C. A. Gelderblom, C. P. Gorst-Allman, R. M. Horak, W. F. O. Marasas, G. Spiteller and R. Vlegaar. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Commun.* 63:743-745.
- Booth, C. 1977. The Genus *Fusarium* Kew Surrey. England Commonwealth Mycological Institute 237 p.
- Brown, R. L., Z. Y. Chen, T. E. Cleveland. and J. S. Russin. 2001. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 89:113-117.

- Brown, D. W., F. Cheung, R. H. Proctor, R. A. E. Butchko, L. Zheng, Y. Lee, T. Utterback, S. Smith, T. Feldblyum, A. E. Glenn, R. D. Plattner, D. F. Kendra, C. D. Town and C. A. Whitelaw. 2005. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 42:848-861.
- Burgess, L. W. and D. Trimboli. 1986. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. Nov. *Mycologia*. 78:223-229.
- Bush, B., M. Carson, M. Cubeta, W. Hagler y G. Payn. 2004. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* 94:99-93.
- Campos, H. 1995. Marcadores moleculares: Conceptos. Notas Técnicas. *Agro Sur* 23:68:75.
- Campos, H. y H. Salvo. 1995. Marcadores moleculares. Aplicaciones al mejoramiento genético de plantas. Notas Técnicas. *Agro Sur* 23:173-185.
- Cardwell, K. F., J. G. Kling, B. Maziya-Dixon and N. A. Bosque-Perez. 2000. Interaction between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in lowland Africa. *Phytopathology* 90:276-284.
- Carvajal, M., I. Méndez, F. Rojo; D. Jeffers y S. Ayvar. 1997. Micotoxinas producidas por *Fusarium moniliforme* Sheldon, en el cultivo de maíz. Memorias de II Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Maracay, Venezuela. p 117.
- Carter, J., H. Rezanoor, D. Holden, A. Desjardin, R. Plattner and P. Nicholson. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *J. Plant Pathol.* 108:573-583.
- Castillo, Y. 2009. Métodos de aplicación de *Trichoderma sp* para el control de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. En maíz (*Zea mays* L.). Tesis Mag.Sc. Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 62 p.
- Cati, S y C. Mazzani. 1991. Micoflora de granos de maíz almacenados en el estado Guárico (Venezuela): Identificación y cuantificación. *Rev. Fitopatología Venezolana* 4:54 (Resumen).

- Cavaglieri, L. R., A. Passone y M. G. Etcheverry. 2004. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biological Control*. 31:259-267.
- Cavaglieri, L., M. Rodríguez, S. Chulze and M. Etcheverry. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microb.* 156:748-754.
- Chavarri, M., O. Luzón, C. Mazzani, C. González, J. Alezones y M. Garrido. 2009. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 22:2-7.
- Chirinos, J. 2003. Estudio preliminar del control *in vitro* de *Fusarium* sp. mediante uso de extractos vegetales. *Rev. Fitopatología venezolana* 16:92 (Resumen).
- Chu, F., M. Trucksess and D. Park. 1989. Evaluation By enzyme-linked immunosorbent assay for thin-layer chromatography of aflatoxin B₁ in corn, peanut and peanut butter. *Journal Association Off. Annal. Chem.* 71:126.
- CIMMYT (México). 2004. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT: Enfermedades del maíz. [on line]. <http://.cimmyt.org> [Consultado 25-06-2010].
- Clay, K., 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21:275-297.
- Cocchi, S., M. Codeluppi, C. Venturelli, A. Bedini, A. Grottola, W. Gennari, F. Cavrini, F. Di Benedetto, N. De Ruvo, F. Rumpianesi, G. E. Gerunda and G. Guaraldi. 2011. *Fusarium verticillioides* fungemia in a liver transplantation patient: successful treatment with voriconazole. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 71:438-441.
- Cotten, T. and G. Munkvold. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88:550-555.
- Covarelli, L., G. Beccari and S. Salvi. 2011. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. *Food and Chemical Toxicology*. 49:2365-2369.
- Crous, P. 2005. Impact of molecular phylogenetic on the taxonomy and diagnostics of fungi. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35:47-51.

- Cuero, R. 2000. Interactive action of metal ions, and fertilizer and micotoxins formation: effects on toxigenic fungal DNA/RNA and growth. Proceeding X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins. Sao Paulo, Brasil. pp. 165.
- Dalié, A., L. Pinson-Gadais, V. Atanasova-Penichon, G. Marchegay, C. Barreau, A. Deschamps and F. Richard-Forget. 2012. Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Food Control*. 23:405-411.
- Dambolena, J. S. A. G. López, M. C. Cánepa, M. G. Theumer, J. A. Zygadlo and H. R. Rubinstein. 2008. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon*. 51:37-44.
- Dambolena, J. S., A. G. López, H. R. Rubinstein y J. A. Zygadlo. 2010a. Effects of menthol stereoisomers on the growth, sporulation and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides*. *Food Chemistry*. 123:165-170.
- Dambolena, J. S., M. P. Zunino, A. G. López, H. R. Rubinstein, J. A. Zygadlo, J. W. Mwangi, G. N. Thoithi, I. O. Kibwage, J. M. Mwalukumbi and S. T. Kariuki. 2010b. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11:410-414.
- Dambolena, J. S., J. A. Zygadlo and H. R. Rubinstein. 2011. Antifumonisin activity of natural phenolic compounds A structure–property–activity relationship study. *International Journal of Food Microbiology*. 145:140-146.
- De Alfred, M., C. Sullards, E. Wang, K. Voss and R. Riley. 2001. Sphingolipid Metabolism: Rols in signal traduction and disruption by fumonisinas. *Environmental Health Perspectives Supplements* 109:283-289.
- De Curtis, F., V. De Ciccoa, M. Haidukowski, M. Pascale, S. Somma and A. Moretti. 2011. Effects of agrochemical treatments on the occurrence of *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of maize in Southern Italy. *Field Crops Research*. 123: 161-169.

- De las Heras, G. 2004. Caracterización de genes de poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* y su análisis en sistemas heterólogos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. 175 p.
- De Oliveira Rocha, L., G. Martins Reis, V. Nascimento da Silva, R. Braghini, M. M. Geraldes Teixeira and B. Corrêa. 2011. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 145:9-21.
- Desjardins, A. E. and R. Platter. 2000. Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J. Agric. Food Chem.* 48:5773-5780.
- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium*. Micotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. U.S.A. 260 p.
- Desjardins, A. E. and R. H. Proctor. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 119:47-50.
- Dersjant-Li, Y., M. W. A. Verstegen and W. J. J. Gerrits. 2003. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*. 16:223-239.
- Díaz, J., F. Miranda, M. Cerovich y F. Figueroa. 2007. Incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas certificadas de maíz producidas en la región central de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:74 (Resumen).
- Doko, M., C. Canet, N. Brown, E. Sydenham, S. Mpuchance and B. Siame. 1996. Natural Co-occurrence of fumonisin and zearalenone in cereals and cereal-based foods from eastern and southern Africa. *J. Agric. Food Chem* 44:3240-3243.
- Doll, S. and S. Danicke. 2011. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Preventive Veterinary Medicine*. 102:132-145.
- Dowd, P. 2003. Insect management to facilitate preharvest mycotoxin management. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 22:327-350.
- Duvick, J. 2001. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental Health Perspectives* 109:337-342.

- Edel, V., C. Steinberg, I. Avelange, G. Laguerre and C. Alabouvette. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*, 85: 579-585.
- Escande, A. 2000. Enfermedades del maíz. [on line]. <http://www.inta.gov.arg>. [Consultado 05-06-2010].
- Escobar, E. 2000. Aislamiento, cuantificación e identificación de los principales mohos presentes en el grano de maíz (*Zea mays*) proveniente de los estados Portuguesa, Yaracuy y Bolívar y determinación de los niveles de Aflatoxinas y Fumonisin. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. pp. 1-10.
- Etcheverry, M., M. L. Torres, S. Ramírez, S. N. Chulze and N. Magan. 2002. In vitro control of growth and fumonisin production by *F. verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *J. Appl. Microbiol.* 92:624-632.
- Fanelli, F., M. Schmidt-Heydt, M. Haidukowski, A. Susca, R. Geisen, A. Logrieco y G. Mulè. 2011. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, doi: 10.1016/j.funbio.2011.11.007.
- FAO, 2008. Production Yearbook. Vol. 53. 80 p.
- FAO, 2000. Mycotoxin in grain: What are mycotoxins?. [Consulta en línea: Junio 03/06/10]. <http://www.Fao.Org/wairdocs/x5008e//5008e01.htm>.
- Fandohan, P., B. Gnonlonfin, K. Hell, W. F. O. Marasas and M. J. Wingfield. 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *International Journal of Food Microbiology*. 99:173-183.
- Farnochi, M. C., A. M. Torres, N. Magan and S. N. Chulze. 2005. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain. *Journal of Stored Products Research*. 41:211-219.
- Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2da. Ed., EMBRAPA-CENARGEN, Brasil. 220 p.

- Ferreira-Castro, F. L., S. Aquinob, R. Greiner, D. H. B. Ribeiro, T. A. Reisa y B. Correa. 2007. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. *Applied Radiation and Isotopes*. 65:927-933.
- Ferrer, C., F. Colom, S. Fransés, E. Mulet, J. Abad and J. Alio. 2004. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J. Clinical Microbiol.* 39:2873-2879.
- Figueroa-Gómez, R. M., M. M. Reynoso y W. P. Reyes-Velázquez. 2007. Control del crecimiento y producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* usando butilhidroxianisol bajo diferentes condiciones de actividad de agua. *Scientia-CUCBA* 9:23-30.
- Fontana, M. y C. González. (Compiladores). 2000. El maíz en Venezuela. Caracas, Venezuela. Fundación Polar. 530 pp.
- Fouquaert, E., W. J. Peumans, G. Gheysen, Els J.M. Van Damme. 2011. Identical homologs of the *Galanthus nivalis* agglutinin in *Zea mays* and *Fusarium verticillioides*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49:46-54.
- Gallardo, E., G. Ibarra and R. Sánchez. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisinas B₁ por cepas de *Fusarium moniliforme* (Saac.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:27-34.
- Garcia, D., A. J. Ramos, V. Sanchis and S. Marín. 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology*. 26:757-769.
- Garcia, D., A. J. Ramos, V. Sanchis and Sonia Marín. 2011. Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *International Journal of Food Microbiology*. Accepted 22 October 2011.
- Gelderblom, W. C. A., D. Galendo, S. Abel, S. Swanevelder, W. F. O. Marasas and C. P. Wild. 2001. Cancer initiation by fumonisin B1 in rat liver-role of cell proliferation. *Cancer Letters*. 169:127-137.
- Ghiasian, S. A., A. H. Maghsood, H. Yazdanpanah, G. S. Shephard, L. Van Der Westhuizen, H. F. Vismer, J. P. Rheeder, and W. F. O. Marasas. 2006. Incidence of *Fusarium verticillioides* and Levels of Fumonisins in Corn from Main Production Areas in Iran. *J. Agric. Food Chem.* 54:6118-6122.

- Giorni, P., N. Magan and P. Battilani. 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *International Journal of Food Microbiology*. 130:213-218.
- Giorda, L. and D. Peiretti. 2006. Respuesta de germoplasma de maíz a infecciones por *Fusarium verticillioides* y contaminación con fumonisinas. In: Rubinstein, H.R. ed. Micotoxinas: Impacto en la producción y salud humana y animal. Cap. 5. Universidad Nacional de Córdoba. p. 125-138.
- Glenn, A. E. 2010. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 137:213-240.
- Gómez, E. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. 225 p.
- González, C. M. y J. Simpson. 1991. Uso de los marcadores genéticos moleculares (RFLPs) en la agricultura. En Investigación a biología e ingeniería genética. pp. 204-222.
- González, M. 2002. Principales enfermedades del maíz. I Jornadas de actualización de manejo integrado de artrópodos y enfermedades plagas. Maracay, Venezuela. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Memorias.
- Goyo, Y., A. Carmona y N. Méndez. 2005. Reducción de la incidencia de *Fusarium moniliforme* en plantas de maíz controlando larvas de *Spodoptera frugiperda* con *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Fitopatología Venezolana* 18:94 (Resumen).
- Gqaleni, N., J. Smith, J. Lacey and G. Gettinby. 1997. Effects of temperature water activity, and incubation time on production of aflatoxinas and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and Environmental microbiology* 63:1048-1053.
- Hassan, M., M. Hussein, I. Baxter, G. Andrew and R. Franich. 1991. Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from New Zealand maize fields. *Micopathology* 113:35-40.

- Hausner, G., G. Inglis, L. Yanke, L. Kawchut and T. McAllister. 2000. Analysis of restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA of a selection of anaerobic chytrids. *Can. J. Bot.* 78:917-927.
- Headrick, J. M. and J. K. Pataky. 1989. Resistance to kernel infection by *Fusarium moniliforme* in inbred lines of sweet corn and effect of infection on emergence. *Plant Dis.* 73:887-892.
- Headrick, J., J. Pataky and J. Juvik. 1990. Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 80:487-494.
- Hell, K., K. F. Cardwell, M. Setamou and H. Poehling. 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, West Africa. *J. Stored Prod. Res.* 36:365-382.
- Hernández-Rodríguez, A., M. Heydrich-Pérez, Y. Acebo-Guerrero, M. G. Velázquez-del Valle and A. N. Hernández-Lauzardo. 2008. Antagonistic activity of Cuban native *rhizobacteria* against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. In maize (*Zea mays* L.). *Applied soil ecology.* 39: 180-186.
- Hinojo, M., A. Llorens, R. Mateo, B. Patiño, M. González and M. Jiménez. 2004. Utility of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms of the intergenic spacer region of the rDNA for characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:681-688.
- Hoenish, R. W. and R. M. Davis. 1994. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. *Plant Dis.* 78:517-519.
- Homsi, W. 2002. Producción de fumonisinas *in vitro* por cepas nativas de *Fusarium moniliforme* aislados de maíz procedentes de tres estados de Venezuela. Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela. 62 p.
- IBCE. 2009. Instituto Bolivariano de Comercio Exterior. Base de datos estadísticos. [Consulta en línea: junio 03-2012]. Disponible en: http://www.ibce.org.bo/informacionmercados/estudios_mercado.asp?sector=1&n=agropecuario%20%28alimentos%29.

- Jiménez, M., S. Rodríguez, J. Mateo, J. Gil and R. Mateo. 2000. Characterization of *Gibberella fujikuroi* complex isolates by fumonisin B1 and B2 analysis and by RAPD and restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Systematic Appl. Microb.* 23:546-555.
- Jones, R., H. Duncan and P. Hamilton. 1981. Planting date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathology* 71:810-811.
- Jugenheimer, R. 1990. Maíz. Variedades mejoradas, método de cultivo y producción de semillas. Noriega 4^a reimpresión. México. 834 pp.
- Jurado, M., C. Vázquez, S. Marín, V. Sanchis and M. T. González-Jaén. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology.* 29:681-689.
- Kim, H., Y. Choi and B. Min. 2001. Variation of the intergenic spacer (IGS) region ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* form special. *J. Microbiol.* 39:265-272.
- Kim, H. and C. P. Woloshuk. 2008. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology.* 45:947-953.
- Kleinschmidt, C. E., M. J. Clements, C. M. Maragos, J. M. Pataky and D. G. White. 2005. Evaluation of food-grade dent corn hybrids for severity of *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in grain. *Plant Dis.* 89:291-297.
- Koehler, B. 1942. Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *J. Agric. Res.* 64:421-442.
- Konstantinova, P. and T. Yli-Mattila. 2004. IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. *Int. J. Food Microbiol.* 95:321-331.
- Kuldao, G., N. Zitomer and C. Bacon. 2001. Distribution and regulation of fusaric acid production in the genus *Fusarium*. *Phytopatology* 91:S51.

- Lanubile, A., Pasini, L. and Marocco, A. 2010. Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *Journal of Plant Physiology*. 167:1398-1406.
- Laurent, D., M. Lanson, N. Goasdue, F. Kohler, F. Pellegrin and N. Platzer. 1990. Étude en RMN ^1H et ^{13}C de la Macrofusine, toxine isolée de maïs infecté par *Fusarium oniliforme* Sheld. *Analisis* 18:172-179.
- Leslie, J. F., C. Pearson, P. Nelson and T. Toussoun. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80:343.350.
- Leslie, J. F., K. Zeller, S. Lamprechr, J. Rheeder and W. Marasas. 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology* 95:275-283.
- Leslie, J. F. and B. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. State Avenue, Amer, Iowa, USA. 388 p.
- Levin, L., A. Ridao y F. Castaño. 2003. Fusariosis de la espiga en el maíz. INTA: 20^a Jornada de actualización profesional en cultivos de verano. Mar del Plata, 19 de setiembre de 2003. p. 165.
- Li, F. Q., Y. Takumi, K. Osamu, X. Y. Luo and Y. W. Li. 2001. Aflatoxins and fumonisinas in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J. Agric. Food Chem.* 49:4122-4126.
- Lino, C., L. Silva i A. Pena. 2004. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 99:181-192.
- Lino, C. M., L. J. G. Silva, A. Pena, M. Fernández and J. Mañes. 2007. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in broa, typical Portuguese maize bread. *International Journal of Food Microbiology*. 118:79-82.
- Lorens, A., M. Hinojo, R. Mateo, A. Medina, F. Valle, M. González and M. Jiménez. 2006. Variability and characterization of micotoxin-producing *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rRNA región. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89:465-478.

- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M. y González-Jaén, T. 2007. Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*. 68:312-317.
- Luzón, O., A. Martínez, C. Mazzani, V. Barrientos y R. Figueroa. 2003. Comportamiento de genotipos de maíz de grano amarillo ante *Fusarium moniliforme* y las fumonisinas en dos localidades de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 16:17-21.
- Luzón, O., M. Chavarri, C. Mazzani, V. Barrientos y J. Alezone. 2007. Principales mohos y micotoxinas asociados a granos de maíz en campos de los estados Guárico, Portuguesa y Yaracuy, Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:25-30.
- McGee, D. 1988. Maize Disease: a reference source for seed technologists. St. Paul, Minnesota. APS Press. pp. 13-15.
- Magan, N. 2000. Ecology and potential control of mycotoxigenic fungi and micotoxins in cereals. En resumen de memorias del III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Córdoba, Argentina. p. 11.
- Magan, N. and D. Aldred. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*. 119:131-139.
- Maiorano, A., A. Reyneri, D. Sacco, A. Magni y C. Rampon. 2009. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protection*. 28:243-256.
- Malaguti, G. 2000. El maíz en Venezuela. Fundación para la investigación Agrícola DANAC. Fundación Polar. Yaracuy, Venezuela. 530 pp.
- Mallmann, C. A. y P. Dilkin. 2007. Fumonisin en Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. Sociedade Vicente Pallotti-Editora, Santa Maria, Brasil. pp. 105-127.
- Malonek, S., C. Bomke, E. Bornberg, M.C. Rojas, P. Hedden, P. Hopkins and B. Udzyński. 2005 Distribution of gibberellin biosynthetic genes and 46 gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66:1296-1311.
- Marasas, W. F. O., K. Jaskiewicz, F. Venter, W. Gelderblom, J. Coetzer, P. Thiel and J. Vander Lugt. 1988. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. Med. J.* 74:110-114.

- Marasas, W. F. O. 2001. Discovery and occurrence of the fumonisinas: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives Supplements* 109:239-243.
- Marín, S., V. Sanchis, R. Teixido, D. Saenz, A. J. Ramos and N. Magan. 1996. Water activity and temperature relationship and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can. J. Food Microb.* 42:1045-1050.
- Marín, S., V. Sanchis, A. J. Ramos and N. Magan. 1998. Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *proliferatum* during colonization of maize. *Intern. J. Food Microb.* 42:185-194.
- Marín, S., A. Vellunti, A. J. Ramos and V. Sanchis. 2004. Effects of essential oils on zearalenona and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterelized maize grain. *Food Microbiology* 21:313-318.
- Martín, S., X. Albareda, A. Ramos and V. Sanchis. 2001. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B₁ and aflatoxinas on maize grains. *J. Sci. Food Agric.* 81:1060-1068.
- MAT. 2008. Ministerio de Agricultura y Tierras. Base de datos estadísticos. [Consulta en línea: Junio 09-2012]. Disponible en: <http://www.fedeagro.org/produccion/default.asp>.
- Mazzani, C. y O. Borges. 1993. Ocurrencia de *Fusarium moniliforme* en granos de maíz de siembras experimentales en Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana.* 6:47-48.
- Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 1997. *Fusarium moniliforme* y fumonisinas en granos de híbridos de maíz blanco y amarillo de siembras experimentales en el estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 10:38 (Resumen).
- Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 12:9-13.

- Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el estado Guárico, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 17:185-195.
- Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 2001. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in kernels of maize hybrids in Venezuela. *Brazilian J. Microb.* 32:345-349.
- Mazzani, C. 2002. Hongos y micotoxinas asociadas a granos de maíz (*Zea mays*, L.) y su importancia en Venezuela. *In IX curso de producción de maíz*. S. Cabrera (Ed.). Portuguesa, Venezuela. INIA-CIMMYT-Asopotuguesa. Pp 291-305.
- Mazzani, C. 2005. Control integrado de mohos toxigénicos y micotoxinas en granos. Barquisimeto, Venezuela. XIX Congreso Venezolano de Fitopatología.
- Mazzani, C., O. Luzón, M. Chavarri, J. Núñez y I. Rodríguez. 2007. *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en granos de maíz (*Zea mays*, L.), almacenados en los estados Anzoátegui, Carabobo y Monagas durante los años 2005-2006. *Rev. Fitopatología Venezolana* 23:63 (Resumen).
- Mazzani, C., O. Luzón, M. Chavarri, M. Fernández y N. Hernández. 2008. *Fusarium verticillioides* en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 21:18-22.
- Medina, C., L. Subero y N. Sanabria. 2007a. Incidencia de *Fusarium moniliforme* (Sheldon) en semillas de dos híbridos de maíz (*Zea mays*, L.) y ubicación del hongo en la semilla. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:73 (Resumen).
- Medina, C., L. Subero y N. Sanabria. 2007b. Transmisión de *Fusarium moniliforme* (Sheldon) por semillas de dos híbridos de maíz (*Zea mays*, L.). *Fitopatología Venezolana* 20:96 (Resumen).
- Mendoza, M., E. Andrio, A. López, R. Rodríguez, L. Latournerie y S. Rodríguez. 2006. Tasa de infección de la pudrición del tallo en maíz, causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía Mesoamericana* 17:19-24.
- Menniti, A. M., R. Gregori y F. Neri. 2010. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. *International Journal of Food Microbiology*. 136:304-309.

- Merrill, A. Jr., M. Sullards, E. Wang, K. Voss and R. Riley. 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Persp.* 2:283-289.
- Mirhendi, S., P. Kordbacheh, B. Kazemi, S. Samiei, M. Pezeshki and M. Khorramizadeh. 2001. A PCR-RFLP Method to identification of the important opportunistic fungi: *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus famigatus* and *Fusarium solani*. *Iranian J. Publ. Health.* 30:103-106.
- Mishra, P., R. Fox and A. Culham. 2002. Restriction analysis of PCR amplified nrDNA regions revealed intranspecific variation within populations of *Fusarium colmorum*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 215:291-296.
- Mulé, G., A. Logrieco, A. Bottalico and G. Stea. 1994. Screening for *Fusarium toxigénica* isolates using larvae of *Galleria mellonella*. *Micotoxin Res.* 10:41-46.
- Mulé, G., A. Surca, G. Stea and A. Moretti. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulina partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:495-502.
- Multhon, J. 1988. Interaction between water and the constituents of grains, seeds and by-products. En: Preservation and storage of grains, seeds and their by-products. Multhon, J. L. (Ed.), Lavoisier, New York.
- Munkvold, G. P., D. E. McGee and W. Carlton. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87:209-217.
- Naeini, A., T. Ziglari, H. Shokri and A. R. Khosravi. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale.* 20:174-178.
- Nesvorná, M., L. Gabrielová and J. Hubert. 2012. Suitability of a range of *Fusarium* species to sustain populations of three stored product mite species (Acari: Astigmata). *Journal of Stored Products Research.* 48:37-45.
- Nicolaisen, M., S. Supronienė, L. K. Nielsen, I. Lazzaro, N. H. Spliid, and A. F. Justesen. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods.* 76:234-240.
- Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology.* 119:38-46.

- Nirenber, H. and K. O'Donnell. 1998. New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90:434-458.
- Norred, W. P., E. Wang, H. Yoo, T. Riley and A. Merril. 1992. *In vitro* toxicology of fumonisinas and the mechanistic implications. *Mycopathologia* 117:73-78.
- O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella publicaris*). *Curr. Genet.* 22:213-220.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90:465-493.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T. and Cigelnik, E. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41:61-78.
- Paepens, C., S. De Saeger, L. Sibanda, I. Barna-Vetroä, M. Anselme, Y. Larondelle, and C. Van Peteghem. 2005. Evaluation of Fumonisin Contamination in Cornflakes on the Belgian Market by "Flow-Through" Assay Screening and LC-MS/MS Analyses. *J. Agric. Food Chem.* 53:7337-7343.
- Pascale, M., A. Visconti, M. Pronezuk, H. Wisniewska and J. Chelkowski. 1997. Accumulation of fumonisinas in maize hybrids inoculated under field condition with *Fusarium moniliforme* Sheldon. *J. Sci. Food Agric.* 74:1-16.
- Patiño, B., S. Mirete, M. T. González-Jaén, G. Mulé, M. T. Rodríguez and L. Vázquez. 2004. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *J. Food Prot.* 67:1278-1283.
- Patiño, B., S. Mirete, C. Vázquez, M. Jiménez, M. Rodríguez and M. González. 2006. Characterization of *Fusarium verticillioides* strain by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer región of the rDNA. *J. Sci. Food Agric.* 86:429-435.
- Patterson, M. and A. Damoglou. 1986. The effect of water activity and pH on the production of mycotoxin by fungi growing on breat analogue. *Letter Applied of Microbiology* 3:117-128.

- Pereira, P., Nesci, A. y Etcheverry, M. 2007. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biological Control* 42:281-287.
- Pereira, P., A. Nesci, C. Castillo y M. Etcheverry. 2010. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. *Biological Control*. 53:258-266.
- Pineda, J. y A. Carrasco. 1997. Presencia y establecimiento de *Fusarium moniliforme* en inflorescencias y mazorcas de maíz (*Zea mays*), L.). *Rev. Fitopatología Venezolana*. 10:29 (Resumen).
- Pineda, J. y P. Querales. 1999. Dispersión diaria de inóculo de algunas especies de *Fusarium* asociadas al cultivo del maíz. *Rev. Fitopatología Venezolana* 12:58 (Resumen).
- Pineda, J., P. Querales y N. Méndez. 2001. Dispersión de esporas de *Fusarium moniliforme* en cuatro localidades del centro occidente de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 14:64 (Resumen).
- Placinta, C. M., J. P. F. D'Mello and A. M. C. MacDonald. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. Tech.* 78:21-37.
- Presello, D. A., G. Botta y J. Iglesias. 2005. Resistencia a la contaminación a campo con fumonisinas en cultivares de maíz. Actas del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- Presello, D. A., J. Iglesias, G. Botta, G. y H. Eyhérbide. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. *Crop Protection*. 26:852-855.
- Presello, D. A., G., Botta, J. Iglesias, and G.H. Eyhérbide, 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection*. 27:572-576.
- Proctor, R. H., R. D. Plattner, D. W. Brown, J. A. Seo and Y. W. Lee. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol. Res.* 108:815-822.

- Radford, A. 1993. A fungal phylogeny based upon orotidine-59-monophosphate descarboxylase. *J. Mol. Evol.* 36:389-395.
- Rangel, L. 2005. Producción de fumonisinas en genotipos de maíz inoculados *in vitro* con aislamientos venezolanos de *Fusarium moniliforme*. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 52 p.
- Raybaudi, R., I. Benítez, A. Martínez, O. Luzón y C. González. 2005. Relación entre las concentraciones de hierro, cobre y zinc, y la incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en maíz. *Rev. Fitopatología Venezolana*. 18:15-19.
- Reid, L. and R. Hamilton. 1996. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration, and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. *Can. J. Plant Pathol.* 18:279-285.
- Reynoso, M. M; A. M Torres; M. Ramírez; M. I. Rodríguez; S. N. Chulze and N. Magan. 2002. Efficacy of antioxidant mixtures on growth fumonisin production and hydrolytic enzyme production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* *in vitro* on maize-based media. *Mycol. Res.* 106:1093-1099.
- Rheeder, J. P., A. San Juan and J. Placencia. 2005. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2101-2105.
- Rice, J., B. Pinkerton, W. Stringer and D. Unersander. 1990. Seed production in tall fescue as affected by a fungal endophyte. *Crop. Sci.* 30:1303-1305.
- Riera, B., Arcia, M. A. y N. Sanabria. 1999. Patogenicidad de *Fusarium moniliforme* en plátulas de maíz. *Rev. Fitopatología Venezolana* 12:47 (Resumen).
- Rodríguez, C., J. Pineda y O. Jiménez. 2003. Aplicación de *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Fusarium* sp. en frijol (*Vigna unguiculata*). *Rev. Fitopatología Venezolana* 16:48 (Resumen).
- Ruíz-Cendoya, M., F. J. Pastor, J. Capilla y J. Guarro. 2011. Treatment of murine *Fusarium verticillioides* infection with liposomal amphotericin B plus terbinafine. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 37:58-61.
- Sabino, M. 2006. O controle de alimento com relacao as micotoxinas no Brasil: impacto na saude pública. Livro de Resumos V congreso Latino-Americano de Micotoxicología. Florianopolis, Brasil. pp. 46-47.

- Salazar, E. G. 1998. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En: Técnicas moleculares aplicadas a la agricultura. Departamento de Biotecnología. CENIAP-IIA. 23-29 mayo. Multigrafiado.
- Samapundo, S., B. De Meulenaer, A. Atukwase, J. Debevere y F. Devlieghere. 2007a. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *International Journal of Food Microbiology*. 114:160-167.
- Samapundo, S., F. Devlieghere, B. De Meulenaer y J. Debevere. 2007b. Growth kinetics of cultures from single spores of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* on yellow dent corn meal. *International Journal of Food Microbiology*. 24:336-345.
- Sampietro, D. A., M. A. Vattuone, D. A. Presello, C. M. Fauguel and C. A. N. Catalán. 2009. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection*. 28:196-200.
- Sampietro, D. A., P. Marín, J. Iglesias, D. A. Presello, M. A. Vattuone, C. A. N. Catalan and M. T. Gonzalez Jaen. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal biology*. 114:74-81.
- Samson, R., Hoekstra, E. and Frisvad, J. 2004. Introduction to food borne fungi, 7 th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Sanabria, M. E., D. Rodríguez y J. L. Rodríguez. 2003. Control *in vitro* de *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* y *Alternaria solani* con extractos de etanólico de *Phyllanthus niruri*. *Rev. Fitopatología Venezolana* 16:108 (Resumen).
- Sánchez, D. 2005. Aislamiento y detección de *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz. Tesis de Grado. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química, UNAM. Mexico.
- Sánchez-Rangel, D. A., A. San Juan-Badillo and J. Plasencia. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53:8565-8571.

- Sanz, S., E. Arnao, B. Borges y A. González. 2007. Estandarización de la Técnica AFLP para la caracterización genética de géneros de hongos. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:98 (Resumen).
- Sartori, M., A. Nesci and M. Etcheverry. 2010. Impact of osmotic/matric stress and heat shock on environmental tolerance induction of bacterial biocontrol agents against *Fusarium verticillioides*. *Research in Microbiology*. 161:681-686.
- Schulthess, K., K. Cardwell and S. Gounou. 2002. The effect to endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by *Lipidopterous* stemborers and *Coleopteran* grain feeders. *Phytopathology* 92:121-128.
- Schwerdt, G., M. Königs, H. Holzinger, H. U. Humpf and M. Gekle. 2009. Effects of the mycotoxin fumonisin B1 on cell death in human kidney cells and human lung fibroblasts in primary culture. *J. Appl. Toxicol.* 29:174-182.
- Scussel, V. 2006. Esophageal cancer in the south of Brazil and its relation to food habits. Livro de resumos V Congreso Latinoamericano de micotoxicología. Florianopolis, Brazil. P. 39.
- Segovia, V. F. y Alfaro, Y. J. 2009. El Maíz: un rubro estratégico para la soberanía agroalimentaria de los venezolanos. *Agronomía Trop.* 59:237-247.
- Seifert, K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15-28.
- Sekhon, R. S., G. Kuldau, M. Mansfield and S. Chopra. 2006. Characterization of *Fusarium*-induced expression of flavonoids and PR genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 69:109-117.
- Seo, J. A. R. H. Proctor and R. D. Plattner. 2001. Characterization of Four Clustered and Coregulated Genes Associated with Fumonisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 34:155-165.
- Shelby, R. A., D. G. White and E. M. Bauske. 1994. Differential fumonisin production in maize hybrids. *Plant Dis.* 98:582-584.
- Shephard, G. S., L. Van Der Westhuizen, P. M. Gatyeni, N. I. M. Somdyala, H. M. Burger, and W. F. O. MARASAS. 2005. Fumonisin Mycotoxins in Traditional Xhosa Maize Beer in South Africa. *J. Agric. Food Chem.* 53:9634-9637.

- Shier, W., H. Abbas and J. Mirocha. 1991. Toxicity of the mycotoxins fumonisinas B₁ and B₂ and *Alternaria alternate* f. sp. *Lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. *Micopathologia* 116:97-104.
- Sichel, C., M. de Cara, J. Tello, J. Blanco and P. Fernández-Ibáñez. 2007. Solar photocatalytic disinfection of agricultural pathogenic fungi: *Fusarium* species. *Applied Catalysis B: Environmental*. 74:152-160.
- Singh, D. and T. Singh. 1977. Location of *Fusarium moniliforme* in kernels of maize and disease transmission. *Indian J. Micol Plant Pathol*. 7:32-38.
- Slightom, Y., R. Drong and P. Chee. 1995. Polimerase chain reaction: gene detection, inverse PCR, and genetic engineering. *Plant molecular Biol. Manual* 4:1-24.
- Stepien, L., G. Koczyk and A. Waskiewicz. 2011. FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal biology*. 115:112-123.
- Stockmann-Juvala, H., H. Alenius and K. Savolainen. 2008. Effects of fumonisin B1 on the expression of cytokines and chemokines in human dendritic cells. *Food and Chemical Toxicology*. 46:1444-1451.
- Styer, R., and D. Cantliffe. 1984. Dependence of seed vigor during germination on carbohydrate source in endosperm mutants of maize. *Plant Physiol*. 76:196-200.
- Suárez, O. 1993. Impacto de las fumonisinas en la producción animal. Seminario Científico Internacional en Micotoxinas. II Congreso de Ciencias Veterinarias. Maracay, Venezuela. pp. 56-63.
- Suanthie, Y., M. A. Cousin and C. P. Woloshuk. 2009. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Journal of Stored Products Research*. 45:139-145.
- Sweets, L. and A. Wrather. 2000. Integrated pest management corn disease. University of Missouri. Manual. 24 pp.
- Theumer, M. G., A. G. López, M. P. Aoki, M. C. Cánepa, H. R. Rubinstein. 2008. Subchronic mycotoxicoses in rats. Histopathological changes and modulation of the sphinganine to sphingosine (Sa/So) ratio imbalance induced by *Fusarium verticillioides* culture material, due to the coexistence of aflatoxin B1 in the diet. *Food and Chemical Toxicology*. 46:967-977.

- Thompson, D. P., L. Matervia and T. Vessel. 1993. Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *J. Food Prot.* 56: 134-138.
- Thompson, D. P. 1994. Minimum inhibitory concentrations of esters of p-hydroxybenzoic acid (paraben) combinations against toxicogénica fungi. *J. Food Prot.* 57:133-135.
- Torres, A. M., M. L. Ramirez, M. Arroyo, S. N. Chulze and N. Magan. 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *Intern J. Food Microb.* 83:319-324.
- Torres, M. R., A. J. Ramos, J. Soler, V. Sanchis and S. Marín. 2003. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *International Journal of Food Microbiology.* 81:185-193.
- Trimboli, D.S. and L. W. Burgess. 1983. Reproduction of *Fusarium moniliforme* basal stalk rot and root of grain sorghum in the greenhouse. *Plant Dis.* 67:891-894.
- Tsai, H., J. Liu, M. Christensen, G. Latch, M. Siegel and C. Schardl. 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloe* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2542-2546.
- Udoh, J., K. Cardwell and T. Ikotum. 2000. Storage structures and aflatoxin content of maize in five agroecological zones of Nigeria. *J. Stored Products Res.* 36:187-201.
- Van Der Merwe, N. J., A. Curtenius R. y J. C. Vogel. 1981. Isotopic evidence for prehistoric subsistence change at Parmana, Venezuela. *Nature* 292:536-538.
- Vanara, F., A. Reyner and M. Blandino. 2009. Fate of fumonisin B1 in the processing of whole maize kernels during dry-milling. *Food Control.* 20:235-238.
- Vegier, R., L. Reid, K. Seifert, D. Steward and R. Hamilton. 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Plant Pathol.* 19:60-65.
- Velluti, A. 2002. Ecosifología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida. Escola Tecnica d'Enginyeria Agraria. España. 151 p.

- Velluti, A., S. Marín, Pilar Gonzalez, Antonio J. Ramos, Vicente Sanchis. 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology*. 21:649-656.
- Verslues, P., M. Agarwal, S. Katiyar and J. Zhu. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*. 45:523-539.
- Viquez, O. M., P. M. E. Castel and R. A. Shelby. 1996. Occurrence of fumonisin B₁ in maize grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem*. 44:2789-2791.
- Visentin, I., G. Tamietti, D. Valentino, E. Portis, P. Karlovsky, A. Moretti y F. Cardinale. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research*. 113:1137-1145.
- Voss, K. A., P. C. Howard, R. T. Riley, R. P. Sharma, T. J. Bucci and R. J. Lorentzen, 2002. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B₁: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). *Cancer Detection and Prevention*. 26:1-9.
- Wallin, J., N. Widstrom and B. Fortnum. 1991. Maize population with resistance to field contamination by aflatoxin B₁. *J. Scic. Food Agric*. 54: 235-238.
- Wang. X. and X. Liu. 2005. Molecular genetics on fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. *J. Hygiene Res*. 34:248-251.
- Wang, J., Y. Zhou, W. Liu, X. Zhu, L. Du and Q. Wang. 2008. Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in china. *Food Chemistry*. 106:241-246.
- White, D. G. 2000. Compendium of corn diseases. Third edition. 78 Pag.
- Wicklow, D. T. 1991. Epidemiology of *Aspergillus flavus* in corn. In Aflatoxin in corn: New Perspective. O. L. Showel and C. R. Hurburg (eds). Iowa Agricultural and Home Experiment Station. Iowa State University. Ames, Iowa-*Research Bulletin* 599. pp 315-327.
- Wicklow, D. T., S. Roth, S. T. Deyrup and J. B. Gloer. 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol. Res*. 109:610-618.

- Widstrom, N. W. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. *Advances in Agronomy* 56:219-280.
- Wilke, A. L., C. R. Bronson and G. Munkvold. 2001. Seed transmission and systemic infection by *Fusarium subglutinans* in maize. *Phytopathology*, 91:S95.
- Wilke, A. L. and C. R. Bronson. 2007. Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Different Temperature Regimes. *Plant Dis.* 91:1109-1115.
- Williams, L. D., A. E. Glenn, C. W. Bacon, M. A. Smith, and R. T. Riley. 2006. Fumonisin Production and Bioavailability to Maize Seedlings Grown from Seeds Inoculated with *Fusarium verticillioides* and Grown in Natural Soils. *J. Agric. Food Chem.* 54:5694-5700.
- Smith, J. A., Seidman, J. G. and Struhl, H., (Eds), unit 2.4.1. John Wiley and Sons, NY, USA.
- Woloshuk, C. and W. Shim. 2000. Regulation of fumonisin biosynthesis, the corn kernel holds the key. In: Proceedings of the Aflatoxin/ Fumonisin Workshop, 2000, p. 48.
- Wu, F. 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 137:363-374.
- Xu, J. and J. Leslie. 1996. A Genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Genetic* :143:175-189.
- Yates, I., C. Bacon and D. Hinton. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium verticillioides* on corn growth and cellular morphology. *Plant Dis.* 81:723-728.
- Yates, I. and A. Jaworski. 2000. Differential growth of *Fusarium verticillioides* relative to tissues from 'Silver Queen', a sweet maize. *Canadian J. Bot.* 78:472-480.
- Yates, I., N. Widstrom, C. Bacon, A. Glenn, D. Hinton, D Sparks and A. Jaworski. 2005. Field performance of maize grown from *Fusarium verticillioides*-inoculated seed. *Mycopathologia* 159:65-73.
- Yates, I. E. and D. Sparks. 2008. *Fusarium verticillioides* dissemination among maize ears of field-grown plants. *Crop Protection*. 27:606-613.
- Yu, F., X. Zhu, L. Du. 2005. Developing a genetic system for functional manipulations of FUM1, a polyketide synthase gene for the biosynthesis of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *FEMS Microbiology Letters*. 248:257-264.

- Zhang, Y., J. Caupert, P. M. Imerman, J. L. Richard, and G. C. Shurson. 2009. The Occurrence and Concentration of Mycotoxins in U.S. Distillers Dried Grains with Solubles. *J. Agric. Food Chem.* 57:9828-9837.
- Zhang, Y., Y. E. Choi, X. Zou and J. R. Xu. 2011. The FvMK1 mitogen-activated protein kinase gene regulates conidiation, pathogenesis, and fumonisin production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology.* 48:71-79.
- Zummo, N. and G. E. Scot. 1992. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. *Plant Dis.* 76:771-773.

CAPITULO II. Identificación e incidencia de aislados de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenber en maíz proveniente de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico.

INTRODUCCIÓN

Fusarium verticillioides se presenta en todo el mundo en las áreas donde se cultiva el maíz. El hongo y/o sus micotoxinas se han aislado a partir de maíz y otras plantas de diversas regiones del mundo, así como en semillas y granos destinados para la siembra y alimentos respectivamente (Burgess, 1981; Shephard *et al.*, 1996). Es un patógeno de campo, pero también lo es de granos almacenados, donde además intervienen insectos en su su diseminación (Armolik y Dickson, 1956; Lamboni y Hell, 2009).

F. verticillioides, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*, son tres especies morfológicamente idénticas que se encuentran en la mayor parte del mundo infectando maíz. Estas tres especies causan síntomas similares como son la pudrición de la mazorca, del tallo y la raíz y el tizón de las plántulas. Estos patógenos producen micotoxinas que se han detectado en los tejidos sintomáticos y asintomáticos (Marasas *et al.*, 1984; Marasas *et al.*, 2000).

En trabajos de investigación se ha encontrado a *F. verticillioides* en muestras de granos de maíz de los estados Portuguesa y Yaracuy (Mazzani *et al.*, 1997; 1999; 2001). En evaluaciones hechas a granos de maíz, procedentes de diferentes localidades de Venezuela, se detectó la presencia de este patógeno en el 100 % de las muestra analizadas (Goyo *et al.*, 2005).

La incidencia de *F. verticillioides* en plantas, semillas y granos de maíz es muy importante por la producción de micotoxinas, las cuales son perjudiciales tanto para los humanos como animales que lo consuman, por lo que amerita un monitoreo constante de la incidencia de esta enfermedad y una efectiva identificación y determinación de este patógeno mediante características morfológicas con la ayuda de la literatura especializada. Por lo antes expuesto se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS.

Objetivo General:

Detectar la presencia de *F. verticillioides* en plantas y granos de maíz procedentes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico y confirmar la identidad de los aislados por el método tradicional.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar la incidencia de *F. verticillioides* en los granos de maíz provenientes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico.
2. Caracterizar aislados de *F. verticillioides* de plantas y granos de maíz provenientes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico mediante características morfológicas.
3. Confirmar la patogenicidad de los aislados de *F. verticillioides* procedentes de las diferentes localidades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo, procedencia del material a evaluar y ubicación de los ensayos.

Para la recolección del material vegetal se realizaron muestreos desde enero de 2010 hasta noviembre de 2011, en varias localidades, las cuales se seleccionaron de acuerdo al número de fincas que tenían el cultivo establecido cuando se realizaron las visitas, así como el tipo de material genético que utilizaron. Se llevaron a cabo las visitas a las localidades productoras de maíz de los estados Aragua (Palo Negro, Villa de Cura, Barbacoa, Maracay-INIA-CENIAP, Puerta Negra, Punta Larga, Valle de Tucutunemo y San Francisco de Asís) y Guárico (El Sombrero, San José de Tiznado, Zaraza, Calabozo, Río Verde y Laguna de Piedra).

En todas las fincas se tomaron muestras de plantas con y sin síntomas, así como de granos, para esto se hizo un recorrido de las plantaciones en zig-zag recolectando el material cada 100 metros al azar, luego se colocaron en bolsas de papel debidamente identificadas y se llevaron al laboratorio de Micología de la Cátedra de Fitopatología del Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay, para ser analizados.

Aislamiento de especies de *Fusarium* presentes en las muestras colectadas

De muestras de hojas, tallos y granos se realizaron aislamientos, con la finalidad de detectar la presencia de *F. verticillioides*. De hojas y tallos se procedió a cortar una porción pequeña de cada muestra entre el área enferma y el área sana que presentó el síntoma de la enfermedad producida por este patógeno; estas porciones pequeñas y los granos se lavaron en hipoclorito de sodio al 2,0% durante 30 seg y 1 min respectivamente; al término de este tiempo, se lavaron con agua destilada esterilizada 3 veces, se secaron entre discos de papel de filtro esterilizado. Luego las hojas y partes de tallos se cortaron en secciones de aproximadamente 2 mm², se colocaron cinco secciones directamente en cápsula Petri conteniendo el medio nutritivo papa, dextrosa, agar (PDA); de igual forma se procedió para

los granos. Las cápsulas con los aislamientos se incubaron a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y luz fluorescente y oscuridad en ciclos de 12 horas diarias durante siete días. Una vez obtenido los aislamientos se transfirió a cápsulas Petri con PDA para purificación y finalmente se colocaron en tubos con PDA inclinado donde se conservaron a $8-10^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizado. Para nombrar cada uno de los aislados obtenido de plantas y granos muestreados, se utilizó un código que consta de la letra F que significa *F. verticillioides* seguido del número correspondiente a la muestra (Da Silva, 2006).

Incidencia de *Fusarium verticillioides* en los granos de maíz.

Para evaluar los porcentajes de la incidencia de granos con el hongo se usó un Diseño estadístico completamente aleatorizado, se tomaron 200 granos por cada muestra o tratamiento, de ellos se hicieron cuatro repeticiones de 50 granos cada una, colocando cinco granos por cápsula Petri (Mazzani *et al.*, 2007) Cada repetición consta de 50 granos: cinco granos/capsula Petri para un total de 10 capsula Petri. Para un total de 40 capsulas por localidad o tratamiento. Las 14 localidades se consideraron como tratamientos (Cuadro 2). Se seleccionaron los granos intactos sin la presencia de daños mecánicos, ni por insectos, y se sembraron en las cápsulas Petri con PDA. Las cápsulas se sellaron con cinta de parafilm, se colocaron en bolsas plásticas para protegerlas de la influencia de factores bióticos y abióticos que pudieran causar efectos en el material a ser evaluado, se incubaron a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante siete días con alternancias de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Las muestras por localidad representaron a los tratamientos, esto con la finalidad de realizar el análisis de varianza.

A Los siete días se realizó la evaluación, de cada cápsula, con la ayuda de lupa estereoscópica marca Swift y microscopio de luz marca Leica Galen III, con la finalidad de detectar colonias de *F. verticillioides* crecidas a partir de los granos. Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje de granos colonizados por *F. verticillioides* (Payne, 1998). Luego a estos porcentajes se le aplicó el método estadístico de Análisis de Varianza con el objetivo de verificar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, despues se les aplicó la prueba de medias de Tukey con la finalidad de constatar diferencias entre los promedios del porcentaje de incidencia de cada localidad.

Cuadro 2.- Evaluación del porcentaje de incidencia de *F. verticillioides* en granos de maíz de diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.

ESTADO	LOCALIDAD	TRATAMIENTO N°	REPETICIÓN
ARAGUA	Palo Negro	2	4
	Villa de Cura	9	4
	Barbacoa	3	4
	Maracay-INIA-CENIAP	1	4
	Puerta Negra	5	4
	Punta Larga	6	4
	Valle de Tucutunemo	7	4
	San Francisco de Asís	8	4
GUÁRICO	El Sombrero	10	4
	San José de Tizado	4	4
	Zaraza	11	4
	Calabozo	12	4
	Rio Verde	13	4
	Laguna de Piedra	14	4

Los criterios adaptados para la evaluación de la incidencia según varios investigadores fueron: Baja de 0-15%, media de 16-30% y alta, mayor de 30%, según adaptación a los criterios seguidos por Mazzani (1999), Hoenish y Davis (1994); Bullerman y Tsai (1994).

Evaluación de la patogenicidad de *Fusarium verticillioides* en maíz

Obtención del inóculo

El inóculo se obtuvo a partir de cada uno de los 101 aislados puros de *F. verticillioides* que se sembraron en los tubos con PDA inclinado. La preparación del inóculo se realizó a partir del patógeno cultivado en cápsulas Petri con PDA previamente incubadas a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante siete días. Verificado el crecimiento y esporulación abundante (colonia cubriendo el 80% de la superficie de la cápsula de Petri) se les agregaron 20 ml de agua destilada esterilizada, luego con un bisturí esterilizado se raspó muy suavemente la colonia procurando separar el micelio y los conidios del hongo. En una cámara de Neubauer se colocó una gota de esta suspensión; con la finalidad de determinar la concentración del inóculo. Ésta permitió realizar el conteo de los conidios usando un microscopio compuesto de luz marca Leica Galen III. La concentración del inóculo se ajustó a 1×10^6 conidios/ml (French y Hebert, 1980).

Preparación de las plántulas

Se utilizaron semillas sanas de maíz blanco del Híbrido Dorado 5 de la empresa Semillas Flor de Aragua (SEFLOARCA) porque es uno de los materiales más susceptibles. Se colocaron cuatro semillas por bolsa de polietileno de 2 Kg de capacidad con un sustrato esteril, conformado por tierra + arena en una proporción de 3:1, se colocaron en el umbráculo de la clínica de enfermedades de plantas de la Sección de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la UCV.

Inoculación

A los siete días de emergidas las plántulas se asperjaron con la suspensión de conidios de cada uno de los aislados de *F. verticillioides*, luego se colocaron en cámara húmeda por tres días. También se dejaron plantas testigos, las cuales fueron sometidas a las mismas condiciones que las plantas inoculadas pero tratadas con agua destilada esterilizada. Por

cada aislamiento evaluado se inocularon las cuatro plantas. Se realizaron observaciones diariamente hasta que aparecieron los síntomas característicos de la enfermedad producida por el patógeno. A los 14 días después de la inoculación se realizaron los reaislamientos respectivos, de plantas con y sin síntomas, con el propósito de verificar la patogenicidad de cada uno de los aislados (Castillo, 2009).

Identificación Taxonómica de *F. verticillioides*

Se realizó la siembra en PDA de cada uno de los aislados. En cada cápsula Petri se colocó el medio del cultivo (PDA) adecuado para el crecimiento y desarrollo de *F. verticillioides*, luego se colocó en el centro de cada cápsula un disco de aproximadamente 5 mm de diámetro, conteniendo el micelio del patógeno, procedente de aislados de una colonia tres días de desarrollo. Luego se sellaron las cápsulas con parafilm y se incubaron durante siete días a temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con alternancia de luz fluorescente oscuridad cada 12 horas. Posteriormente se realizaron preparados microscópicos permanentes en un porta objetos en el cual se colocó una gota de azul de anilina; con una aguja de disección se extrajo de la colonia material que contenía micelio del patógeno y se sumergió en la gota de azul de anilina, se cubrió con un cubre objetos y se selló por los bordes con esmalte de uña transparente para sellar la muestra y evitar la evaporación del colorante. Luego se realizaron observaciones bajo un microscopio Olympus modelo CH30 de luz para efectuar las observaciones y se hizo registros fotográficos, que permitieron realizar la caracterización e identificación de la especie de *F. verticillioides*.

También se realizaron microcultivos, para lo cual se colocaron tres discos de papel de filtro humedecidos, un tubo capilar en forma angular, una lámina porta objeto y un cubre objeto en el interior de cada una de las capsulas de Petri y se colocaron en la autoclave para su esterilización. Luego en el centro de la lámina porta objeto se colocó un bloque de PDA también esterilizado de $1,0\text{ cm}^2$ aproximadamente y en el centro del bloque se colocó una pequeña porción de aislado de *F. verticillioides*, se cubrió con un cubre objetos, se selló la cápsula con cinta de parafilm y se dejó en incubación durante 3 días. Al término de éste tiempo, se removió el cubre objeto muy cuidadosamente, se colocó sobre un porta objetos

conteniendo una gota de azul de anilina y se observó al microscopio de luz para la caracterización del hongo (Rodríguez, 1996).

Para confirmar la identidad de los diferentes aislados de *F. verticillioides* se tomó en consideración las características macro y microscópicas, que permitieron realizar las caracterizaciones. Para el análisis macroscópico se consideraron el color, relieve y crecimiento de la colonia, así como si el micelio era ralo, denso o tupido. Para la caracterización microscópica se consideraron la forma y el tamaño de los macroconidios y microconidios, los conidióforos, las fiálides y la presencia o no de clamidosporas. En base a las características macro y microscópicas se desecharon las otras especies de *Fusarium*. Luego se realizaron comparaciones con las claves para especies de *Fusarium* de Booth (1977); Nelson *et al.* (1983), La clave de Burgess y Trimboli (1986); Nirenberg y O'Donnell (1998) y la de Leslie y Summerell (2006).

Análisis estadístico de los resultados

A los datos para el análisis de los resultados de la incidencia se le verificaron los supuestos del análisis de varianza comprobándose que se cumplió con cada uno de los supuestos, por lo que se le hizo el análisis de la varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo, procedencia y aislamiento de *F. verticillioides* del material evaluado

Del material muestreado se obtuvieron plantas con síntomas de la enfermedad, como es el enrollamiento de la primera hoja y manchas traslúcidas de aspecto acuoso descritos por Vegier *et al.*, 1997 y Cardwell *et al.*, 2000, y plantas sanas que no presentaron síntomas de la enfermedad como revelan Headrick y Pataky, 1989 y Singh y Singh, 1977, así como de granos que tampoco presentaron los síntomas de la enfermedad causados por *F. verticillioides* (figura 2). Del muestreo realizado de plantas y granos con y sin síntomas de la enfermedad causada por *F. verticillioides*, se obtuvieron 101 aislados de este hongo.



Figura 2. A y B. Plantas y mazorcas sin síntomas. C y D. Plantas y mazorcas con síntomas, muestreadas para aislamientos de *F. verticillioides*.

En el cuadro 3 se presentan los granos procedentes de los estados Aragua y Guárico. De las localidades de Palo Negro, Maracay, Puerta Negra, Valle de Tucutunemo, San

Francisco de Asís (Aragua), San José de Tizado y Zaraza (Guárico) se obtuvieron 8 aislados de cada una respectivamente; de las localidades de Punta Larga (Aragua), El Sombreo y Laguna de Piedra (Guárico), se obtuvieron 7 aislados de cada una, y de las localidades de La Cuarta, Barbacoa (Aragua), Calabozo y Rio Verde (Guárico), se obtuvieron 6 aislados, siendo estos el menor número.

Cuadro 3. Procedencia y número de aislados de *F. verticillioides* del muestreo realizado en las diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.

ESTADO	LOCALIDAD	N° DE AISLADOS	COORDENADAS*
Aragua	Palo Negro	8	10.1311, -67.4862
Aragua	Villa de Cura	6	9.8965, -67.0962
Aragua	Barbacoa	6	9.4707, -66.9314
Aragua	Maracay-INIA-CENIAP	8	10.2554, -67.5906
Aragua	Puerta Negra	8	10.0770, -67.4423
Aragua	Punta Larga	7	9.9093, -67.0358
Aragua	Valle de Tucutunemo	8	9.9363, -67.69424
Aragua	San Francisco de Asís	8	9.5850, -67.2116
Guárico	El Sombrero	7	9.4328, -67.1347
Guárico	San José de Tizado	8	9.2214, -67.4807
Guárico	Zaraza	8	9.3190, -65.2890
Guárico	Calabozo	6	8.8776, -67.3644
Guárico	Rio Verde	6	8.9664, -67.6126
Guárico	Laguna de Piedra	7	9.5140, -67.6016

*Aproximación Google Maps.

Incidencia de *Fusarium verticillioides* en los granos de maíz

En el análisis de varianza (Cuadro 4), se detectó diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) de incidencia de *F. verticillioides* entre los tratamientos o localidades de los estados Aragua y Guárico, considerados en este estudio.

Cuadro 4. Análisis de la Varianza de los promedios de la incidencia de *F. verticillioides* en maíz provenientes de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente.

F.V.	SC	GL	CM	F	Valor p
Modelo	226,23	13	17,40	15,43	<0,0001
Trat	226,23	13	17,40	15,43	<0,0001
Error	47,38	42	1,13		
Total	273,61	55			

CV = 1,17

De las muestras de granos analizados, se obtuvieron los porcentajes de incidencia de *F. verticillioides*, que se muestran en el cuadro 5 y la figura 3, notándose que la mayor incidencia de granos infectados por este hongo se encontró en las muestras de la localidad del Valle de Tucutunemo (Aragua) y Zaraza (Guárico), seguido por el de la localidad de Palo Negro (Aragua), Villa de Cura (Aragua), Punta Larga (Aragua), Laguna de Piedra (Guárico), Puerta Negra (Aragua). Los granos provenientes de las localidades Rio Verde (Guárico), San Francisco de Asís (Aragua) tuvieron los menores porcentajes de incidencia del hongo, seguidos por las localidades de El Sombrero (Guárico), San José de Tizado (Guárico), Calabozo (Guárico), Barbacoa (Aragua) y Maracay (Aragua).

En las figuras 4A y 4B, se puede observar alta incidencia de granos de maíz colonizados por el patógeno *F. verticillioides*, con el color de las colonias que lo caracterizan, coincidiendo con otros trabajos (Leslie y Summerell, 2006).

Cuadro 5. Porcentajes de incidencia de *F. verticillioides* en granos de maíz provenientes de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente.

Trat.	Localidades	Porcentajes	Grupos
13	Rio Verde	88,19	a*
8	San Francisco de Asís	88,42	a b
10	El Sombrero	89,23	a b c
4	San José de Tiznado	89,38	a b c d
12	Calabozo	89,99	a b c d
3	Barbacoa	90,05	a b c d
1	Maracay	90,08	a b c d
5	Puerta Negra	91,04	b c d e
14	Laguna de Piedra	91,13	b c d e
6	Punta larga	91,65	c d e f
9	Villa de Cura	92,04	d e f
2	Palo Negro	93,05	e f g
11	Zaraza	94,12	f g
7	Valle de Tucutunemo	95,25	g

(*) Valores con la misma letra indican que la incidencia de *F. verticillioides* en los granos de maíz de diferentes localidades son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). CV = 2,45.

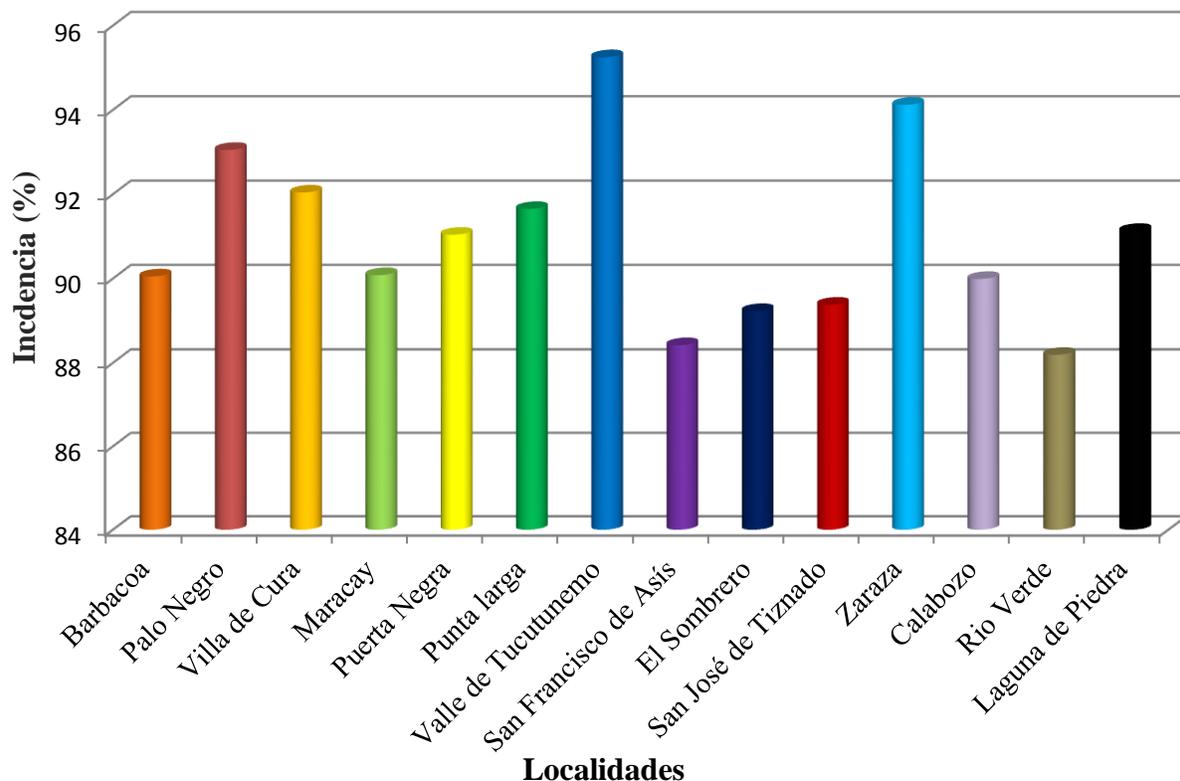


Figura 3. Incidencia de *F. verticillioides* en maíz de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente.

En esta investigación todos los resultados de incidencia fueron altos lo cual coincide con los que menciona Homsí (2002), quien encontró que *F. verticillioides* estuvo presente con mayor frecuencia contaminando los granos de maíz de tres zonas (Aragua, Carabobo y Yaracuy) evaluadas donde la incidencia fue alta en todos los híbridos. De la misma manera, Mazzani *et al.* (2007), trabajaron con granos almacenados en los estados: Anzoátegui, Carabobo y Monagas, encontrando alta incidencia del patógeno en todos los materiales evaluados; así mismo Medina *et al.*, 2007, quienes también encontraron una alta incidencia hasta de un 86,5% de las semillas de dos híbridos comerciales de maíz (H-4002 y H-3005) procedentes de Chirgua, estado Carabobo; este patógeno se encontró hasta en un 100 % en el endospermo y en el embrión de estos híbridos hasta en 90 %. El menor porcentaje encontrado fue en el pericarpo con 15%.



Figura 4. Granos de maíz colonizados por *F. verticillioides*. A. Vista de la cara superior de las colonias. B. vista del reverso de las colonias.

Sin embargo en otras investigaciones de campo realizadas en granos de maíz para consumo humano y animal, producidos en fincas de Aragua, Carabobo, Cojedes, Guárico, Portuguesa y Yaracuy se evidenció una incidencia de *F. verticillioides*, en todos los granos desde baja (< 15%) hasta alta (> 30%) (Chavarri *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2007; y Mazzani *et al.*, 2008).

De la misma manera, Díaz *et al.*, (2007), encontraron que la incidencia de *F. verticillioides* en maíz producido en la zona central de Venezuela osciló entre 25,25% y 72%. Aunque Mazzani *et al.* (2007) encontraron una baja incidencia que osciló entre 0 y 23% de *F. verticillioides* en granos almacenados en los estados Anzoátegui, Carabobo y Monagas.

Por otra parte en el Sombrero, estado Guárico, se evaluaron 12 híbridos dobles experimentales y 8 híbridos comerciales de maíz blanco y amarillo, en los cuales se encontró que todas las muestras de todos los híbridos fueron colonizadas por *F. verticillioides* (Mazzani *et al.*, 1997); también de semillas de maíz provenientes de las localidades de San Javier (Edo. Yaracuy), El Sombrero (Edo. Guárico) y Jusepín (Edo. Monagas), evidenciaron la ocurrencia de este patógeno, situación que afirma su presencia en muchos campos donde se siembra este cultivo en Venezuela y lo cual corrobora que este

hongo es un problema importante en híbridos de maíz (Mazzani y Borges, 1993; Mazzani *et al.*, 1997).

Evaluación de la patogenicidad de *Fusarium verticillioides* en maíz

En cada uno de los 101 aislados evaluados en plantas de maíz de 21 días de edad, con respecto a la patogenicidad, al menos el 25% de las plantas evaluadas por aislamiento, presentaron síntomas de la enfermedad causada por *F. verticillioides*, como es el enrollamiento de las hojas apicales o una mancha traslúcida de aspecto aceitoso, como se muestra en la figura 5.

Al realizar aislamientos de estas plantas con los síntomas señalados, se obtuvo colonias de micelio abundante que en su color variaron desde el blanco hasta el violeta, típicas de *F. verticillioides*, de la misma manera cuando se les hizo preparados microscópicos se pudieron observar los macroconidios alargados, curvados, con la parte apical cónica, con la base en forma de pie, algunas presentaron variaciones en el número de septos desde 3 hasta 5, microconidios en forma oval y sin septos, y microcultivos, estas estructuras y características coinciden con las descritas por Leslie y Summerell, (2006).

Por otro lado, cuando a las plantas evaluadas que no presentaron síntomas de la enfermedad causada por este patógeno se les realizó aislamientos, también se obtuvieron colonias con las mismas características señaladas anteriormente, lo cual confirma que ocurre infección asintomática y además corrobora la patogenicidad de los 101 aislados de *F. verticillioides* en las plantas de maíz.

Identificación Morgológica de *F. verticillioides*.

En la figura 6A, se muestran las características de los aislados en PDA de *F. verticillioides*, donde se puede notar en la cara superior de las colonias un color anaranjado pálido (salmón) como lo describe Leslie y Summerell (2006). A los nueve días ocuparon la totalidad de la superficie de las capsulas Petri.



Figura 5. Síntomas de la enfermedad causada por *F. verticillioides* en plantas inoculadas a los 21 días. A. Enrollamiento de la hoja. B. Mancha traslúcida de aspecto aceitoso.

En la figura 6B, se puede observar en el reverso de las colonias, que a partir del 5to día, se visualizó desde el centro hasta 2cm un color púrpura claro que se mantuvo hasta el 7mo día. A partir de allí presentaron un color rosado anaranjado pálido, parecido a lo encontrado por Leslie y Summerell (2006).

El centro de las colonias fue de crecimiento algodonoso continuando con crecimiento ralo hacia la periferia.

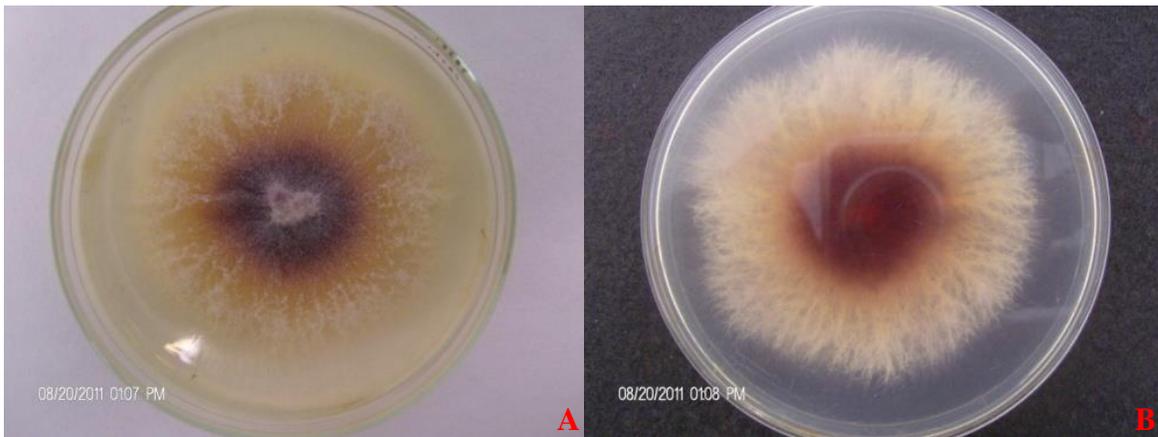


Figura 6. Colonia de *F. verticillioides* de siete días de creciendo en PDA. A. vista de la cara superior de la colonia. B. vista por el reverso.

En la figura 7, se observan las características de los macro y microconidios. Los macroconidios del hongo son de forma levemente falcada, multiseptados de 3 a 5 septos, con una célula apical más o menos puntiaguda y célula basal en forma de pie. Con dimensiones de 15-49 μm de largo x 2,6-5,2 μm de ancho, con una media de 30,9 x 3,9 μm . Microconidios abundantes, comúnmente unicelulares de forma oval o elipsoidal, con la base redondeada, en largas cadenas de hasta 30 microconidios sobre monofiálides, dimensiones de 5-8 μm de largo x 1,4-2,5 μm de ancho, con una media de 6,5 x 1,95 μm . Clamidosporas ausentes (Figuras 7A, 7B, 7C y 7D). Estas características concuerdan con la descripción para especies de *Fusarium* de Booth (1977); Nelson *et al.* (1983); Burgess y Trimboli (1986); Nirenberg y O'Donnell (1998) y la de Leslie y Summerell (2006); White (2000), para la especie de *F. verticillioides*.

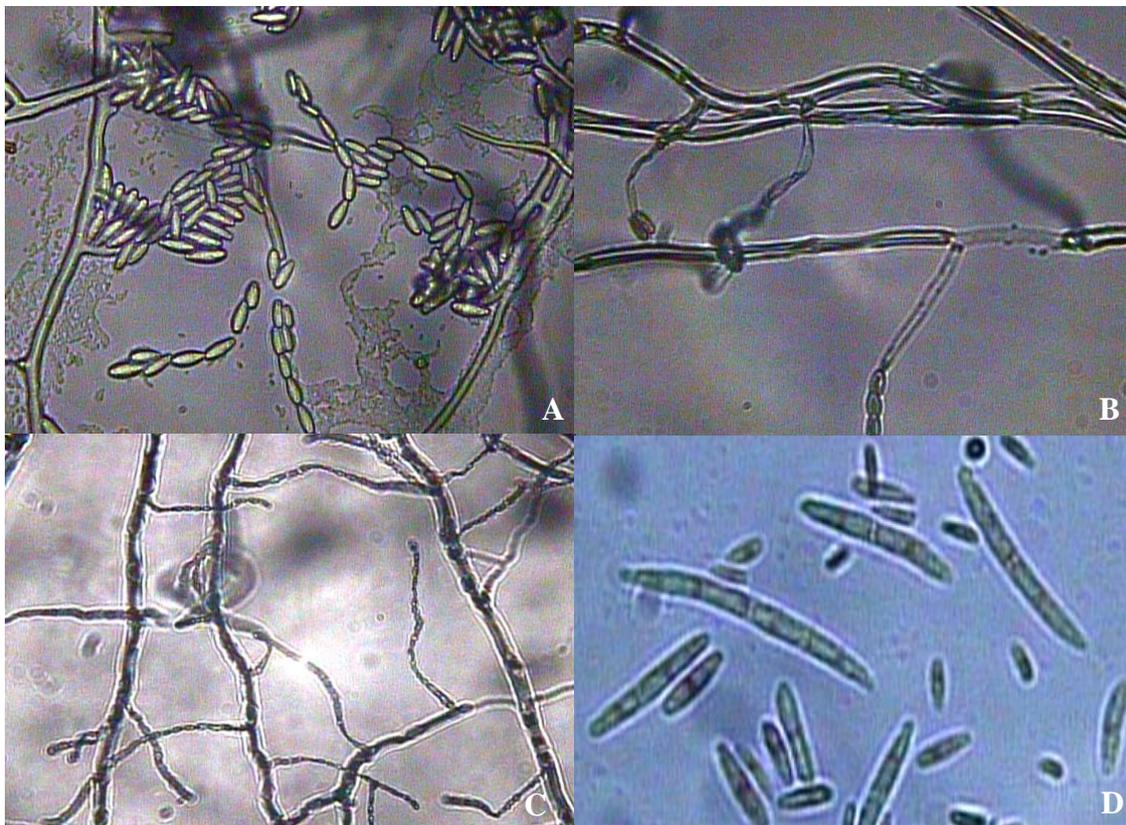


Figura 7. A. Microconidios de *F. verticillioides*. B. Microconidios en monofiálides. C. Microconidios en cadena. D. Macroconios.

Las características que permitieron la identificación de los aislados de *F. verticillioides* obtenidos fueron: En medio PDA, la colonia inicialmente tiene el micelio blanco, pero posteriormente pueden desarrollar pigmentos color violeta. En este medio de cultivo la pigmentación de la colonia varió desde no tener pigmentos, lo cual le dió una tonalidad grisácea o naranja al violeta gris, violeta oscuro o magenta oscuro (casi negro) en otros. Generalmente la morfología de los macroconidios fue relativamente alargada y delgada, ligeramente encorvado o recto y de paredes delgadas. Esto es típico de macroconidios producidos por especies del complejo *Gibberella fujikuroi*, de forma levemente falcada, multiseptados de 3 a 5 septos, con una célula apical más o menos puntiaguda y célula basal en forma de pie. Los microconidios, de forma ovalada con una base plana y no presentaron septos. El micelio aéreo presentó comúnmente largas cadenas, sin embargo se presentaron de vez en cuando pequeñas cadenas. Las células conidiógenas se observaron en monofiálides, a veces se presentaron en pares que dan una apariencia de “orejas de conejo”. Micelio aéreo era abundante. No produjeron clamidosporas. Todas estas características coincidieron con las claves para especies de *Fusarium* de Booth (1977); Nelson *et al.* (1983), Burgess y Trimboli (1986); Nirenberg y O'Donnell (1998) y la de Leslie y Summerell (2006), que permitieron identificarlos como *F. verticillioides*.

Sin embargo se han encontrado otras especies de *Fusarium* asociados con los granos de maíz como, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum*, *F. solani* (White, 2000). *F. verticillioides* es morfológicamente idéntico a las cepas de *F. thapsinum* que no producen pigmentos amarillos; también es idéntico a *F. proliferatum*, solo que esta especie forma cadenas de microconidios a partir de polifiálides. Las cadenas de microconidios producidas por *F. proliferatum* usualmente son más cortas que las de *F. verticillioides* y *F. thapsinum*. Estos dos últimos se pueden diferenciar confiablemente solo mediante el uso de la prueba de apareamiento o marcadores moleculares, aunque muchos aislados de *F. thapsinum* producen pigmentos amarillos que son únicos de esta especie. *F. verticillioides* también es muy similar a *F. andiyazi*, solo que esta especie forma pseudoclamidospora, por lo que hay que tener cuidado ya que *F. verticillioides* produce ensanchamiento en las hifas las cuales es difícil de diferenciar de las pseudoclamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

F. verticillioides es similar en algunos aspectos a *F. nygamai* con la forma de los microconidios en cadenas cortas o falsas cabezas de monofiálides (Burgess y Trimboli, 1986). *F. nygamai*, sin embargo forma abundantes macroconidios en esporodoquia y clamidosporas en las hifas aéreas en medios nutritivos donde el hongo ya ha pasado los 7 días. Las cepas que son morfológicamente similares y estrechamente relacionadas filogenéticamente con *F. verticillioides* se han aislado de plátanos, pero estas cepas no sintetizan fumonisinas (Mirete *et al.*, 2004; Moretti *et al.*, 2004). Ya sea que estas cepas representan una subpoblación aislada de *F. verticillioides* o en su lugar, es una nueva especie que queda por determinar (Hirata *et al.*, 2001).

Los conidios son producidos en las fiálides a través de un proceso enteroblástico en el que la pared interior del conidio y la phialide son continuas y al que se añaden posteriormente las capas media y exterior (Tiedt y Jooste, 1992). Este proceso reduce la cantidad de material disponible para bloquear la apertura phialidica y puede ser una de las razones por las que las cadenas de *F. verticillioides* son tan largas (Tiedt y Jooste, 1998).

CONCLUSIONES

El hongo *Fusarium verticillioides* fue detectado en un alto porcentaje de incidencia en los granos procedentes de todas las diferentes las localidades de los estados Aragua y Guárico.

Las muestras procedentes del Valle de Tucutunemo (Aragua) y Zaraza (Guárico) fueron las que tuvieron los mayores valores de porcentaje de incidencia de *Fusarium verticillioides* en granos, seguidos de los de la localidad de Palo Negro (Aragua).

Las muestras de los granos procedentes de las localidades de Rio Verde (Guárico) y San Francisco de Asís (Aragua) tuvieron los menores porcentajes de incidencia.

La alta incidencia de *Fusarium verticillioides* en todas las localidades, indica que es un patógeno muy importante en los campos comerciales de maíz en los estados Aragua y Guárico.

La especie de *Fusarium* que afectó generalmente al cultivo de maíz de todas las muestras analizadas fue *F. verticillioides*.

RECOMENDACIONES

- Efectuar caracterizaciones morfológicas de *F. verticillioides* por otros métodos, tales como los biológicos utilizando medios nutritivos en hojas de clavel, rosa de bengala, malta sal agar (MSA), papel de filtro con y sin congelamiento entre otros y las pruebas Serológicas o de Inmunofluorescencia (ELISA),

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Armolik, N. and J. Dickson. 1996. Minimum humidity requirements for germination of conidia of fungi associated with storage of grain. *Phytopathology* 46:462-465.
- Booth, C. 1977. The Genus *Fusarium* Kew Surrey. England Commonwealth Mycological Institute 237 p.
- Bullerman, L. B. and W. J. Tsai. 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. *J. Food Prot.* 57:541-546.
- Burgess, L. W. and D. Trimboli. 1986. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. Nov. *Mycologia*. 78:223-229.
- Cardwell, K. F., J. G. Kling, B. Maziya-Dixon and N. A. Bosque-Perez. 2000. Interaction between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in lowland Africa. *Phytopathology* 90:276-284.
- Castillo, Y. 2009. Métodos de aplicación de *Trichoderma sp* para el control de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. en maíz (*Zea mays* L.). Tesis Mag.Sc. Postgrado en Agronomía. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 62 p.
- Chavarri, M., O. Luzón, C. Mazzani, C. González, J. Alezones y M. Garrido. 2009. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 22:2-7.
- Da Silva, L. 2006. Detección, identificación, ubicación y transmisión de especies de *Fusarium* en semillas de maíz (*Zea mays*). Trabajo de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 96 p.
- Díaz, J., F. Miranda, M. Cerovich y F. Figueroa. 2007. Incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas certificadas de maíz producidas en la región central de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:74 (Resumen).
- French, R. y T. Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 79 p.

- Goyo, Y., A. Carmona, J. Rodríguez, J. Alezones y A. González. 2005. Incidencia de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme* en granos de maíz, de diferentes localidades de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 18:95 (Resumen).
- Headrick, J. M. and J. K. Pataky. 1989. Resistance to kernel infection by *Fusarium moniliforme* in inbred lines of sweet corn and effect of infection on emergence. *Plant Dis.* 73:887-892.
- Hirata, T., Kimishina, E., Aoki, T., Nirenberg, I. H. and O'Donnell, K. 2001. Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. *Mycoscience.* 42:155-166.
- Hoenish, R. W. and R. M. Davis. 1994. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. *Plant Dis.* 78:517-519.
- Homsi, W. 2002. Producción de fumonisinas *in vitro* por cepas nativas de *Fusarium moniliforme* aislados de maíz procedentes de tres estados de Venezuela. Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela. 62 p.
- Lamboni, Y and K. Hell. 2009. Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stored by post-harvest insects. *International Journal of Tropical Insect Science.* 29:31-39.
- Leslie, J. F. and B. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. State Avenue, Amer, Iowa, USA. 388 p.
- Marasas, W. F. O., P. Nelson and T. Toussoun. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. Penn State University Press, State College, PA.
- Marasas, W. F. O., J. D Miller, R. T. Riley and A. Visconti. 2000. Fumonisin B1. *Environ. Health Crit.* 219:1-149.
- Mazzani, C. y O. Borges. 1993. Ocurrencia de *Fusarium moniliforme* en granos de maíz de siembras experimentales en Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana.* 6:47-48.
- Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 1997. *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en granos de cultivares de maíz blanco en fincas del estado Yaracuy (Venezuela). Memorias II Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Maracay, Venezuela. pp. 96-97.

- Mazzani, C. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en los granos de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 121 pp.
- Mazzani, C., O. Borges, O. Luzón, V. Barrientos y P. Quijada. 2001. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in kernels of maize hybrids in Venezuela. *Brazilian J. Microb.* 32:345-349.
- Mazzani, C., O. Luzón, M. Chavarri, J. Núñez y I. Rodríguez. 2007. *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en granos de maíz (*Zea mays*, L.), almacenados en los estados Anzoátegui, Carabobo y Monagas durante los años 2005-2006. *Rev. Fitopatología Venezolana* 23:63 (Resumen).
- Mazzani, C., O. Luzón, M. Chavarri, M. Fernández y N. Hernández. 2008. *Fusarium verticillioides* en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 21:18-22.
- Medina, C., L. Subero y N. Sanabria. 2007. Incidencia de *Fusarium moniliforme* (Sheldon) en semillas de dos híbridos de maíz (*Zea mays*, L.) y ubicación del hongo en la semilla. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:73 (Resumen).
- Mirete, S., Vazquez, C., Mulé, G., Jurado, M. and González-Jean, M. T. 2004. Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruit by IGS and EF-1 α sequence analyses. *European Journal of Plant Pathology*. 110:515-523.
- Moretti, A. G., Mulé, G. Susca, A., González-Jean, M. T. and Logrieco, A. 2004. Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology*. 110:601-609.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, 193 p.
- Nirenber, H. and K. O'Donnell. 1998. New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90:434-458.
- Payne, G. A. 1998. Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize. *Plant Dis.* 72:422-424.

- Rodríguez, I. 1996. Caracterización morfofisiológica y dinámica poblacional de *Trichoderma spp* y su implicación en el control biológico de la pudrición del tallo de tabaco (*Sclerotium rolfsii* Sacc). Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 179 p.
- Shephard, G. S., P. Thiel; M. Stockenstro and E. Sydenham. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *JAOAC Int.* 79:671-687.
- Singh, D. and T. Singh. 1977. Location of *Fusarium moniliforme* in kernels of maize and disease transmission. *Indian J. Micol Plant Pathol.* 7:32-38.
- Tiedt, L. R. and Jooste, W. J. 1992. Ultrastructural aspects of conidiogenesis of *Fusarium spp.* in the section *Liseola*. *Mycological Research.* 96:187-193.
- Tiedt, L. R. and Jooste, W. J. 1998. Ultrastructure of colarette formation in *Fusarium* section *Liseola* and some taxonomic implications. *Transactions of the British Mycological Society.* 90:531-536.
- Vegier, R., L. Reid, K. Seifert, D. Steward and R. Hamilton. 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Plant Pathol.* 19:60-65.
- White, D. G. 2000. Compendium of corn diseases. Third edition. 78 p.

CAPÍTULO III.

Caracterización Molecular de los aislados de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenber, procedentes de algunas localidades de los estados Aragua y Guárico.

INTRODUCCIÓN

La utilización de la caracterización para la identificación y clasificación macroscópica y microscópica de los hongos es muy laboriosa y difícil, debido a su alta plasticidad fenotípica. Esta situación obliga a una incesante y continua revisión taxonómica de las especies (Knutsen *et al.*, 2004). Sin embargo, las técnicas moleculares que se basan en el análisis de secuencias de ADN son mucho más rápidas y confiables para la detección e identificación de especies. Otra ventaja de la amplificación de secuencias específicas mediante la PCR, es que resulta potencialmente más eficaz que cualquier otra técnica microbiológica, lo cual no amerita de la presencia de organismos viables, aún cuando los volúmenes de la muestra sean pequeños para que el análisis que exige la prueba, se realice con éxito (Abd- Elsalam *et al.*, 2003).

Los métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son rápidos, ya que no hay necesidad de cultivar organismos antes de su identificación. Ellos son específicos, ya que la identificación de las especies se hace sobre la base de las diferencias genotípicas, y son muy sensibles, la detección de los sitios de restricción de las moléculas de ADN en mezclas complejas, incluso cuando los micelios ya no son viables. Varias pruebas de PCR se han desarrollado para la identificación de especies de *Fusarium* micotoxigénicos, algunos de ellos basados en genes de copia única directamente implicados en la biosíntesis de las micotoxinas (Bluhm *et al.*, 2002; González-Jaén *et al.*, 2004; Kulik *et al.*, 2004; Mulé *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 1998; Nicholson *et al.*, 2004; Niessen y Vogel *et al.*, 1998). También pruebas de especies específicas de PCR han sido desarrollado en laboratorios para detectar las principales especies productoras de tricotecenos de *Fusarium* asociadas con los cereales, por ejemplo, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*,

F. sporotrichioides y *F. equiseti* (Jurado *et al.*, 2006) y productores de fumonisinas como *F. verticillioides* (Patiño *et al.*, 2004).

Según Nicholson *et al.*, 2003, los métodos basados en PCR de ADNc, han demostrado ser una buena herramienta para estudios en las toxinas producidas por especies de *Fusarium*; en particular el método por especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos basado en el gen Tri5, que codifica la primera enzima (sintasa trichodine) en la vía de biosíntesis de tricotecenos (Doohan *et al.*, 1999).

También Sánchez-Rangel *et al.*, 2005, desarrollaron un protocolo de PCR para detectar posibles cepas de *F. verticillioides* productoras de fumonisinas aisladas de maíz en México. El método se basó en detectar un renglón del gen FUM1 involucrado en la biosíntesis de fumonisinas. Este método puede emplearse para detectar hongos micotoxigénicos en cultivo puro y en maíz contaminado. Ellos desarrollaron una PCR altamente específica utilizando primers con dominio en la a'-cetoacyl reductasa de la enzima sintetasa polipéptido (gen FUM1) que es capaz de distinguir las cepas productoras de fumonisinas de cepas y especies no productoras.

Oliveira-Rocha *et al.*, 2011, aplicaron métodos moleculares (AFLP, la secuenciación parcial del gen TEF-1 α y PCR basada en los alelos MAT para la identificación de especies de *Fusarium* aisladas de maíz de Brasil y para verificar el tiempo real de la técnica RT-PCR basada en los genes FUM1 y FUM9 apropiadas para estimar las fumonisinas B1 y B2 de los niveles de producción. Ellos encontraron que los métodos moleculares utilizados en su estudio eran útiles para la rápida identificación de especies de *Fusarium*. La alta correlación y significativa expresión entre los genes FUM1 y FUM9 y la producción de fumonisinas sugiere que el tiempo real de RT-PCR es adecuado para estudios teniendo en cuenta la influencia de factores bióticos y abióticos sobre la expresión de estos genes de biosíntesis de fumonisinas en las cepas de *Fusarium* aisladas de los productos básicos agrícolas de Brasil.

Bertechini *et al.*, 2012 desarrollaron protocolos basados en la PCR para la identificación de *F. verticillioides*, *F. subglutinans* y otras especies del complejo *G. fujikuroi*, destinados al gen gaoB que codifica para la galactosa oxidasa. Estos primers FV-F2/FV-R y FS-F1/FS-R los cuales describen en su trabajo, reconocen cepas de *F. verticillioides* y *F. subglutinans* que se obtuvieron a partir de semillas de maíz de varias

regiones de Brasil, pero no reconocen otras especies de *Fusarium* u otros géneros de hongos que se obtienen bien a partir de colecciones de hongos o aislados de semillas de maíz. Ellos obtuvieron un protocolo múltiple para detectar simultáneamente el ADN genómico de *F. verticillioides* y *F. subglutinans*. Este protocolo puede detectar el ADN de estos hongos que crecen en las semillas de maíz infectados artificial y naturalmente. Otra reacción múltiple que desarrollaron, se combina con un par de primers pre-existentes que han permitido la identificación *F. subglutinans*, *F. konsum* y *F. thapsinum*. Además, la identificación de *F. nygamai* también fue posible usando una combinación de dos reacciones de PCR el cual describen en su trabajo y el de Mulé *et al.*, 2004. Los resultados que obtuvieron estos investigadores tienen un gran valor potencial para la identificación molecular de estos hongos fitopatógenos difíciles de identificar morfológicamente. También el método de PCR en tiempo real y el método de agar en placas, es utilizado para predecir a *F. verticillioides* y la presencia de fumonisina B1 en maíz de Nigeria (Timothy *et al.*, 2009).

López-Errasquín, *et al.*, 2007, desarrollaron una prueba específica en tiempo real PCR con transcripción inversa (RT-PCR) para cuantificar el nivel de expresión de dos genes de la agrupación biosintética de fumonisina en *F. verticillioides*: FUM1 (que codifica una enzima de sintasa de policétido) y el gen que codifica el transportador ABC FUM19. El análisis proporciona un buen enfoque para la detección rápida y específica y la caracterización de la capacidad potencial de las cepas de *F. verticillioides* para producir las fumonisinas.

Fanelli *et al.*, 2011, estudiaron la influencia de la luz sobre el crecimiento, la formación de conidios y la producción de fumonisinas por *F. verticillioides*, encontrando que este patógeno responde a la luz en diferentes longitudes de onda para la formación de conidios y síntesis de fumonisinas. Ellos utilizaron el método de tiempo real de RT-PCR para medir el nivel de expresión de los genes *fum1*, *Fum21* y *FvVE1*, que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de las fumonisinas; encontrando una correlación significativa entre la expresión génica y la producción de fumonisinas.

Jurado *et al.*, 2005, desarrollaron un protocolo integrado, para el diagnóstico de la contaminación de especies de *Fusarium* micotoxigénicos en maíz, que también puede ser utilizado para otros cereales. El protocolo consistió en una extracción fácil y rápida del

ADN de muestras de maíz (granos y germen), y de iniciadores para PCR para pruebas posteriores del género *Fusarium*, complejo *G. fujikuroi*, y las especies productoras de tricotecenos de *Fusarium* que orientan la búsqueda de las especies toxigénicas: También desarrollaron un protocolo de PCR para la identificación de *F. proliferatum*. Los primers fueron diseñados sobre la base de la secuencia IGS (espacios intergénicos de ADN_r), una región de múltiples copias en el genoma que permiten mejorar la sensibilidad del ensayo en comparación con los ensayos de PCR basados en secuencias de una sola copia. La idoneidad del protocolo y la eficacia relativa de los ensayos de PCR de una o varias secuencias de copias de PCR han sido probadas en una amplia gama de muestras de maíz contaminado con fumonisinas.

O'Donnell *et al.*, 1998, mediante el análisis de la especificidad con la especie *G. fujikuroi*, utilizando el par de primers FV-F1/FV-R en el gen *gaoB* de *F. verticillioides* amplificó un fragmento de ADN del tamaño esperado a partir del ADN genómico de *F. verticillioides*, y también desde *F. thapsinum* y *F. nygamai*, dos especies filogenéticamente relacionadas con *F. verticillioides*. El par de primers FV-F2/FV-R amplificó un fragmento de ADN, sólo desde el ADN genómico de *F. verticillioides*.

Fouquaert *et al.*, 2011, demostraron por medio de análisis de PCR que *F. verticillioides* posee una proteína (FvGLLc1) idénticamente similar a una recientemente identificada en el citoplasma nuclear en maíz (ZmGLLc). La secuencia de estos genes son cercanamente idénticos en la región de codificación y la región de transcripción 5' y 3'.

Lanubile *et al.*, 2010, encontraron a través de análisis de PCR que los genes (PR1, PR5, PRM6) relacionados con la defensa de las plantas de maíz fueron transcritos en altos niveles antes de la infección y proporcionan una defensa básica contra *F. verticillioides*.

Por otra parte López-Errasquín *et al.*, 2006, desarrollaron un protocolo de RT-PCR en tiempo real para analizar el patrón de expresión del gen FIR1 relacionado con el transporte de hierro y la regulación de las condiciones que inducen la síntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*.

Rodríguez Estrada *et al.*, 2011, utilizaron el método de PCR en tiempo real para medir los cambios relativos en la biomasa de *F. verticillioides*, en interacciones *in vitro* entre este patógeno y *Ustilago maydis*, que muestran que *F. verticillioides* es un fuerte antagonista de *Ustilago maydis* reduciendo la presencia de éste. Estos métodos son

suficientemente sensibles para detectar cambios pequeños en la biomasa y la concentración de metabolitos asociados con diferentes genotipos de las especies que interactúan.

El gen *gaoA* (McPherson *et al.*, 1992), para la galactosa oxidasa se ha utilizado como sitio de restricción para primers en reacciones de PCR para la detección específica de *Fusarium graminearum* (teleomorfo: *Gibberella zeae*) (Biazio *et al.*, 1997; Niessen y Vogel, 1997). La galactosa oxidasa es una enzima de cobre que cataliza la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos con la reducción concomitante de O₂ a H₂O₂ (Whittaker, 2005). Tres linajes de este gen han sido identificados en *Fusarium* y el linaje *gaoB* ha sido clonado en el laboratorio de estos investigadores a partir de *F. verticillioides* y *F. subglutinans*. El linaje que tiene el gen *gaoB* carece de intrones y tiene una longitud de 2040 pb (Cordeiro *et al.*, 2010).

La identificación de los hongos se basa principalmente en las características morfológicas que los distingue de otros como también se utilizan técnicas fisiológicas y bioquímicas. Pero la identificación de los hongos filamentosos por medio de estos métodos son variables y laboriosos. Sin embargo, importantes avances técnicos y científicos han permitido el uso de técnicas moleculares que se pueden aplicar, como el caso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que permite el análisis molecular de las células de los hongos, esporas, fósiles, oligonucleótidos específicos, entre otros, que ha permitido facilitar las secuenciaciones de sus ADN (Olive y Bean, 1999; Wassenaar y Newell, 2000; Leslie y summerell, 2006). A este respecto, los métodos basados en el ADN pueden contribuir al reconocimiento de estas cepas y para la identificación de especies morfológicamente indistinguibles. Las técnicas moleculares se han utilizado con éxito para la identificación de algunas especies de hongos y para la detección de genes de biosíntesis de micotoxinas (Jurado *et al.*, 2010).

Las investigaciones moleculares en hongos orientan hacia los estudios filogenéticos, taxonómicos (principalmente a nivel de género y especie) de diagnóstico, epidemiológico y de genética de poblaciones. Cada una de éstas tiene su particular sistema de técnica (Crous, 2005).

La detección y control de *F. verticillioides* es fundamental para prevenir que las fumonisinas entren en la cadena alimenticia. Por lo que es importante aplicar una prueba de PCR rápida, específica y sensible, para la detección de cepas de *Fusarium verticillioides*

mediante dos pares de iniciadores específicos para este hongo que se han diseñado sobre la base de la región espaciadora de las unidades intergénicas del ADN (Patiño *et al.*, 2004). Este mismo autor señala que el primer par de iniciadores es para especies específicas de *F. verticillioides* y el segundo es para detectar cepas de *F. verticillioides* produciendo fumonisinas. Así mismo, el segundo par permite la diferenciación entre el grupo principal de las cepas productoras de fumonisinas que están principalmente vinculadas a los cultivos y un grupo menor de cepas no productoras de fumonisinas; la especificidad de las secuencias de los iniciadores proporciona las bases de un simple, rápido, preciso y sensible método de identificación de esta especie de hongo que representa un riesgo para la salud humana y animal (Patiño *et al.*, 2004). Por lo que el uso de la técnica del PCR, se ha considerado un medio rápido y sencillo de caracterización, el cual no requiere de equipos y reactivos de alto valor, lo que la hace muy asequible en todas partes del mundo (Soll, 2000; Moore y Lyndsay, 2002; Desjardins y Proctor, 2004).

Las características morfológicas que permiten la determinación y clasificación de *F. verticillioides* por los métodos tradicionales, pero constantemente requieren de revisiones periódicas, por lo que es importante su caracterización con técnicas más precisas como las moleculares. Por las razones expuestas, los objetivos planteados fueron:

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Verificar la identificación de los distintos aislados de *F. verticillioides* de plantas y granos provenientes de las diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar aislados de *F. verticillioides* en muestras de plantas y granos provenientes de las diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
2. Relacionar la caracterización molecular con la morfológica de los aislados de *F. verticillioides* provenientes de las diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de los ensayos

La preparación de los aislados de *F. verticillioides* con la finalidad de obtener los micelios del hongo para la extracción del ADN se realizó en el Laboratorio de Micología, del Instituto de Botánica, de la Cátedra de Fitopatología, de la Facultad de Agronomía de la UCV, Maracay.

Los análisis moleculares (La extracción del ADN y las corridas del PCR de cada uno de los aislados de *F. verticillioides*) se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación DANAC, ubicada en San Javier, estado Yaracuy.

Crecimiento y desarrollo de *Fusarium verticillioides* en medio líquido

Se tomaron los aislamientos de *F. verticillioides* que previamente fueron caracterizados e identificados morfológicamente, de ocho días de crecimiento en papa dextrosa agar (PDA), incubados a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante siete días, a partir de los cuales se procedió a preparar el inóculo. Verificado el crecimiento de la colonia cubriendo el 80% de la superficie de la capsula, se le agregaron 20 ml de agua destilada esterilizada, con un bisturí esterilizado se raspó cuidadosamente la colonia, procurando separar el micelio y los conidios del hongo. Y con una cámara de Neubauer las concentración del inóculo se ajustó a 1×10^6 conidios/ml (French y Hebert, 1980). De esta se tomaron 5 ml y se colocaron en una fiola de 250 ml con 50 ml de medio líquido (papa + dextrosa) previamente esterilizado durante 20 minutos. Se le adicionó el antibiótico tetraciclina (250 mg/l). Luego se colocó en agitación en un agitador de bandeja Eberbach a 100 rpm a 27°C y alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad por un período de cinco días; esto con la finalidad de obtener los micelios del hongo para la extracción del ADN.

Extracción del ADN de *Fusarium verticillioides*

Para la extracción de ADN del patógeno se utilizó el procedimiento descrito por Wilson (1987) y Patrice *et al.* (1996). Se recogió el micelio de cada uno de los aislados de *F. verticillioides* que fueron previamente identificados, se filtraron en papel Watman N° 22 previamente esterilizado utilizando una bomba de vacío modelo 0211-V45W-GBC para así obtener el micelio del hongo el cual se liofilizó por un período de 18 horas. Luego de liofilizado se colocó, en un mortero frío y se maceró con nitrógeno líquido (-196 °C) hasta obtener un polvo muy fino.

El micelio molido se colocó en un microtubo Eppendorf de 2 ml, al que se le añadieron 750 µl de una solución tampón (250 µl Tris-HCl 100 mM pH 7.2; 250 µl EDTA (100 mM pH 8 y 250 µl dodecil sulfato sódico (SDS) al 10 % pH 7.2). Se agitó y se mantuvo todo en frío. Luego se añadieron 3 µl de una solución de proteinasa K (20 mg/ml), se agitó y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Seguidamente, se añadieron 100 µl de NaCl 5M con la finalidad de obtener la concentración salina requerida para que el Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) para evitar la degradación del ADN. Se adicionaron 80 µl de solución CTAB/NaCl (CTAB al 10 % en NaCl 0.7M), nuevamente se agitó en un homogeneizador vortex y se incubó a 65 °C durante 10 minutos.

Para realizar la purificación del ADN se añadieron 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, para eliminar los complejos que se pudieran formar por acción del CTAB. El sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo, al que se le añadió un volumen equivalente de 700 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), luego se agitó. El fenol desnaturaliza las proteínas y las precipita, separando entonces el ADN que se mantiene disuelto. Después la mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos, con la finalidad de eliminar los restos del complejo CTAB, no fue necesario repetir. Las proteínas quedaron en la interface y los ácidos nucleicos en la fase superior acuosa.

El sobrenadante (500-700 µl), que contenían los ácidos nucleicos, se transfirieron a otro microtubo al que se le añadieron 600 µl de isopropanol para que el ADN precipitara; luego se agitó suavemente y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. El isopropanol

se eliminó y se añadieron 500 µl de etanol frío al 70 %; se agitó y se centrifugó durante 5 minutos. Al término de este tiempo se eliminó el etanol y se secó el precipitado de ADN al vacío.

Por último el ADN se resuspendió en 50 µl de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se le añadieron 3 µl de RNAsa (25 mg/ml) para eliminar los restos de RNA, dejando luego el ADN extraído a 4 °C durante 24 horas.

Detección del ADN por electroforesis y visualización del producto de PCR.

La electroforesis se utilizó para comprobar la calidad de ADN extraído, la misma se realizó en un gel de agarosa al 1,2 % (p/v) en tampón TAE 1X, a 80 voltios, durante 30 min. El ADN que se extrajo (5 µl de ADN) se cargó en el gel después que haber sido mezclado con 3 µl de tampón de carga (azul bromofenol 1 %). Luego se visualizó el gel en un transluminador de luz ultravioleta (UV) (Wilson, 1987; Patrice *et al.*, 1996). Los ADN extraídos se cuantificaron en un Nanodrop1000 para determinar sus concentraciones en ng/µl y luego se diluyeron alícuotas a 10 ng/ µl con TBE, para ser usado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para realizar la identificación del patógeno se emplearon los iniciadores VER1 (5'CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3') y VER2 (5'ATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3') que amplifican un fragmento de 578 pb de la secuencia del gen calmodulina, que es específico para la especie de *F. verticillioides*. Este gen codifica la proteína calmodulina. Estos iniciadores se seleccionaron a partir de trabajos realizados por Mulé *et al.* (2004).

La amplificación del ADN se realizó en termociclador marca BioRad C1000, bajo los siguientes perfiles de temperatura: Desnaturalización inicial: 95 °C durante 5 min., Ciclos: 35, Segunda desnaturalización: 94 °C durante 50 seg., Primer alineamiento 56 °C, durante, 50 seg., Extensión ADN: 72 °C durante 1 min y Extensión final ADN: 72 °C, durante 7 min, seguido por enfriamiento a 4 °C (Mulé *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008). Luego se

efectuó la reacción de amplificación en un volumen final de 25 μ l, la cual se explica en el cuadro 6.

Cuadro 6.- Reativos para la reacción de amplificación en el PCR del ADN con los iniciadores VER1 y VER2, de aislados de *F. verticillioides* en maíz provenientes de diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	μ l 1R
ADN	10 ng/ μ l	1 ng/ μ l	3 μ l
BUFFER	5 X	1 X	5 μ l
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5 μ l
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	2 μ l
PRIMER VER1 y VER2	5 μ M	0,4 μ M	2 μ l + 2 μ l
TAQ	5 U	0,6 U	0,12 μ l
H ₂ O			9,38 μ l
TOTAL			25 μ l

(Según Mulé *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008).

Para visualizar los productos del PCR, se procedió de la siguiente manera: se usó un volumen de muestra de 5 μ l que fue previamente mezclado con 3 μ l de tampón de carga. En los geles de agarosa se incluyeron varios marcadores de pesos moleculares (Gene RulerTM 100 pb (pares de bases) de ADN Ladder Plus, Gene RulerTM 50 pb de ADN Ladder Plus) los cuales se utilizaron como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados. Estos fragmentos se visualizaron en un transluminador de luz UV y se les tomó fotografía en un fotodocumentador Gel Doc, marca Bio-Rad mediante el programa Quantity One.

Se incluyó un control positivo que es una cepa de referencia de *F. verticillioides* en maíz: D-3273, el cual es un material del Laboratorio de Protección Vegetal de la Fundación

para la Investigación Agrícola y está confirmado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación DANAC, ubicada en San Javier, estado Yaracuy, y para el control negativo se utilizó una cepa de *Piricularia griseae*, obtenido en un monitoreo de las zonas de Guárico, para el Laboratorio de Protección Vegetal de la Fundación para la Investigación Agrícola y caracterizado molecularmente en el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación DANAC. El proceso de amplificación se efectuó en un termociclador modelo Bio-Rad C-1000, según los ciclos de temperatura descritos anteriormente (Mulé *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis molecular

Extracción y detección del ADN de *Fusarium verticillioides*

Se obtuvo ADN de cada uno de los aislados. A estos ADN se les realizó y verificó su calidad en un gel de agarosa al 1,2 %, resultando de muy buena calidad, como se puede observar en la Figura 8. Las concentraciones oscilaron entre 13 ng/μl y 3.307 ng/μl, siendo la media de la concentración de 1660 ng/μl, (Cuadro 7).

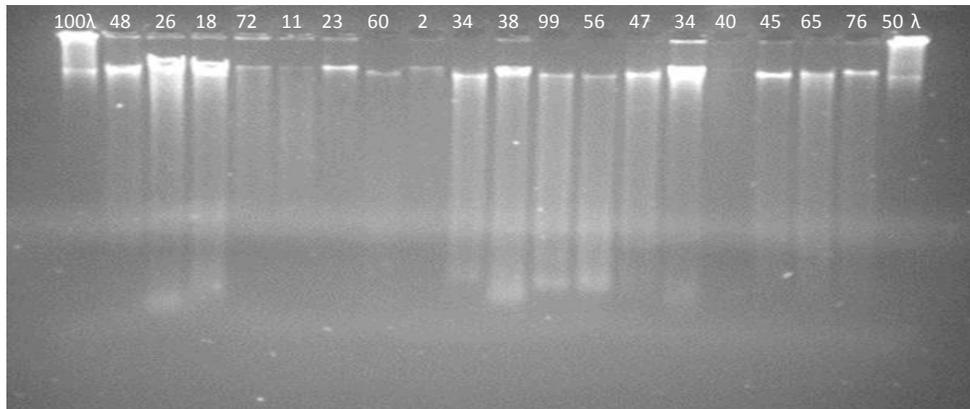


Figura 8. Visualización de la calidad de los ADN de *F. verticillioides* en gel de agarosa al 1,2 %. λ : 100 pb; λ : 50 pb.

Cuadro 7.- Concentración del ADN (ng/μl) de cada uno de los aislados de *F. verticillioides* en maíz provenientes de diferentes localidades de los estados Aragua y Guárico.

Aislado	ng/μl	Aislado	ng/μl	Aislado	ng/μl	Aislado	ng/μl
F 23	1243,99	F 2	123,58	F 8	330,73	F 60	174,96
F 47	94,45	F 34	453,23	F 21	219,63	F 70	1646,07
F 56	187,29	F 86	1293,40	F 10	191,19	F 88	1020,39
F 93	180,57	F 24	275,75	F 40	215,00	F 12	215,28
F 35	12,52	F 31	219,06	F 14	431,69	F 71	1198,17
F 15	229,90	F 4	177,50	F 33	1369,95	F 25	1906,54
F 99	347,38	F 20	1018,71	F 22	156,86	F 11	266,32
F 30	1686,99	F 9	112,38	F 37	296,12	F 72	213,59
F 38	220,93	F 7	147,75	F 41	285,46	F 85	480,98
F 26	1353,06	F 5	133,10	F 68	1840,29	F 13	235,90
F 48	183,10	F 17	311,06	F 16	504,83	F 32	224,60
F 73	3306,79	F 19	403,76	F 18	237,52	F 67	72,00
F 28	299,50	F 74	1392,10	F 64	93,50	F 82	1383,40
F3	224,40	F 62	99,90	F 27	57,40	F 50	105,30
F58	105,30	F 6	161,40	F39	185,60	F100	734,50
F36	2166,75	F46	193,20	F52	36,45	F1	180,80
F51	951,09	F29	33,00	F65	749,20	F98	79,20
F63	3425,30	F66	1253,09	F69	2487,40	F54	987,36
F57	976,29	F75	2187,17	F53	897,39	F55	256,21
F91	1986,44						

Caracterización por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En estos resultados de PCR se comprobó la amplificación del fragmento esperado de la cepa de referencia utilizada como control positivo de esta investigación.

En la Figura 9, se muestran los aislados de *F. verticillioides* amplificados en la PCR, los cuales describen un patrón de bandas perfectamente definidas de acuerdo a los iniciadores VER1 y VER2 con sus 578 pb, evidenciados por los marcadores moleculares de 100 pb y 50 pb, excepto el aislado F38, el cual fue sembrado por segunda vez lográndose su amplificación conforme a la banda esperada. Estos están ordenados respectivamente de acuerdo a su posición en el gel de agarosa.



Figura 9. Identificación de *F. verticillioides* mediante PCR. M1: Marcador de 100 pb; C+: Control positivo, (*F. verticillioides*); 1: F60; 2: F34; 3: F47; 4: F38; 5: F26; 6: F41; 7: F28; 8: F13; 9: F16; 10: F85; 11: F17; 12: F5; 13: F7; C-: Control negativo (*Piricularia*); M2: Marcador 50 pb.

En la Figura 10 se presentan los aislados de *F. verticillioides* que amplificaron en la PCR en bandas perfectamente definidas, los cuales fueron todos. Los demás aislados de *F. verticillioides* amplificaron en la PCR en bandas perfectamente definidas de acuerdo a los iniciadores VER1 y VER2 con sus 578 pb, tomando como referencia los marcadores moleculares de 100 y 50 pb. (Cuadro 8)

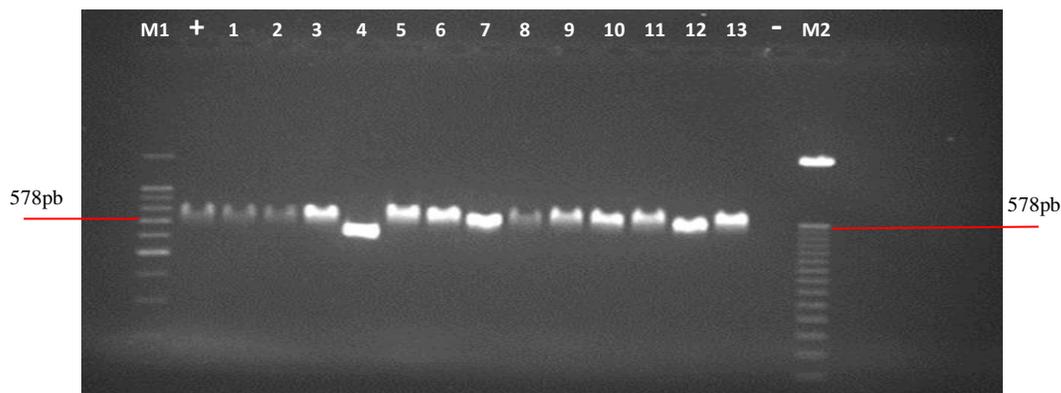


Figura 10. Identificación de *F. verticillioides* mediante PCR. M1: Marcador de 100 pb; C+: Control positivo, (*F. verticillioides*); 1: F58; 2: F29; 3: F20; 4: F31; 5: F37; 6: F53; 7: F54; 8: F55; 9: F57; 10: F62; 11: F63; 12: F91; 13: F75; C-: Control negativo (*Piricularia*); M2: Marcador 50 pb.

Cuadro 8. Aislados de *F. verticillioides* en maíz provenientes de ocho y seis localidades de los estados Aragua y Guárico respectivamente, que amplificaron (+) con la banda esperada.

Aislado	Presencia banda de 578 pb.						
F 23	+	F 2	+	F 8	+	F 60	+
F 47	+	F 34	+	F 21	+	F 70	+
F 56	+	F 86	+	F 10	+	F 88	+
F 93	+	F 24	+	F 40	+	F 12	+
F 35	+	F 31	+	F 14	+	F 71	+
F 15	+	F 4	+	F 33	+	F 25	+
F 99	+	F 20	+	F 22	+	F 11	+
F 30	+	F 9	+	F 37	+	F 72	+
F 38	+	F 7	+	F 41	+	F 85	+
F 26	+	F 5	+	F 68	+	F 13	+
F 48	+	F 17	+	F 16	+	F 32	+
F 73	+	F 19	+	F 18	+	F 67	+
F 28	+	F 74	+	F 64	+	F 82	+
F3	+	F 62	+	F 27	+	F 50	+
F58	+	F 6	+	F39	+	F100	+
F36	+	F46	+	F52	+	F1	+
F51	+	F29	+	F65	+	F98	+
F63	+	F66	+	F69	+	F54	+
F57	+	F75	+	F53	+	F55	+
F91	+						

Mediante esta técnica se logró la caracterización a nivel de especie de los aislados de *F. verticillioides*, corroborando lo que señala Dejardins (2007), quien señala que para la detección e identificación rápida y específica de aislados de la especie *F. verticillioides* se han desarrollado metodologías basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, entre los que

destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez.

Como resultado de esta PCR, de un total de 77 aislados identificados y caracterizados morfológicamente como *F. verticillioides* (Cap. II), utilizando los iniciadores VER1 y VER2 diseñados por Mulé *et al.*, (2004) se obtuvo finalmente 77 aislados identificados como *F. verticillioides*.

Los iniciadores VER1 y VER2 utilizados por Mulé *et al.*, (2004) y Rahjoo *et al.*, (2008) detectan y amplifican un fragmento específico de ADN de dicha especie de 578 pb localizado en el gen *calmodulin*, también ha sido utilizados por otros investigadores como Gómez, (2008), quien utilizó estos iniciadores para identificar a *F. verticillioides* en aislados provenientes de maíz. De la misma manera Patiño *et al.* (2004) utilizaron estos iniciadores para la identificación de este hongo proveniente de aislados de maíz.

Como en otras investigaciones esta es la especie que se ha encontrado con mayor frecuencia en las muestras analizadas, como los casos de Mazzani *et al.*, (2008) y Medina *et al.*, (2007) quienes encontraron a este patógeno en híbridos de maíz, en cinco pequeñas explotaciones y conucos respectivamente de algunos estados de Venezuela.

Los resultados encontrados confirman la identificación macro y microscópica, de los aislados de *F. verticillioides* en medio PDA al compararlas con las descripciones de las claves taxonómicas de Samson *et al.*, (2004) y Leslie y Summerell (2006).

El diseño de los iniciadores para la región codificante de la proteína calmodulina para amplificar positiva o negativamente obteniendo siempre una banda de 578 pb para *F. verticillioides* con los primers especie-específico VER1/VER2, con otra especie de *Fusarium* nunca se obtendrá amplificación (Mulé *et al.*, 2004). En vista de lo anterior la banda obtenida para el aislado F31 (pozo 4 de la Figura 10), aunque no tenga el tamaño exacto puede decirse que molecularmente es *F. verticillioides*. Ocurre diversidad genética dentro de una especie que pudiera cambiar el tamaño del fragmento amplificado por delección de alguna base (pérdida de un fragmento de ADN). Sin embargo, ya que para el diseño de los iniciadores se utilizan porciones del genoma conservado, la alineación de los iniciadores siempre va a ocurrir en *F. verticillioides*.

Varios autores han informado que *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* pueden ocurrir en los granos de maíz y en los alimentos a base de maíz (Leslie

et al., 1990; Logrieco *et al.*, 1995; Munkvold *et al.*, 1997; Šrobárova *et al.*, 2002). Por tanto, la correcta identificación de estas especies es muy importante porque cada una de ellas posee un perfil toxigénico específico y es importante conocer el riesgo toxigénico potencial de la planta o los alimentos contaminados. A este respecto, los primers desarrollados por Mulé *et al.* (2004), pueden ser útiles como marcadores genéticos para la identificación de la población de *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* aislados a partir de maíz. PCR es una técnica extremadamente sensible, pero el valor de las técnicas de diagnóstico en el trabajo depende en el diseño de buenos iniciadores o primers específicos y el desarrollo de las condiciones experimentales apropiadas para el proceso de amplificación de ADN. Usando este conocimiento, puede ser posible, en el futuro desarrollar estrategias para asegurar que todas las especies de hongos que participan en un complejo de una enfermedad en particular, son efectivamente controladas y que la supresión de un hongo no se limita a dar lugar a que está sustituido por otro (Mulé *et al.*, 2004). El desarrollo de primers específicos descritos por estos investigadores para la identificación de *F. verticillioides*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* proporciona herramientas para evitar riesgos para la salud causados por la contaminación de alimentos por micotoxinas y otros a base de maíz, y así tener un impacto positivo en las plantas, los animales y la salud humana.

Rahjoo *et al.* (2008), basados en las características morfológicas, identificaron 191 aislados de los cuales 140 fueron *F. verticillioides*. Luego en ensayos de identificación molecular confirmaron 133 aislados como *F. verticillioides* de los 140 y demostraron que 7 aislados de los 140 eran otras especies de *Fusarium* (un aislado era *F. thapsinum*, cuatro aislados eran *F. proliferatum* y dos aislados eran *Fusarium sp.*). Los primers VER1 y VER2 específicos para *F. verticillioides* confirmaron en este ensayo 98,5 % (131 de 133 aislados) de los identificados como *F. verticillioides*.

Los ADN de los aislados que no amplificaron, aún cuando las concentraciones de los reactivos empleados, así como las condiciones de cambio de temperatura fueron las apropiadas para que se realizaran las amplificaciones de los fragmentos de las muestras pudo ser debido a una mala servida en los canales del gel de agarosa, pudiendo entonces facilitar una dilución en el buffer TBE, originando que la corrida no sea efectiva, ya que luego en nuevas corridas en los geles de agarosa estas muestras amplificaron observándose

las bandas perfectamente definidas. En muchos casos se observan diferencias en las intensidades de las bandas de algunos aislados en los geles de agarosa, las cuales pueden ser atribuidas también a ligeras variaciones en las condiciones de reacción (López *et al.*, 2005).

En esta investigación se ha confirmado que la técnica de PCR, es una herramienta adecuada para la identificación del hongo *F. verticillioides* ya que se emplearon los iniciadores VER1 y VER2 que reconocen las secuencias de los genes que codifican para la producción de la proteína calmodulina. En lo referente a la identificación de especies de hongos del género *Fusarium*, cada vez son más los estudios basados en el análisis de los ácidos nucleicos cuyo objetivo es la obtención de nuevos iniciadores específicos por ser especies de un amplio interés como patógenos de cultivos y productores de micotoxinas (Gómez, 2008; Mulé *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008).

El diagnóstico basado en el método de PCR, se ha aplicado como una prueba alternativa sustituyendo el uso de métodos microbiológicos y químicos engorrosos y el tiempo para la detección y la identificación de toxinas producidas por los hongos *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Niessen, 2007).

CONCLUSIONES

Los iniciadores VER1 y VER2 (Mulé *et al.*, 2004) permitieron una exacta y precisa identificación del patógeno *F. verticillioides*.

Se amplificó un fragmento característico en todas las muestras analizadas de 578 pb, el cual corresponde a *F. verticillioides*, característicos para cada una de las muestras analizadas. Las muestras que presentan el mismo patrón de bandas (578 pb) evidencian que los aislados corresponden a *F. verticillioides*.

La presente investigación confirma que la técnica de PCR, es una herramienta precisa para la identificación de *F. verticillioides*.

La caracterización molecular corrobora los resultados obtenidos por el método tradicional para la caracterización morfológica de *F. verticillioides* según la clave taxonómica de Leslie y Summerell, 2006.

RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de investigación que involucren la cuantificación de la producción de fumonisinas producidas por *F. verticillioides*.
- Realizar trabajos de investigación con técnicas moleculares utilizando iniciadores específicos de los genes FUM1, FUM2, FUM3, FUM4 y FUM5 para caracterización de la capacidad potencial de las cepas de *F. verticillioides* para producir fumonisinas.
- Las caracterizaciones moleculares permitirá evaluar rápidamente material genético resistente a *F. verticillioides*.
- Esta metodología permitirá seleccionar zonas aptas para la obtención de semillas de maíz libres de *F. verticillioides*.
- Hacer énfasis en la necesidad de identificar de forma correcta la especie y variabilidad dentro de la especie en lo que se refiere a la producción de micotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abd-Elsalam, K., I. Aly, M. Abdel, M. Khalil and J. Verret. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based of nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr. J. Microbiol.* 2:82-85.
- Baird, R., Abbas, H. K., Windham, G., Williams, P., Baird, S., Ma, P., Kelley, R., Hawkins, L., Scruggs, M. 2008. Identification of select fumonisin forming *Fusarium* species using PCR applications of the polyketide synthase gene and its relationship to fumonisin production *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 9:554-570.
- Betichini, Faria, C., Lumi Abe, C. A., Norvis da Silva, C., Tesman, D. J. and Barbosa Tessman, I. P. 2012. New PCR Assays for the identification *fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and the other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int. J. Mol. Sci.* 13:115-132.
- Biazio, G. R., Leite, G. G. S., Tessmann, D. J., Barbosa-Tessmann, I. P. 2008. A new PCR approach for the identification of *Fusarium graminearum*. *Br. J. Microbiol.* 2008. 39:554-560.
- Bluhm, B. H., Flaherty, J. E., Cousin, M. A. and Woloshuk, C. P. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene and fumonisin producing species of *Fusarium* in cornmeal, *J. Food Prot.* 65:1955-1961.
- Bottalico A, 1998. Fusarium disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 80: 85–103.
- Cordeiro, F. A., Faria, C. B. y Barbosa-Tessmann, I. P. 2010. Identification of new galactose oxidase genes in *Fusarium* spp. *J. Basic Microbiol.* 50:527-537.
- Crous, P. 2005. Impact of molecular phylogenetic on the taxonomy and diagnostics of fungi. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35:47-51.
- Desjardins, A. E. and R. H. Proctor. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology.* 119:47-50.

- Doohan, F. M., Weston, G., Rezanoor, H. N., Parry, D. W. and Nicholson, P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3850-3854.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A. and Mulè, G. 2011. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*. doi: 10.1016/j.funbio.2011.11.007.
- French, R. y T. Hebert. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 79 p.
- Fouquaert, E., Peumans, W. J., Gheysen, G. and Van Damme, E. J. M. 2011. Identical homologs of the *Galanthus nivalis* agglutinin in *Zea mays* and *Fusarium verticillioides*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49:46-54.
- Geisen, R., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Syst. Appl. Microbiol.* 19:388-392.
- Gómez, E. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. 225 p.
- González-Jaén, M. T., Mirete, S., Patiño, B., López-Errasquín, E. and Vázquez, C. 2004. Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*, *Eur. J. Plant Pathol.* 110:525-532.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V. and González-Jaén, M. T. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*: 29:681-689.
- Jurado, M., Marín, P., Calleja, C., Moretti, A., Vázquez, C. and González-Jaén, M.T., 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology*. 27:50-57.

- Knutsen, A., M. Torp and A. Holst. 2004. Phylogenetic analysis of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *Int. J. Food Microbiol.* 95:287-295.
- Kulik, T., Fordonski, G. Pszczółkowska, A., Plodzien, K. and Lapinski, M. 2004. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. *FEMS Microbiol. Lett.* 239:181-186.
- Lanubile, A., Pasini, L. and Marocco, A. 2010. Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *Journal of Plant Physiology.* 167:1398-1406.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A., Nelson, P. A. and Toussoun, T. A. 1990. *Fusarium spp.* from maize, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology.* 86:343-350.
- Leslie, J. F. and B. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. State Avenue, Amer, Iowa, USA. 388 p.
- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Bottalico, A. and Corda, P. 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot and associated mycotoxins in Italy. *Plant Disease.* 79:727-731.
- López, C., Giro, L., Ramos, L., Radaman, S. y Bulacio, L. 2005. Comparación de diferentes métodos de identificación de especies del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología.* 37:16-21.
- López-Errasquín, E., González-Jaén, M. T., Callejas, C. and Vázquez, C. 2006. A novel MFS transporter encoding gene in *Fusarium verticillioides* probably involved in iron-siderophore transport. *Mycological Research.* 110:1102-1110.
- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M. and González-Jaén, Ma. T. 2007. Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of fum1 and fum19 genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods.* 68:312-317.

- Machado, J. C., Langerak, C. J., Jaccoud-Filho, D. S. 2002. *Seed-Borne Fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis*; ISTA/UFLA: Bassersdorf, Switzerland.
- Mazzani, C., O. Luzón, M. Chavarri, M. Fernández y N. Hernández. 2008. *Fusarium verticillioides* en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. *Rev. Fitopatología Venezolana* 21:18-22.
- Medina, C., L. Subero y N. Sanabria. 2007. Incidencia de *Fusarium moniliforme* (Sheldon) en semillas de dos híbridos de maíz (*Zea mays*, L.) y ubicación del hongo en la semilla. *Rev. Fitopatología Venezolana* 20:73 (Resumen).
- Moore, P. and J. Lindsay. 2002. Molecular characterization of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, ERSA-15 and EMRSA-16. *J. Med. Microbiol.* 51:516-521.
- Mulé, G., A. Surca, G. Stea and A. Moretti. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulina partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:495-502.
- Mulé, G., González-Jaén, M. T., Hornok, L., Nicholson, P. and Waalwijk, C. 2005. Advances in molecular diagnosis of toxigenic *Fusarium* species: a review, *Food Addit. Contam.* 22:316-323.
- Munkvold, G. P., D. E. McGee and W. Carlton. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87:209-217.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Cook, R. J. 1981. *Fusarium: disease, biology and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park and London, USA.
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53:17-37.
- Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R. C., Gosman, N. E., Simpson, D. R., Thomsett, M. and Wilson, A. H. 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:691-703.
- Nicholson, P., Simpson, D. R. Wilson, A. H., Chandler, E. and Thomsett, M. 2004. Detection and differentiation of trichothecene and enantiin-producing *Fusarium* species on smallgrain cereals, *Eur. J. Plant Pathol.* 110:503-514.

- Niessen, M. L. and Vogel, R. F. 1997. Specific identification of *Fusarium graminearum* by PCR with *gaoA* targeted primers. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:111-113.
- Niessen, L. and Vogel, R. F. 1998. Goup-specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium* species in pure cultures and cereal samples, *Syst. Appl. Microbiol.* 21:618-631.
- Niessen, L. 2007, PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 119:38-46.
- O'Donnell, K., Cigelnick, E. and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia.* 90:465-493.
- Olive, D. and P. Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA based typing microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37:1661-1669.
- Oliveira Rocha, L., Martins Reis, G. Nascimento da Silva, V., Braghini, R., Geraledes Teixeira, M. M. and Correa, B. 2011. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolate from corn grain of different geographic origins in Brasil. *International Journal of Food Microbiology.* 145:9-21.
- Patiño, B., S. Mirete, M. T. González-Jaén, G. Mulé, M. T. Rodríguez and L. Vázquez. 2004. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *J. Food Prot.* 67:1278-1283.
- Patrice A., Breat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. and A. Laroche. 1996. A Rapid and Sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Agri-Food Canada.* 86:361-366.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Mirzadi-Gohari, A., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., Razzaghian, J. and Klemsdal, S. S. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology.* 90:463-468.
- Rodriguez Estrada, A. E., Hegeman, A., Corby Kistler, H. and May, G. 2011. In vitro interactions between *Fusarium verticillioides* and *Ustilago maydis* through real-time PCR and metabolic profiling. *Fungal Genetics and Biology.* 48:874-885.
- Samson, R., Hoekstra, E. and Frisvad, J. 2004. Introduction to food borne fungi, 7 th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

- Sánchez-Rangél, D., San Juan-Badillo, A. and Placencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolates from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53:8565-8571.
- Soll, D. 2000. The Ins and Outs of DNA fingerprinting the infection fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:332-370.
- Srobarova, A., Moretti, A., Ferracane, R., Ritieni, A. and Logrieco, A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins in Slovakia. *European Journal of Plant Pathology.* 108:299-306.
- Tang, C. M., Holden, D.W., Aufauvre-Brown, A. and Cohen, J., 1993. The detection of *Aspergillus spp.* by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:1313-1317.
- Visentin, I., Tamietti, G., Valentino, D., Portis, E., Karlovsky, P., Moretti, A. and Cardinale, F. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research.* 113:1137-1145.
- Wassenaar, T. and D. Newell. 2000. Genotyping of *Campylobacter spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1-9.
- Whittaker, J. W. 2005. The radical chemistry of galactose oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:227-239.
- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *ocurrent protocols in molecular biology.* (Ausubel, F. M., Brent, R. Klingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. and Struhl, H., (Eds), unit 2.4.1. John Wiley and Sons, NY, USA.
- Zheng, Q. and Ploetz, R. 2002. Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay. *Plant Pathol.* 51:208-216.

A N E X O S

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (1/15)

Planilla de toma de datos de las muestras para la caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides*

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL					PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Var	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F1	Tocorón 550 (blanco)		Semillas Aragua	Semilla	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra	Hacienda Saladillo	Edgar Molina
F2	Tocorón 550 (blanco)		Semillas Aragua	Semilla	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunem o	Valle de Tucutune mo	Parcela N° 28	Luís Pereira
F3	Pioneer P30R92 (Blanco)		SEHIVE CA	Semillas	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunem o	Valle de Tucutune mo	Finca Portuguaro	Antonio Silveira
F4	Cefloarca 02 (Blanco)		CEFLO ARCA	Semillas	Aragua	Libertador	Palo Negro	Palo Negro	Hacienda La Peñera	Tobias Peña
F5		V.S.5 (Blanco)	INIA- CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	Maracay	El Limón	Campo Experiment al	INIA- CENIAP
F6		V.S.Q.1 (Blanco)	INIA- CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	Maracay	El Limón	Campo Experiment al	INIA- CENIAP
F7	HPQM28 (Blanco)		INIA- CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	Maracay	El Limón	Campo Experiment al	INIA- CENIAP

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (2/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL					PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Var	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F8		H-INIA-21 (Blanco)	INIA-CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	Maracay	El Limón	Campo Experimental	INIA-CENIAP
F9		H.A.INIA-41 (Blanco)	INIA-CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	El Limón		Campo Experimental	INIA-CENIAP
F10	Tocorón 550 (blanco)		Semillas Aragua	Semilla	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunemo	Los Bagres	Parcela N° 35	Plinio Valdivieso
F11	3005 (Amarillo)		SEHIVECA	Semilla	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunemo	Sector 2	Parcela N° 37	Jesús Carmona
F12	Dorado 5 (Blanco)		CEFLOARCA	Semilla	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunemo	Los Bagres	Parcela N° 31	Nilda Zárate
F13	Dorado 5 (Blanco)		CEFLOARCA	Consumo Humano	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunemo	Los Bagres	Parcela N° 17	Fernando Pita
F14	454 (Blanco)		PROSVE NCA	Consumo Humano	Aragua	Zamora	Villa de Cura		Parcela N° 41	Quimiro Morante
F15	95 (Blanco)		HIMECA	Consumo Human	Aragua	Zamora	Villa de Cura		Parcela N° 29	Manuel García
F16	Dorado 5 (Blanco)		CEFLOARCA	Semilla	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunemo	Los Bagres	Parcela N° 22	Samuel Marín

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (3/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F17	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asís	La Molinera	Fundo Buenos Aires	Oscar Bolivar
F18	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asis	La Molinra	Parcela 66	Carlos Calixto
F19	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	Valle de Tucutunemo	El Cortijo	Parcela 15	Anselmo Pérez
F20	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Zaraza			Jesús Castellanos
F21	Hib. Pioneer P30R92	SEHIVECA	Semilla	Guárico	Ortíz	Zaraza			Amilkar Mendez
F22	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Zaraza			Jorge Rivas

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (4/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL					PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Var	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F23	Hib. Tocarón 550 (Blanco)		Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asís	La Molinra	Parcela N° 53	Nerio Parra
F24	Hib. Tocarón 550 (Blanco)		Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asís	La Molinra	Parcela N° 56	Ángel Moreno
F25	Sefloarca 02 (Blanco)		SEFLOA RCA	Semillas	Aragua	Zamora	Villa de Cura			Tomás Malavé
F26		H-INIA-21 (Blanco)	INIA-CENIAP	Semilla	Aragua	Mario B. Irigorri	Maracay	El Limón	Campo Experimental	INIA-CENIAP
F27	Sefloarca 02 (Blanco)		SEFLOA RCA	Semillas	Aragua	Zamora	Villa de Cura			Víctor Farías
F28	Sefloarca 02 (Blanco)		SEFLOA RCA	Semillas	Aragua	Zamora	Villa de Cura			Edesio Marín
F29	Hib. Pioneer P30R92		SEHIVECA	Semilla	Guárico	Nellado				Guillermo Azocar

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (5/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F30	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Zaraza			Lino Uzcategui
F31	Cefloarca 02 (Blanco)	SEFLOAR CA	Semillas	Aragua	Zamora	Villa de Cura			Gilberto Núñez
F32	Cefloarca 02 (Blanco)	SEFLOAR CA	Semillas	Aragua	Urdaneta	Barbacoa	Ruíz Pineda	Parcela N° 40	Manuel Rincón
F33	Hib. Pioneer P30R92 (Blanco)	Semillas Aragua	Semilla	Guárico	Ortíz	Zaraza			Argenis león
F34	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asis	La Molinra Parcela 66	Parcela N° 29	Mario Elorza
F35	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Zaraza			Ruperto Natera

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (6/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F36	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Zaraza			Marcos Longar
F37	Cefloarca 02 (Blanco)	SEFLOA RCA	Semillas	Aragua	Urdaneta	Barbacoa	Ruíz Pineda	Parcela N° 31	Héctor Portillo
F38	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	San José de Tiznado			Pedro Rondón
F39	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Urdaneta	Barbacoa	Asentamiento Ruíz Pineda	Parcela N° 49	Luis Zerpa
F40	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	San José de Tiznado			Feliciano Maneiro
F41	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Rogelio Malavé

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (7/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F42	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Héctor López
F43	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Javier Tirso
F44	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Federico Torres
F45	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Urdaneta	Barbacoa	Asentamiento Ruíz Pineda	Parcela N° 48	Alejandro Lorenzo
F46	Hib. Pioneer P30R92	SEHIVEC A	Semilla	Guárico	Ortíz	San José de Tiznado			David Mijares
F47	Hib. Pioneer P30R92	CEHIVEC A	Semilla	Guárico	Ortíz	San José de Tiznado			Ángel Guilarte
F48	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Erasmo Palencia

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (8/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F49	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Urdaneta	Barbacoa	Asentamiento Ruíz Pineda	Parcela N° 39	Luís López
F50	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Luís Manuel Palencia
F51	Hib. Dorado 5 Amarillo	CEFLOA RCA	Semilla	Aragua	Libertad or	Punta larga	Punta larga	Parcela N° 40	Maximiliano Marcano
F52	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Ortíz	San José de Tisnao			Simón Sandoval
F53	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Ortíz	San José de Tisnao			Freddy Bermudez
F54	Hib. Dorado 5	CEFLOA RCA	Semilla	Aragua	Urdaneta	Barbacoa	Asentamiento Ruíz Pineda	Parcela N° 47	Pedro Lorenzo
F55	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Nellado	El Sombrero			Jorge Díaz
F56	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Ortíz	San José de Tisnao			Edgar Rámos
F57	Maíz Criollo	Comunal	Semilla, Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Zaraza			Francisco González
F58	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Miranda	Calabozo			Dani Oliveros

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (9/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F59	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico		Rio Verde			Hermes Guevara
F60	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Miranda	Calabozo			Juan Villarroel
F61	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Miranda	Calabozo			Ruben Acosta
F62	Hib. Dorado 5	CEFLOA RCA	Semilla	Aragua	Libertador	Punta Larga Vía Magdaleno	Punta Larga	Parcela 18	Nerio Estrada
F63	Hib. Dorado 5	CEFLOA RCA	Semilla	Aragua	Libertador	Punta Larga Vía Magdaleno	Punta Larga	Parcela 29	Silverio Fuentes
F64	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Miranda	Calabozo			Jesús Marcano
F65	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Nellado	El Sombrero			Federico Gascón
F66	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Nellado	El Sombrero			José González

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (10/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F67	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Nellado	El Sombrero			Nelson Díaz
F68	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Rio Verde			Raúl Trino
F69	HPQM28 (Blanco)	INIA- CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	Maracay	El Limón	Campo Experiment al	INIA- CENIAP
F70	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Nellado	El Sombrero			Celestino Díaz
F71	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Río Verde			Rafael Tellerías
F72	HPQM28 (Blanco)	INIA- CENIAP	Semillas	Aragua	Mario Briceño Iragorri	Maracay	El Limón	Campo Experiment al	INIA- CENIAP

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (11/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F73	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Río Verde			Julián Mosquera
F74	Cefloarca 02 (Blanco)	CEFLOA RCA	Semillas	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra	Hacienda La Peñera	Julio Solórzano
F75	Hib. Pioneer P30R92	CEHIVECA	Semilla	Guárico	Ortíz	Río Verde			Nicolás Peña
F76	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asís	La Molinra	Parcela 19	Huberto Arévalo
F77	Hib. Pioneer P30R92	CEHIVECA	Semilla	Guárico	Ortíz	Río Verde			Oscar Tápia
F78	Hib. Pioneer P30R92	CEHIVECA	Semilla	Guárico	Miranda	Calabozo			Joan Sarabia
F79	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 40	Nelson Hernandez
F80	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Nellqdo Zamora	El Sombrero			Ricardo Gómez

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (12/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F81	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Ricardo Toribe
F82	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 38	José González
F83	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 20	María Castañeda
F84	Hib. Pioneer 3031	CEHIVEC A	Semilla	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 25	Juan Solano
F85	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Guárico	Ortíz	Laguna de Piedra			Silvio Gagliani
F86	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 16	Pedro Arismendi

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (13/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F87	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 00	José Zabala
F88	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Palo Negro	Sector La Quinta	Parcela N° 35	Nelson Hernandez
F89	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra		Víctor García
F90	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra		Jesús Marcano
F91	Tocarón 550 (blanco)	Semillas Aragua	Semilla	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra	Hacienda Los Hermanos	Julio Carrillo
F92	Hib. 176-C	Seminaca	Semilla	Guárico	Miranda	Calabozo			Orlando Barrios
F93	Hib. Pioneer 3031	CEHIVEC A	Semilla	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra		Gregorio Tirado

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (14/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F94	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra		Rigoberto Molina
F95	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Puerta Negra	Puerta Negra		Eusebio Martínez
F96	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asís	La Molinera	Parcela N° 33	Daniel García
F97	Hib. Pioneer P30R92	CEHIVECA	Semilla	Aragua	Libertador	Punta Larga	Punta Larga	inca Portuguaro	Gerardo Hernández
F98	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Zamora	San Francisco de Asís	La Molinra	Parcela 42	Henry Pedrique
F99	Hib. Tocarón 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertador	Punta Larga	Punta Larga	Parcela N° 40	Armando Reyes

PLANILLAS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE *F. VERTICILLIOIDES* CARACTERIZADOS MORFOLÓGICAMENTE (15/15)

IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL				PROCEDENCIA					
Aislam	Hib	Emp	Uso	Estado	Munic	Loc.	Asent	Parcela	Nomb. Agricul
F100	Hib. Tocoron 550 (Blanco)	Semillas Aragua	Consumo Humano	Aragua	Libertad or	Punta Larga	Punta Larga	Parcela 03	Néstor Rodríguez
F101	Tocorón 550 (blanco)	Semillas Aragua	Semilla	Aragua	Zamora	Punta Larga	Punta Larga	Parcela 10	Alexander Tenorio

REACTIVOS, SOLUCIONES Y CÁLCULOS NECESARIOS PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN DE *F. VERTICILLIOIDES*.

Medio de cultivo:

PDA: Referido a 1 litro de agua.

200 g de papa + 15 g de dextrosa + 17 g de agar.

Electroforesis:

Gel de agarosa al 1,2 % (1,2 g de agarosa) en 100 ml de solución TBE 0,5X.

Tampón de Carga:

Azul Bromofenol 1 % 2,5 ml

Ficoll 2,5 g

EDTA 0,5M 1 ml

Agua MiliQ 4 ml

Solución Tampón: Se preparan 750 µl: 250 µl de Tris HCl 100 mM pH 7.2; 250 µl de EDTA 100 mM pH 8.0; 250 µl de SDS al 10 % pH 7.2

Tris-HCl 100 mM ph 7.2:

Se toma 1,211 g de Tris base cuyo peso molecular (PM) es 121,1 g/mol y se afora con agua destilada hasta 100 ml, el pH se condiciona con ácido clorhídrico.

EDTA 100 mM pH 8.0:

Se pesan 2,72 g de EDTA cuyo PM es 372,2 g/mol y se afora con agua destilada esterilizada hasta 100 ml

10 % SDS:

Se pesan 10 g de dodecil sulfato sódico (SDS), se adicionan 90 ml de agua destilada esterilizada, se calienta a 68 °C, se ajusta el pH a 7,2 con HCl y se afora a 100 ml, no necesita ser esterilizado.

Se coloca en el tubo eppendorf 250 µl de c/u y se mantiene todo en frío.

Proteinasa K (20 mg/ml):

Se pesan 20 mg de proteinasa K y se le adiciona 1 ml de agua destilada esterilizada.

NaCl₂ 5M:

Para 100 ml se pesan 29,22 g de NaCl y se adicionan 80 ml de agua destilada esterilizada y se afora a 100 ml.

CTAB/NaCl:

Se pesan 10 g de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) y se le adicionan 100 ml de NaCl al 0.7M (pesar 4,09 g de NaCl y diluirlos en 100 ml de agua destilada esterilizada).

Cloroformo/Alcohol/Isoamílico (24:1):

Se miden 24 partes de cloroformo por una 1 de alcohol isoamílico.

Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1):

Se utiliza Fenol: Cloroformo:Alcohol isoamílico 25:24:1.

Saturado con 10 mM Tris ph 8.0, 1mM EDTA de SIGMA.

TE:

Se pesaron 121 g de Trisma® base y 0,372 g de EDTA, disueltos en 1000 ml de agua miliQ.

Tampón TAE 50X:

Trisma® base 2M 242 g, ácido acético glacial 50 mM 57,1 ml y EDTA 1 mM. Llevado a 1000 ml con agua destilada.

TAE 1X:

20 ml de TAE 50X en 980 ml de agua.

RNAsa:

25 mg/ml.

Aislamientos a los cuales se les extrajo el ADN:

F1-F2-F3-F4-F5-F6-F7-F8-F9-F10-F11-F12-F13-F14-F15-F16-F17-F18-F19-F20-F21-F22-F23-F24-F25-F26-F27-F28-F29-F30-F31-F32-F33-F34-F35-F36-F37-F38-F39-F40-F41-F46-F47-F48-F50-F51-F52-F53-F54-F55-F56-F57-F58-F60-F62-F63-F64-F65-F66-F67-F68-F69-F70-F71-F72-F73-F74-F75-F82-F85-F86-F88-F91-F93-F98-F99-F100.

Total 77 aislamientos.

CONCENTRACIÓN ORIGINAL DE LOS ADN Y CÁLCULOS PARA LLEVARLOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 ng/μl.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = Concentración inicial (ng/μl)

V_1 = Volumen de ADN con la concentración inicial

C_2 = concentración requerida de 10 ng/μl

V_2 = Volumen total (Volumen de ADN de concentración de 10 ng/μl + Volumen de TE (μl))

Fecha de medición de las concentraciones originales en el Nanodrop 1000: 25/05/2013

Muestras	[] inicial (ng/μl)	[] requerida (ng/μl)	Volumen (μl) a preparar Volumen total	Volumen de ADN a tomar (μl)	Volumen (μl) de TE para preparar Volumen total
F47	94,45	10	25	2,6	22,4
F56	187,29	10	25	1,3	23,7
F54	229,9	10	25	1,1	23,9
F99	347,38	10	25	0,7	24,3
F38	220,93	10	25	1,1	23,9
F2	123,58	10	25	2,0	23,0
F34	453,23	10	25	0,6	24,4
F60	174,96	10	25	1,4	23,6
F23	215,28	10	25	1,2	23,8
F11	266,32	10	25	0,9	24,1
F72	213,59	10	25	1,2	23,8
F85	480,98	10	25	0,5	24,5
F41	285,46	10	25	0,9	24,1
F48	183,1	10	25	1,4	23,6
F24	275,75	10	25	0,9	24,1
F86	219,06	10	25	1,1	23,9
F12	177,5	10	25	1,4	23,6
F9	112,38	10	25	2,2	22,8
F7	147,75	10	25	1,7	23,3
F8	330,73	10	25	0,8	24,2
F21	219,63	10	25	1,1	23,9
F91	191,19	10	25	1,3	23,7
F88	215,00	10	25	1,2	23,8
F14	431,69	10	25	0,6	24,4
F98	760,96	10	25	0,3	24,7
F22	156,86	10	25	1,6	23,4
F93	296,12	10	25	0,8	24,2

CONCENTRACIÓN ORIGINAL DE LOS ADN Y CÁLCULOS PARA LLEVARLOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 ng/μl.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = Concentración inicial (ng/μl)

V_1 = Volumen de ADN con la concentración inicial

C_2 = concentración requerida de 10 ng/μl

V_2 = Volumen total (Volumen de ADN de concentración de 10 ng/μl + Volumen de TE (μl))

Fecha de medición de las concentraciones originales en el Nanodrop 1000: 25/05/2013.

CONTINUACIÓN

Muestras	[] inicial (ng/μl)	[] requerida (ng/μl)	Volumen (μl) a preparar Volumen total	Volumen de ADN a tomar (μl)	Volumen (μl) de TE para preparar Volumen total
F5	133,1	10	25	1,8	23,2
F17	311,06	10	25	0,8	24,2
F19	403,76	10	25	0,6	24,4
F16	504,83	10	25	0,5	24,5
F18	237,52	10	25	1,1	23,9
F13	235,9	10	25	1,1	23,9
F32	224,6	10	25	1,1	23,9
F20	72	10	25	3,5	21,5
F28	299,5	10	25	0,8	24,2
F51	213	10	25	1,2	23,8
F37	93,5	10	25	2,7	22,3
F53	224,4	10	25	1,1	23,9
F55	99,9	10	25	2,5	22,5
F27	57,4	10	25	4,4	20,6
F50	105,3	10	25	2,4	22,6
F58	458,5	10	25	0,5	24,5
F6	161,4	10	25	1,5	23,5
F31	951	10	25	0,3	24,7
F3	33	10	25	7,6	17,4
F39	185,6	10	25	1,3	23,7
F15	749,2	10	25	0,3	24,7
F35	79,2	10	25	3,2	21,8
F100	734,5	10	25	0,3	24,7
F46	193,2	10	25	1,3	23,7

CONCENTRACIÓN ORIGINAL DE LOS ADN Y CÁLCULOS PARA LLEVARLOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 ng/μl.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = Concentración inicial (ng/μl)

V_1 = Volumen de ADN con la concentración inicial

C_2 = concentración requerida de 10 ng/μl

V_2 = Volumen total (Volumen de ADN de concentración de 10 ng/μl + Volumen de TE (μl))

Fecha de medición de las concentraciones originales en el Nanodrop 1000: 25/05/2013.

CONTINUACIÓN

Muestras	[] inicial (ng/μl)	[] requerida (ng/μl)	Volumen (μl) a preparar Volumen total	Volumen de ADN a tomar (μl)	Volumen (μl) de TE para preparar Volumen total
F82	1293,4	10	100	0,8	99,2
F70	1646,07	10	100	0,6	99,4
F69	1020,39	10	100	1	99,0
F71	1198,17	10	100	0,8	99,2
F25	1906,54	10	100	0,5	99,5
F26	1353,06	10	100	0,7	99,3
F29	1018,71	10	100	1	99,0
F33	1369,95	10	100	0,7	99,3
F68	1840,29	10	100	0,5	99,5
F10	1383,4	10	100	0,7	99,3
F74	1392,1	10	100	0,7	99,3
F73	3306,79	10	200	0,6	199,4
F4	3425,3	10	200	0,6	199,4
F36	2166,75	10	200	0,9	199,1
F40	2098,57	10	200	1	199
F57	1823,47	10	200	1,1	198,9
F62	1276,13	10	200	1,6	198,4
F63	2103,29	10	200	1	199
F64	1923,43	10	200	1	199
F65	1125,76	10	200	1,9	198,1
F52	36,45	10	25	6,9	18,1
F1	180,8	10	25	1,4	23,6
F75	1243,99	10	100	0,8	99,2
F30	1686,99	10	100	0,6	99,4

CONCENTRACIÓN ORIGINAL DE LOS ADN Y CÁLCULOS PARA LLEVARLOS A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 ng/μl.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = Concentración inicial (ng/μl)

V_1 = Volumen de ADN con la concentración inicial

C_2 = concentración requerida de 10 ng/μl

V_2 = Volumen total (Volumen de ADN de concentración de 10 ng/μl + Volumen de TE (μl))

Fecha de medición de las concentraciones originales en el Nanodrop 1000: 25/05/2013.

CONTINUACIÓN

F66	2741,18	10	200	0,73	199,27
67	3147,41	10	200	0,6	199,4
<i>F. verti</i> (C+)	1837,28	10	200	1,1	198,9
<i>Piricularia</i> (-)	3014,3	10	200	0,7	199,3

CÁLCULOS DE LOS REACTIVOS A UTILIZAR PARA EL PCR DE ACUERDO A RAHJOO ET AL., 2008 Y MULÉ ET AL., 2004.

Volumen final a utilizar por cada reacción de PCR: 25 μl

CONDICIONES:

Reactivos, concentración inicial, concentración final y volumen de éstos para cada reacción.

La fórmula a utilizar para calcular las concentraciones es: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

ADN: De la concentración inicial se diluyo a 10 ng/μl

Según Rahjoo *et al.*, 2008 en su trabajo utilizaron 25 ng de ADN en 25 μl de volumen final de cada reacción lo cual equivale a 1 ng de ADN en 1 μl = 1 ng/μl

Entonces:

$$10 \text{ ng}/\mu\text{l} \times V_1 = 1 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 25 \mu\text{l} \quad \text{Luego: } V_1 = 2,5 \mu\text{l}$$

Por lo que se utilizaran 2,5 μl de ADN de cada aislado por reacción para el PCR

BUFFER: El producto como lo vendió el proveedor al laboratorio, trajo una concentración de 5X.

La concentración a utilizar es de 1X por lo que:

$$5X \times V_1 = 1X \times 25 \mu\text{l} \quad \text{Luego } V_1 = 5 \mu\text{l}$$

MgCl₂: El producto como lo vendió el proveedor al laboratorio, trajo una concentración de 25 mM.

Según Rahjoo *et al.*, 2008 en su trabajo utilizaron una concentración de 1,5 mM entonces:

$$25 \text{ mM} \times V_1 = 1,5 \text{ mM} \times 25 \mu\text{l} \quad \text{Luego } V_1 = 1,5 \mu\text{l}$$

dNTPs: El producto a la cual lo tiene diluido el laboratorio es de una concentración de 2,5 mM.

Según Rahjoo *et al.*, 2008 en su trabajo utilizaron una concentración de 0,2 mM entonces:

$$2,5 \text{ mM} \times V_1 = 0,2 \text{ mM} \times 25 \mu\text{l} \quad \text{Luego } V_1 = 2,0 \mu\text{l}$$

PRIMERS:

VER1 trae de la empresa EUROGENTEC una cantidad de 195,8 nmol y según los datos técnicos de dicha empresa, para diluirlo a una concentración de 100 μM se le deben añadir 1,96 ml de Buffer.

Entonces: Según Rahjoo *et al.*, 2008 en su trabajo utilizaron una concentración de 15 pmol del VER1, por lo que:

Concentración molaridad final (C_f) = número de moles x volumen:

$$(C_f) = 15 \text{ pmol} \times 25 \mu\text{l} \text{ (Vfinal)} = 375 \text{ nM} = 0,375 \mu\text{M} \quad \text{entonces:}$$

$$C_1 \times 2 \mu\text{l} = 0,375 \mu\text{M} \times 25 \mu\text{l} \quad \text{Luego } C_1 = 4,688 \mu\text{M} \text{ aproximadamente } 5 \mu\text{M}, \text{ por lo que se preparará el primer a una concentración de } 5 \mu\text{M}$$

Por lo que tenemos:

$$100 \mu\text{M} \times V_1 = 5 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l} \quad \text{Luego } V_1 = 5 \mu\text{l}.$$

Entonces del VER1 a una concentración de 100 μM, utilizaron 5 μl y se le añadieron 95 μl de TE (1X) para obtener 100 μl a una concentración de 5 μM.

Para añadir al coctel 2 μl por cada reacción este quedó a una concentración de 0,4 μM, según la fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$5 \mu\text{l} \times 2 \mu\text{l} = C_2 \times 25 \mu\text{l} \text{ (volumen final de cada reacción).}$$

VER2 trae de la empresa EUROGENTEC una cantidad de 491,0 nmol y según los datos técnicos de dicha empresa, para diluirlo a una concentración de 100 μM se le deben añadir 4,91 ml de Buffer.

Entonces: Según Rahjoo *et al.*, 2008 en su trabajo utilizaron una concentración de 15 pmol del VER2, por lo que:

Concentración molaridad final (C_f) = número de moles x volumen:

$(C_f) = 15 \text{ pmol} \times 25 \text{ } \mu\text{l}$ (V_{final}) = 375 nM = 0,375 μM entonces:

$C_1 \times 2 \text{ } \mu\text{l} = 0,375 \text{ } \mu\text{M} \times 25 \text{ } \mu\text{l}$ Luego $C_1 = 4,688 \text{ } \mu\text{M}$ aproximadamente **5 μM** , por lo que se preparará el primer a una concentración de **5 μM**

Por lo que tenemos:

$100 \text{ } \mu\text{M} \times V_1 = 5 \text{ } \mu\text{M} \times 100 \text{ } \mu\text{l}$ Luego $V_1 = 5 \text{ } \mu\text{l}$.

Entonces del VER2 a una concentración de 100 μM , utilizaron 5 μl y se le añadieron 95 μl de TE (1X) para obtener 100 μl a una concentración de 5 μM .

Para añadir al coctel 2 μl por cada reacción este quedó a una concentración de 0,4 μM , según la fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$5 \text{ } \mu\text{l} \times 2 \text{ } \mu\text{l} = C_2 \times 25 \text{ } \mu\text{l}$ (volumen final de cada reacción).

TAQ polimerasa: El producto como lo vendió el proveedor al laboratorio, trajo una concentración de 5 U/ μl .

Por lo que tenemos según Rahjoo *et al.*, 2008 utilizaron 0,6 U/25 μl , entonces

$0,6 \text{ U}/25 \text{ } \mu\text{l} = 0,024 \text{ U}/\text{ } \mu\text{l}$ luego:

$5 \text{ U}/\text{ } \mu\text{l} \times V_1 = 0,024 \text{ U}/\text{ } \mu\text{l} \times 25 \text{ } \mu\text{l}$ Luego $V_1 = 0,12 \text{ } \mu\text{l}$

H₂O: La cantidad de agua se le agregó por diferencia, con respecto al volumen final de cada reacción (25 μl).

2,5 μl de ADN + 5 μl de Buffer + 1,5 μl MgCl₂ + 2,0 μl dNTPs + 2,0 μl VER1 + 2,0 μl VER2 + 0,12 μl TAQ polimerasa = 15, 12 μl .

Entonces: $25 \text{ } \mu\text{l}$ de $V_f - 15,12 \text{ } \mu\text{l} = 9,88 \text{ } \mu\text{l}$.

Por lo que la cantidad que se le agregó al coctel fue de **9,88 μl H₂O**.

NOTA: Por conveniencia de visualización de los aislados amplificados en la PCR en los geles de agarosa, se procedió a agregar 3 μl de ADN, en vez de 2,5 μl , restándosele entonces 0,5 μl de H₂O y quedando esta cantidad en 9,38 μl .

MARCADORES MOLECULARES: (50 pb y 100pb DNA Step Ladder)

Preparación según indicaciones del fabricante:

Para preparar 8 μl de $V_f = 5 \text{ } \mu\text{l}$ marcador (de 50 y 100 pb) + 1 μl Buffer (del que trae el marcador) + 2 μl de buffer de carga.

La cantidad de marcador de 50 y 100 pb que se necesiten se prepara de acuerdo a esta proporción ejemplo:

Si se requieren preparar 32 μ l, solo tenemos que multiplicar por 4 cada una de las cantidades explicadas según el cálculo según el fabricante:

8 μl V_f =	5 μ l marcador +	1 μ l buffer marcador +	2 μ l buffer de carga
X	x	x	x
4	4	4	4
32 μl V_f =	20 μ l	4 μ l	8 μ l



Fundación Danac

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Fecha:

18-06-13

Rahyoo et al., 2008 y Mulé et al., 2004

Primer: VER 1 y VER 2

Muestras: _____

Programa: Tesis Felix M

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	46	12	58	33	24	10	32	74	23	70	29
B	35	52	73	50	68	(-)						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	µl 1 R	µl 20 R
ADN	10mg/µl	1mg/µl	3 µl	
BUFFER	5x	1x	5 µl	100 µl
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5 µl	30 µl
dNTPs	2,5mM	0,2mM	2 µl	40 µl
PRIMERS R Y F	5µM	0,4µM	2µl+2µl	40µl+40µl
TAQ	5U	0,6U	0,2 µl	2,4 µl
H ₂ O			9,38 µl	187,6 µl
TOTAL			25 µl	500 µl

Cálculos:

Amplifico: Si No

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR 22 µl del coctel y luego 3 µl de ADN = 25 µl. 2^{do} Gel. De los 16 aislados colocados en el gel solo amplificaron 7. Se utilizaron marcadores de 50y 100 pb.

Analista: Felix L. Manrique y Roselia Gallucci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
Felix L. Manrique	18-06-13	Natalia Labrin	18-06-13

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallucci



REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)

Fecha:
19-06-13

Rahjoo et al., 2008 y Muli et al., 2004

Primer: VERA y VER2

Muestras: _____

Programa: Tesis Felix M.

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	4	6	53	48	26	18	72	11	23	60	2
B	34	38	99	56	47	(-)						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	µl 1 R	µl 20 R
ADN	10mg/ml	1mg/ml	3 µl	
BUFFER	5X	1X	5 µl	100 µl
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5 µl	30 µl
dNTPs	2,5mM	0,2mM	2 µl	40 µl
PRIMERS R Y F	5 µM	0,4 µM	2 µl + 2 µl	40 µl + 40 µl
TAQ	5U	0,6U	0,12 µl	2,4 µl
H ₂ O			9,38 µl	187,6 µl
TOTAL			25 µl	500 µl

Cálculos:

Amplifico: Si X No _____

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR 22 µl del coctel y luego 3 µl de ADN = 25 µl. 3^{er} sel. De los 16 aislados colocados en el gel solo amplificaron 5. Se utilizaron marcadores de 50 y 100 pb.

Analista: Felix L. Manrique y Roselia Gallucci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
<u>Felix L. Manrique</u>	<u>19-06-13</u>	<u>Natalia Labrin</u>	<u>19-06-13</u>

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallucci



REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)

Fecha:
20-06-13

Rahjoo et al., 2008 y Mule' et al., 2004

Primer: VER 1 y VER 2

Muestras: _____

Programa: Tesis Felix M

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	35	41	28	13	16	85	19	17	22	5	14
B	21	8	7	9	25	(-)						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	μl 1 R	μl 20 R
ADN	10mg/ml	1mg/ml	3 μl	
BUFFER	5x	1x	5 μl	100 μl
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5 μl	30 μl
dNTPs	2,5mM	0,2mM	2 μl	40 μl
PRIMERS R Y F	5 μM	0,4 μM	2 μl + 2 μl	40 μl + 40 μl
TAQ	5U	0,6 U	0,12 μl	2,4 μl
H2O			9,38 μl	187,6 μl
TOTAL			25 μl	500 μl

Cálculos:

Amplifico: Si No

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR 22 μl del coctel y luego 3 μl de ADN = 25 μl. 4^{to} Gel. De 16 aislados colocados en el gel solo amplificaron 8. Se utilizaron marcadores de 50 y 100 pb.

Analista: Felix L. Manrique y Roselia Gallucci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
<u>Felix Manrique</u>	<u>20-06-13</u>	<u>Natalia Labrin</u>	<u>20-06-13</u>

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallucci



Fundación Danac

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Fecha: 28-06-13

Rahjoo et al., 2008 y Mule et al., 2004

Primer: VER 1 y VER 2

Muestras: _____

Programa: Tesis FELIX M

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	31	37	51	62	64	29	67	65	2	98	63
B	66	69	54	57	75	(-)						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	µl 1 R	µl 20 R
ADN	10 mg/ml	1 mg/ml	3 µl	
BUFFER	5 x	1 x	5 µl	100 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5 µl	30 µl
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	2 µl	40 µl
PRIMERS R Y F	5 µM	0,4 µM	2 µl + 2 µl	40 µl + 40 µl
TAQ	5 U	0,6 U	0,12 µl	2,4 µl
H2O			9,38 µl	187,6 µl
TOTAL			25 µl	500 µl

Cálculos:

Amplifico: Si No

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR 22 µl del coctel
 y luego 3 µl de ADN de cada aislado = 25 µl. 5^{to} Gel.
 De los 16 aislados colocados en el gel solo amplificaron 8.
 Se utilizaron marcadores de 50 y 100 pb.

Analista: Felix L. Mannique y
 Roselia Gallucci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
Felix L. Mannique	28-06-13	Natalia Labini	28-06-13

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallucci



REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Fecha: 02-07-13

Rahjoo et al., 2008 y Mele' et al., 2004

Primer: VER 1 y VER 2

Muestras: _____

Programa: Tesis Felix M.

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	60	34	47	38	26	41	28	13	16	85	17
B	5	7	(-)									
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	µl 1 R	µl 18 R
ADN	10mg/ul	1mg/ul	3 µl	
BUFFER	5X	1X	5 µl	90 µl
MgCl ₂	25mM	1,5mM	1,5 µl	27 µl
dNTPs	2,5mM	0,2mM	2 µl	36 µl
PRIMERS R Y F	5µM	0,4µM	2µl+2µl	36µl+36µl
TAQ	5U	0,6U	0,12 µl	2,16 µl
H2O			9,38 µl	168,84 µl
TOTAL			25 µl	450 µl

Cálculos:

Amplifico: Si No

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR, 22 µl del coctel y luego 3 µl de ADN de cada aislado = 25 µl. 670 Gel

De 13 aislados colocados en el gel amplificaron 12. Se utilizaron marcadores de 50 y 100 pb.

Analista: Felix L. Manrique y
Roselia Gallicci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
Felix L. Manrique	02-07-13	Natalia Labrun	02-07-13

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallicci



REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)

Fecha:
08-07-13

Rahjoo et al, 2008 y Mule' et al, 2004

Primer: VER 1 y VER 2

Muestras: _____

Programa: TESIS FELIX M

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	58	29	20	31	37	53	54	55	57	62	63
B	91	75	(-)									
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	µl 1 R	µl 2OR
ADN	10 mg/µl	1 mg/µl	3 µl	
BUFFER	5 X	1 X	5 µl	100 µl
MgCl	25 mM	1,5 mM	1,5 µl	30 µl
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	2 µl	40 µl
PRIMERS R Y F	5 µl	0,4 µM	2 µl + 2 µl	40 µl + 40 µl
TAQ	5 U	0,6 U	0,12 µl	2,4 µl
H2O			9,38 µl	187,6 µl
TOTAL			25 µl	500 µl

Cálculos:

Amplifico: Si No

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR 22 µl del coctel
y luego 3 µl de ADN = 25 µl. 7^{mo} Gel. Amplificaron todos
los aislados. Se utilizaron marcadores de 50 y 100 pb.

Analista: Felix Manrique y
Roselia Gallucci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
Felix L. Manrique	08-07-13	Natalia Labán	08-07-13

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallucci



REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)

Fecha:
11-08-13

Rahjoo et al., 2008 y Meli et al., 2004

Primer: VER1 y VER2

Muestras: _____

Programa: TESIS FELIX

Temperatura: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	52	3	27	38	39	30	64	23	73	50	68
B	48	18	72	11	32	(-)						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

CONDICIONES:

REACTIVOS	[] STOCK	[] FINAL	µl 1 R	µl 20R
ADN	10mg/ul	1mg/ul	3 µl	
BUFFER	5X	1X	5 µl	100 µl
MgCl	25mM	1,5mM	1,5 µl	30 µl
dNTPs	2,5mM	0,2mM	2 µl	40 µl
PRIMERS R Y F	5 µM	0,4 µM	2 µl + 2 µl	40 µl + 40 µl
TAQ	5 U	0,6 U	0,12 µl	2,4 µl
H2O			25 µl	187,6 µl
TOTAL				500 µl

Cálculos:

Amplifico: Si No

Observaciones:

Colocar en cada tubo de PCR 22 µl del coctel y luego 3 µl de ADN = 25 µl 8^{vo} Gel. Amplificaron todos los aislados excepto el N° 7 (FG4). Se utilizaron marcadores de 50 y 100 pb.

Analista: Felix Marrigue y
Roselia Gallucci

Elaborado por:	Fecha:	Revisado por:	Fecha:
Felix L. Marrigue	11-08-13	Natalia Labrim	11-08-13

"LA VERSIÓN IMPRESA DE ESTE DOCUMENTO DEBE COINCIDIR CON LO PUBLICADO EN EL SISTEMA"

Roselia Gallucci.