

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Evaluación de la Producción *in vitro* de Beauvericina por
Especies de Hongos del Género *Fusarium* Aislado de Maíz
(*Zea mays*) Cultivado en la Costa de Hermosillo



TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Q.B. Alejandra Valenzuela Iglesias

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Importancia del Maíz.....	5
Generalidades de los Hongos.....	6
Micología de los Granos.....	7
Características de <i>Fusarium</i>	9
Identificación de las Especies de <i>Fusarium</i>	10
Principales Especies de <i>Fusarium</i> que Colonizan el Maíz.....	17
Micotoxinas Producidas por <i>Fusarium</i>	25
Fumonisinias.....	25
Tricotecenos.....	27
Zearalenona.....	28
Moniliformina.....	32
Beauvericina.....	33
Métodos de Detección para Beauvericina.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Obtención de las Muestras.....	42
Manejo, Preparación y Determinación de Humedad de las Muestras.....	43
Porcentaje de Invasión por Hongos.....	43
Aislamiento e Identificación de Especies del Género <i>Fusarium</i>	44
Producción de Beauvericina.....	45
Extracción de la Toxina.....	45
Cuantificación de la Toxina.....	46
Prueba de Recuperación.....	47

Análisis Estadístico.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
Contenido de Humedad.....	49
Porcentaje de Invasión por Hongos.....	51
Porcentaje de Invasión por Hongos del Género <i>Fusarium</i>	55
Contenido de Beauvericina.....	57
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS.....	68
ANEXO I.....	77
ANEXO II.....	82
ANEXO III.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Promedio Mensual de Temperatura Máxima y Mínima y Precipitación Pluvial de Hermosillo de Agosto a Diciembre de 2006.....	50
2. Concentraciones Promedio de Beauvericina Obtenidos por HPLC.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructuras de Macroconidios de <i>Fusarium</i>	12
2 Estructuras de Microconidios de <i>Fusarium</i>	13
3 Estructuras de Clamidoporas de <i>Fusarium</i>	15
4 Pigmentación de <i>Fusarium</i> en PDA.....	16
5 Macroconidios y Microconidios de <i>Fusarium verticillioides</i>	19
6 Macroconidios y Microconidios de <i>Fusarium proliferatum</i>	21
7 Macroconidios y Microconidios de <i>Fusarium subglutinans</i>	23
8 Macroconidios y Microconidios de <i>Fusarium oxysporum</i>	24
9 Estructura de Fumonisina B ₁	26
10 Estructura de Desoxinivalenol o Vomitoxina (tipo B).....	29
11 Estructura de Toxina T-2 (tipo A).....	30
12 Estructura de Zearalenona.....	31
13 Estructura de Moniliformina.....	34
14 Estructura de Beauvericina.....	35
15 Porcentaje de Invasión por Hongos por Género.....	52
16 Porcentaje de Invasión por Hongos del Género <i>Fusarium</i>	56
17 Curva Estándar de Beauvericina.....	58
18 Espectros de UV de Estándar de BEA y un Extracto Productor de BEA.....	59
19 Cromatogramas de Cepas Productoras de BEA.....	60
20 Tiempo de Retención del Estándar de Beauvericina.....	64

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de hongos productores de beauvericina y la evaluación de la producción *in vitro* de esta toxina. Para poder cumplir este objetivo se analizaron 60 muestras de maíz cultivado en la costa de Hermosillo durante el mes de diciembre de 2006.

Las muestras se desgranaron manualmente y se les determinó el contenido de humedad. Posteriormente se realizó un análisis de invasión por hongos, utilizando placas de Petri con agar malta sal al 4% e incubándolas 7 días a 25° C. Las colonias desarrolladas se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se identificó su género con base en sus características macro y microscópicas.

Las colonias del género *Fusarium* se transfirieron a agar hoja de clavel y se incubaron 7 días a 25° C bajo un fotoperíodo de luz blanca y oscuridad. Con el fin de obtener cultivos puros, se realizó posteriormente un cultivo de una sola espora para cada muestra de *Fusarium*, utilizando placas de Petri con agar agua al 3%. El cultivo se incubó durante 1 día a 25° C. El medio se observó al microscopio y se tomó una sola espora, la cual fue transferida a tubos de agar papa dextrosa y se incubó durante 7 días a 25° C. Para la identificación de las especies de *Fusarium*, las colonias desarrolladas se transfirieron a agar papa dextrosa, agar Spezieller Nährstoffarmer y agar hoja de clavel y fueron incubados 7 días a 25° C, bajo un fotoperíodo de luz blanca y oscuridad. La identificación de las especies se basó en las características macro y microscópicas de cada especie.

Para probar la producción *in vitro* de beauvericina, se inocularon muestras de maíz estériles con las cepas de *Fusarium* identificadas y se incubaron durante 4 semanas a 25° C.

Se encontró un grado de invasión total de las muestras de 24%, representado por los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y otros hongos de campo. Del género *Fusarium* se encontraron las especies de *F. verticillioides* (54%), *F. proliferatum* (42%), *F. subglutinans* (2%) y *F. oxysporum* (2%). Estos resultados coinciden con estudios anteriores realizados en la región, así como estudios a nivel mundial en donde se confirma la presencia de estas especies como patógenos del maíz.

La presencia de beauvericina en los cultivos fue determinada mediante un análisis de cromatografía líquida de alta resolución de los extractos, detectándose cantidades entre 4.74 a 239.11 µg/g de beauvericina en el 7.2% de las muestras analizadas.

INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos utilizados por el hombre es un tema cada vez más importante. Muchos tipos de contaminantes pueden estar presentes en prácticamente todos los alimentos, incluyendo a los granos y sus derivados, entre ellos el maíz.

El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial, ya sea como alimento humano, alimento para ganado o en un gran número de productos industriales como son: tortillas, harinas, totopos, palomitas, entre otros. El maíz es atacado por diversos hongos, debido a que los altos niveles de humedad que se presentan en el campo permiten la invasión durante las primeras etapas de desarrollo de la planta (Ramírez, 2000). Esto causa enfermedades que generan una reducción en su rendimiento. Además, pueden afectar la salud del hombre y animales domésticos debido a la producción de micotoxinas.

Los hongos del género *Fusarium* son los principales responsables de causar daños al maíz como pudrición de raíz, tallo, mazorca y/o grano, además de ser productores de toxinas, entre ellas la beauvericina (Leslie y col., 2003).

La beauvericina (BEA), es una de la micotoxinas producidas por las especies de *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* y *F. oxysporum*, entre otras especies, las cuales han sido aisladas principalmente del maíz, aunque también de otros sustratos como espárrago, papa, soya, uva, trigo y arroz, entre otros (Thakur y Smith, 1997; Logrieco y col., 1998).

Se han realizado estudios en donde se demuestra que esta toxina posee actividad insecticida y toxicidad contra *Artemia salina* (Champlin y Grula, 1979). Posee también actividad antibiótica contra ciertos hongos, bacterias gram positivas y micobacterias (Hamill y col., 1969; Ovchinnikov y col., 1971). En estudios realizados en microsomas de hígado de rata se ha encontrado que es un inhibidor específico de la enzima colesterol aciltransferasa y puede afectar la respuesta inmune, suprimiendo la proliferación e induciendo apoptosis de los linfocitos de la sangre periférica en pavos (Tomoda y col., 1992; Dombrink- Kurtzman, 2003).

Sin embargo, hay publicaciones en donde se ha señalado que BEA posee actividad antitumoral, causando apoptosis en varias células cancerígenas humanas, además de tener un efecto sinérgico con ciertos antibióticos, aumentando su actividad contra ciertos hongos (Calo y col., 2004; Chen y col., 2006; Zhan y col., 2007; Zhang y col., 2007).

Es importante conocer la producción de beauvericina por especies de *Fusarium* aislados de maíz cultivado en la costa de Hermosillo, ya que aún no se conocen los efectos que puede tener en la salud humana y animal la entrada de esta micotoxina en la cadena alimenticia. Sin embargo se conoce que puede afectar la respuesta inmune, inhibir la actividad de ciertas enzimas y afectar los músculos papilares del corazón en animales de experimentación. Además, el efecto sinérgico que posee al coexistir con otras micotoxinas aumenta el riesgo toxicológico para la salud humana y animal.

Debido a que en el estado de Sonora se encuentran zonas en donde el desarrollo de especies de *Fusarium* es favorable, se considera necesario realizar

estudios que demuestren que estas especies son productoras de beauvericina y poder generar así información que sirva de base para futuras investigaciones.

La hipótesis de trabajo, que sirvió de base a este estudio, es que las especies de *Fusarium* que se han encontrado contaminando el maíz en la región de la costa de Hermosillo se han reportado como productoras de BEA, por lo que podrán producirla.

OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer si cepas de *Fusarium* aisladas de maíz cultivado en la región de la costa de Hermosillo producen beauvericina en condiciones *in vitro*.

Objetivos Específicos

1. Determinar el porcentaje de invasión por hongos e identificar los géneros de hongos presentes en las muestras de maíz recolectadas en la costa de Hermosillo.
2. Aislar e identificar las especies de *Fusarium* que se encuentran presentes contaminando los granos de maíz.
3. Evaluar la producción *in vitro* de beauvericina mediante el cultivo de las cepas de *Fusarium* aisladas y el análisis de la toxina en los cultivos, usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

ANTECEDENTES

Importancia del Maíz

El maíz (*Zea mays*) es el único cereal importante nativo del hemisferio occidental. Originario de México, se extendió al norte, hasta Canadá y al sur hasta Argentina. Después del descubrimiento de América, se distribuyó rápidamente a Europa, Asia y África (González, 1995). Botánicamente, el maíz pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta, dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. Las panojas son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1,000 granos (FAO, 1993).

El maíz, es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, ya que suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales. Es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se produce almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y combustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con éxito en las industrias lácteas y cárnicas y tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, se utilizan como forraje. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos (FAO, 1993).

En México, el cultivo de maíz ocupa el primer lugar seguido del trigo y el sorgo. En el año 2005 se tuvo una producción nacional de 20,841,194 Ton (SAGARPA, 2005), mientras que en el 2006 la producción nacional aumentó a 21,764,652 Ton (FAOSTAT, 2007). A nivel mundial según datos reportados por la USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos) en su revisión de las cifras 2006/2007, se observó un incremento de las existencias finales de Estados Unidos de 1,52 millones de Ton, al pasar de 22,28 a 23,80 millones de Ton. La cifra quedó por encima de los 22,30 millones de Ton esperados por el mercado. China obtuvo 143 millones de Ton, mientras que no hubo modificaciones en las cifras de producción de Brasil y Argentina, cuyas cosechas volvieron a ser estimadas por la USDA en 49,50 y 22 millones de Ton, respectivamente. A nivel mundial, la cosecha se proyectó en 697,72 millones de Ton y las existencias en 93,20 millones de Ton, por encima de los 695,85 y los 91,82 millones de Ton del reporte anterior (USDA, 2007).

Generalidades de los Hongos

Los hongos pertenecen al reino *Fungi*, el cual comprende alrededor de 10,000 especies conocidas. El término hongo incluye a los organismos eucarióticos y heterótrofos, productores de esporas, no poseen clorofila y que pueden reproducirse sexual o asexualmente (Prescott y col., 1990). La mayoría de los hongos están constituidos por estructuras tubulares llamadas hifas, las cuales en algunas especies se mantienen sencillas, formando lo que se conoce como micelio

y en otras se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad, como lo son en las llamadas setas u hongos superiores (Moreno, 1988). Los hongos pueden reproducirse a partir de estructuras vegetativas, como es un trozo de micelio, pero se reproducen principalmente por medio de esporas asexuales. Algunos hongos también producen esporas sexuales, a estos se les denomina perfectos o teleomorfos, los cuales se dividen en *Oomycetes* y *Zygomycetes* si no son septados, o bien *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* si son septados, a diferencia de los hongos imperfectos o anamorfos, *Fungi Imperfecti*, los cuales sólo poseen esporas asexuales (Frazier y Westhoff, 1993; Hernández y García, 1998).

Los hongos tienen una influencia directa sobre el bienestar del hombre, ya que algunos son benéficos (antibióticos, fermentaciones industriales y de alimentos, entre otros), otros juegan un papel importante en la naturaleza como degradadores de materia orgánica, pero por otra parte, los hongos son la principal causa de enfermedades de los cultivos agrícolas, causando deterioro y producción de micotoxinas (Moreno, 1988; Frazier y Westhoff, 1993).

Micología de los Granos

Todos los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando severas pérdidas económicas al reducir el potencial de producción de los cultivos infectados (Moreno, 1988). La

FAO estima que en el mundo se pierde el 25% de los cultivos obtenidos por contaminación fúngica (Molina, 2003).

Dentro de la microflora de los granos también se pueden presentar bacterias contaminantes pertenecientes a las familias *Pseudomonadacea*, *Micrococaceae*, *Lactobacillaceae* y *Bacillaceae*, pero el efecto deteriorativo que éstas causan se ve desplazado por la fuerza de propagación característica de los hongos, la cual les permite competir y dominar rápidamente (Álvarez y col., 1988).

Los hongos se reproducen a través de esporas y su tamaño tan pequeño es lo que permite que puedan dispersarse fácilmente. Pueden hacerlo a través del viento y así pasar de un campo a otro, o pueden transportarse a través de insectos y aves de una planta a otra. El uso de transportes y equipos contaminados con esporas es otra forma de dispersión de los hongos (USDA, 1999).

La invasión por hongos es más alta en regiones o estaciones donde se cosecha con climas húmedos y más baja en regiones o estaciones donde se cosecha con clima seco (Christensen y Kaufmann, 1976).

Los principales géneros de hongos que invaden los granos en el campo son *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Fusarium*. Los granos también pueden ser invadidos durante el almacenamiento por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Christensen y Kaufmann, 1969).

La principal diferencia entre los hongos de campo y los hongos de almacén son los requerimientos de humedad necesarios para su desarrollo. Los hongos de campo requieren de humedades relativas de 90 a 100%, mientras que los hongos

de almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90%, siendo estas últimas muy frecuentes en el almacenamiento de granos (Moreno, 1988).

Las condiciones de humedad por sí solas no promueven el desarrollo de los hongos, esto solamente ocurre cuando todas las condiciones son adecuadas (temperatura, luz, alimento) para que inicie el ciclo de desarrollo. Si una de estas condiciones óptimas es removida el desarrollo del hongo se detiene (USDA, 1999).

El maíz es uno de los tantos cultivos atacados por diversos hongos, bacterias, roedores, aves e insectos que merman su calidad. Estos últimos actúan como agentes de diseminación de la micobiota, contribuyendo al crecimiento y multiplicación de los hongos, ya que el metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad de los granos y la ruptura del pericarpio permite la entrada de los patógenos. Los hongos del género *Fusarium* sección *Liseola*, se destacan como los responsables de daños en el maíz, como pudrición de raíz, tallo, mazorca y/o grano (Leslie y col., 2003, Rosas y col., 2006).

Características de *Fusarium*

El género *Fusarium* se introdujo por primera vez en 1809 por el director del Jardín Botánico de Berlín, Johann H. F. Link y es en la actualidad el género con mayor número de especies patógenas en plantas (Desjardins, 2006; Leslie y col., 2006). Este género está clasificado en la subdivisión Deuteromicotina, clase Hyphomycetes, orden *Hyphates* (Gil, 2003; Molina, 2003). Los hongos de este género son conocidos por ser los mayores causantes de enfermedades en las

plantas, como marchitamiento vascular, putrefacción de la planta, invasión pre y post cosecha, entre muchos otros (Pitt y Hocking, 1985; Leslie y col., 2003). Las especies de *Fusarium* se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, especialmente en los cultivados y es la mayor causa de putrefacción de frutas y vegetales almacenados, aunque se le ha asociado comúnmente con cereales y leguminosas, en donde generalmente invaden antes de la cosecha (Pitt y Hocking, 1985; Álvarez y col., 1988).

Un gran número de especies de *Fusarium* poseen el estado sexual teleomorfo. En la actualidad existen tres géneros de teleomorfos: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. De éstos *Gibberella* es el más común, ya que la mayoría de las especies de *Fusarium* se encuentran dentro de este género teleomorfo que incluye a los patógenos más importantes, entre ellos, *Gibberella zea* (*Fusarium graminearum*), *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*) y el resto de las especies de *Gibberella fujikuroi* (Leslie y col., 2006).

Identificación de las Especies de *Fusarium*

Las características morfológicas son las más utilizadas en la identificación de las especies de *Fusarium*. Algunos cultivos se degeneran rápidamente, después de una o dos transferencias. Por esta razón es importante identificar a *Fusarium* lo antes posible y siempre utilizar cultivos puros para la identificación. Éstos se inician por lo general de un solo conidio germinado, siempre y cuando las condiciones de crecimiento hayan sido las adecuadas y estándar (medios de cultivo, temperatura,

luz, humedad y que el cultivo provenga de una sola espora) (Pitt y Hocking, 1985; Leslie y col., 2003; Leslie y col., 2006).

Macroconidios. Es la característica más importante para la identificación de *Fusarium*, se recomienda el uso de medios de cultivo pobres en nutrientes, en especial el agar hoja de clavel (CLA), ya que los macroconidios que proporciona son muy constantes en tamaño y forma (Doyle y col., 2001; Leslie y col., 2006). Pueden ser producidos en discretas masas de conidióforos o encontrarse en el agar. Los macroconidios son curvos, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y una célula basal en forma de pie (Figura 1) (Carrillo, 2003). La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium*, pero varios géneros de *Coelomycetes* también la tienen (Carrillo, 2003).

Microconidios. Estas esporas nacen de una célula conidiógena y el arreglo que tienen en esta célula es una característica muy importante (Leslie y col., 2006). Los microconidios son comúnmente ovales, obovoides, forma de riñón, pera, nabo o globo, con una base redondeada o truncada (Figura 2) (Carrillo, 2003). El número de septas que poseen comúnmente es de 0 a 1, aunque hay algunas especies que pueden presentar hasta 2 septas (Pitt y Hocking, 1985; Leslie y col., 2006). Las células conidiógenas pueden ser de dos tipos: monofálides y polifálides. Las monofálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Carrillo, 2003). El arreglo de los microconidios puede ser en fíalide, cadenas (cortas o largas) o falsas cabezas. Las especies de *Fusarium* no producen conidióforos con cabezas

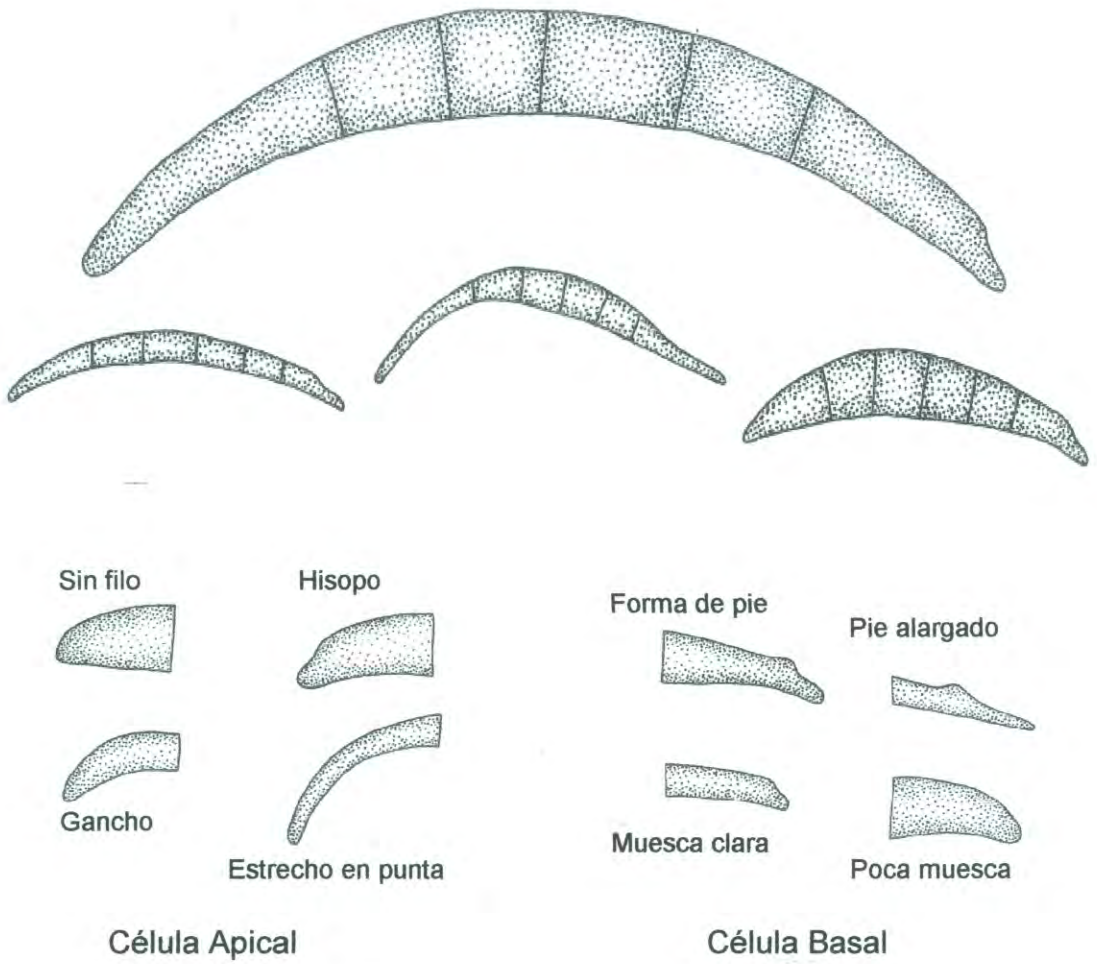


Figura 1. Estructuras de Macroconidios de *Fusarium*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

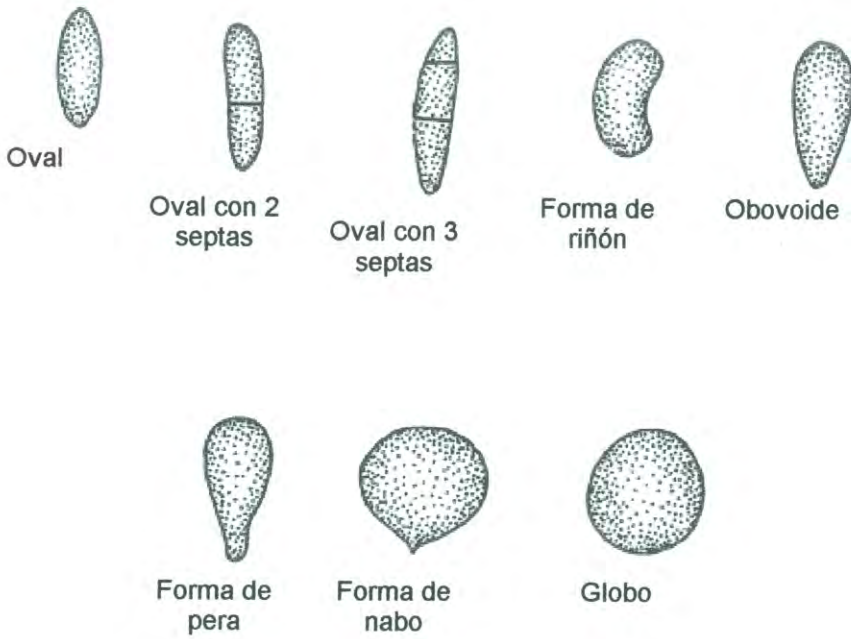


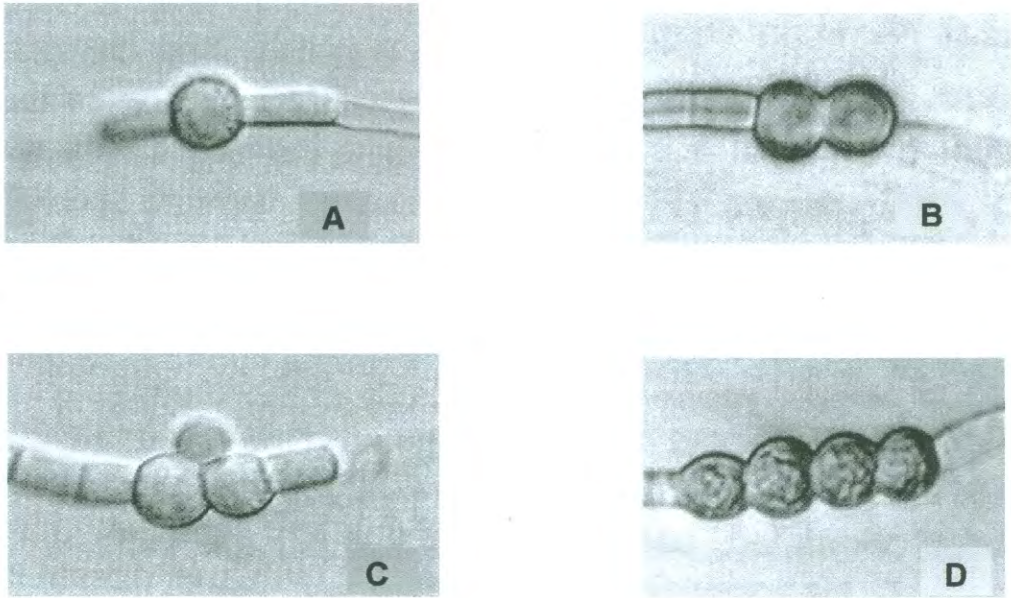
Figura 2. Estructuras de Microconidios de *Fusarium*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

verdaderas como los que producen otras especies de hongos, por ejemplo: *Aspergillus* (Leslie y col., 2006).

Clamidosporas. Se considera una característica muy importante en la identificación de varias especies de *Fusarium*. Pueden encontrarse solas, dobles, en grupos o cadenas (Figura 3). El tiempo de formación es largo (6 semanas o más) y pueden no ser producidas en gran cantidad. El medio de cultivo más utilizado para la formación de clamidosporas es el Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), y éstas pueden formarse en el micelio aéreo o encontrarse en el agar (Leslie y col., 2006).

Pigmentación del medio. El medio de cultivo y las condiciones de crecimiento son muy importantes para la producción de pigmentos. El medio más utilizado para este propósito es el agar Papa Dextrosa (PDA), y se recomienda utilizar un fotoperíodo de 12:12 horas de luz blanca y oscuridad (Doyle y col., 2001; Leslie y col., 2006). Las colonias desarrolladas presentan diversos colores (rojo, café, violeta, anaranjado, amarillo, gris y blanco), especialmente en el reverso de la colonia (Figura 4). El micelio es ralo o denso, algodonoso y en algunos casos limoso. Los pigmentos que se difunden en el agar suelen variar de color con el pH (Carrillo, 2003).

En algunas ocasiones las características morfológicas no son suficientes para una identificación adecuada, por lo que existen dos estudios que son utilizados para ello, uno es la fertilidad cruzada de sexos y el segundo es el análisis de secuencias de ADN.



A) Clamidosporas solas; B) Clamidosporas en pares; C) Clamidosporas en grupo; D) Clamidosporas en cadenas

Figura 3. Estructuras de Clamidosporas de *Fusarium*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

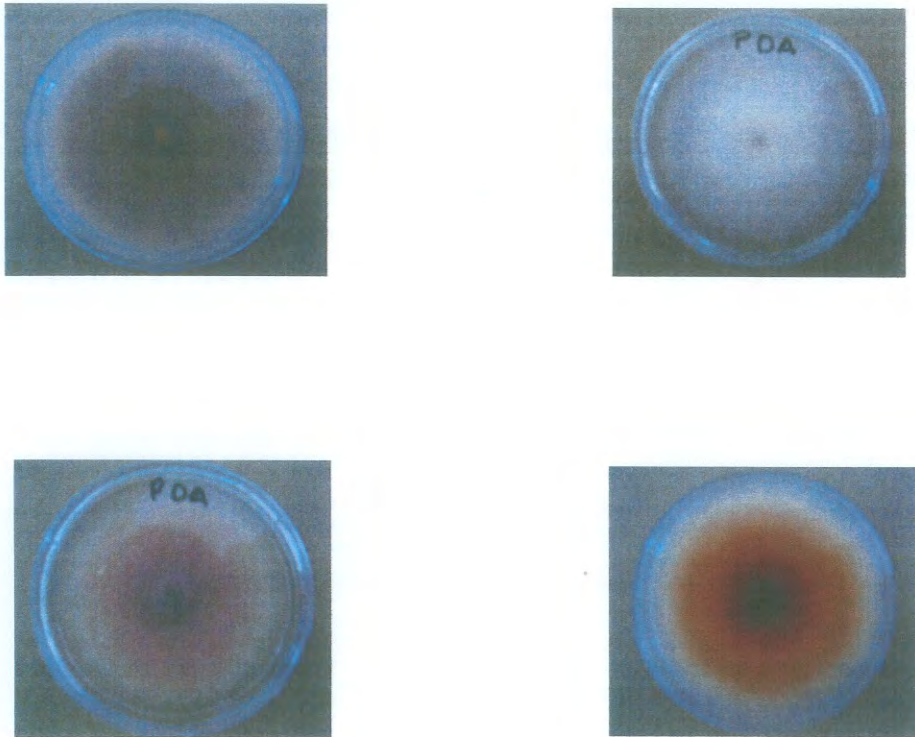


Figura 4. Pigmentación de *Fusarium* en PDA.

Fertilidad- cruzada de sexos. Se refiere a la habilidad de cruzar y hacer producir el estado teleomorfo a estándares de especies definidas. La mayoría de estos análisis se han realizado con especies del grupo *Gibberella fujikuroi*. Los análisis se realizan cruzando una especie desconocida, la cual es tomada como la pareja masculina, con un estándar de especie conocida (pareja femenina). El procedimiento es sencillo, la cepa femenina es sembrada en agar zanahoria, y se deja colonizar el plato por una semana antes de ser inoculada con una suspensión que contiene la espora masculina. Después de la fertilización el cultivo se incuba de 4 a 6 semanas en una incubadora con luz, a 25° C. Una vez transcurrido este tiempo, aquellos cultivos que hayan formado peritecios se toman como cruces positivos (Leslie y col., 2003; Leslie y col., 2006).

Análisis de secuencias de ADN. Muchas de estas técnicas utilizan enzimas de restricción de ADN para obtener la secuencia de genes apropiados para identificar y distinguir especies que son morfológicamente inseparables. En este proceso uno o más genes son amplificados y secuenciados. El resultado de las secuencias de ADN es comparado con secuencias similares de especies relacionadas. Las limitaciones de este análisis son los altos costos y la disponibilidad de datos de secuencias para realizar las comparaciones en un banco de datos accesible (Leslie y col., 2003; Leslie y col., 2006).

Principales Especies de *Fusarium* que Colonizan el Maíz

***Fusarium verticillioides* (Sección *Liseola*).** Su estado sexual es *Gibberella moniliformis*. El crecimiento en PDA comienza con un micelio de color blanco, que

con el tiempo adopta un tono violeta, aunque la pigmentación en el medio puede variar de blanco a gris, anaranjado a gris-violeta, entre otros. Sus macroconidios son alargados y delgados, con una célula apical curva y una célula basal en forma de pie y de 3 a 5 septas. La abundancia de sus macroconidios varía según la cepa, pero generalmente son difíciles de encontrar. Los microconidios son generalmente ovales sin septas, se presentan en cadenas largas y en monofálides, ocasionalmente se presentan en pares dando una apariencia de “orejas de conejo” (Figura 5). No producen clamidosporas. Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y se le ha asociado particularmente al maíz, en donde causa putrefacción del tallo y mazorca, ocasionando grandes pérdidas económicas y reducción de la calidad del grano. Ha sido encontrado también en otras plantas como plátanos en las Islas Canarias y América, arroz de Nepal, sorgo en Estados Unidos y África, y del teocintle, que es una especie de *Zea* salvaje nativa de Mesoamérica. *F. verticillioides* ha causado epidemias destructivas del maíz en África, Asia, Europa, Norte América y Sudamérica. Es productor de diferentes micotoxinas como fumonisinas, fusarinas, ácido fusárico y trazas de beauvericina y moniliformina (Kedera, 1994; Pitt y Hocking, 1999; Doyle y col., 2001; Gil, 2003; Suárez, 2005; Desjardins, 2006; Leslie y col., 2006).

***Fusarium proliferatum* (Sección *Liseola*).** Su estado sexual es *Gibberella intermedia*. El crecimiento en PDA comienza con un micelio algodonoso de color blanco, que se torna de un color violeta con la edad. El color del medio puede tomar un tono blanco hasta anaranjado oscuro, violeta oscuro o casi negro. Los

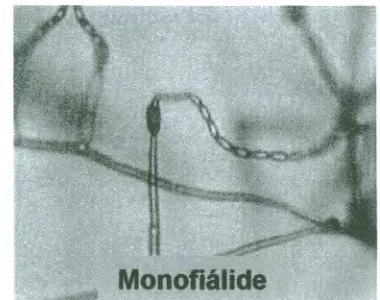
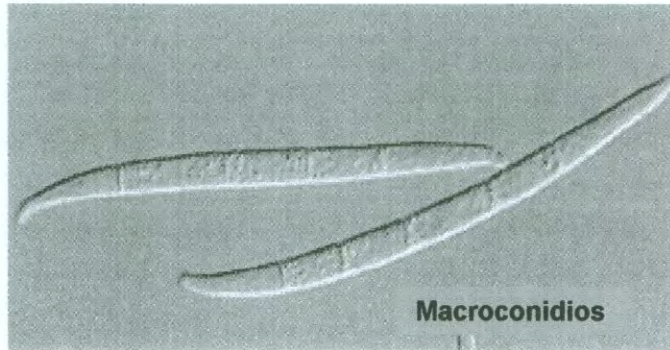


Figura 5. Macroconidios y Microconidios de *Fusarium verticillioides*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

macroconidios son delgados, relativamente rectos y más pequeños que los producidos por *F. verticillioides*, usualmente poseen de 3 a 5 septas. La célula apical es curva y la célula basal es poco desarrollada. La abundancia varía, ya que ésta característica puede perderse tras resiembras repetidas. Sus microconidios son ovales u obovoides y no son septados. Se encuentran en cadenas moderadamente largas y falsas cabezas en monofiálides y polifiálides. No posee clamidosporas (Figura 6).

Tiene un amplio rango de plantas huésped, causando enfermedades y pérdidas económicas importantes en espárrago, plátano, ajo, mango, maíz, dátil, higo, pino, arroz, sorgo y trigo. Ha sido identificado como un colonizador del maíz a través del mundo, y uno de los responsables de la putrefacción de esta planta en Europa. Es productor de fumonisinas, moniliformina, fusarinas, ácido giberélico, beauvericina y fusaproliferina (Pitt y Hocking, 1999; Doyle y col., 2001; Molina, 2003; Desjardins, 2006; Leslie y col., 2006).

***Fusarium subglutinans* (Sección *Liseola*).** Su estado sexual es *Gibberella subglutinans*. Su crecimiento en PDA es abundante y comienza con un micelio algodonoso de color blanco, que con el tiempo cambia a violeta. La pigmentación en el agar varía de blanco a un violeta oscuro casi negro, pero la mayoría produce un pigmento violeta. Sus macroconidios son relativamente delgados, poco curvos y generalmente de 3 septas. Los microconidios son ovales y sin septas, aunque pueden encontrarse microconidios más largos con 2 a 3 septas, que al parecer son una transición de microconidios a macroconidios. Se presentan en falsas cabezas y

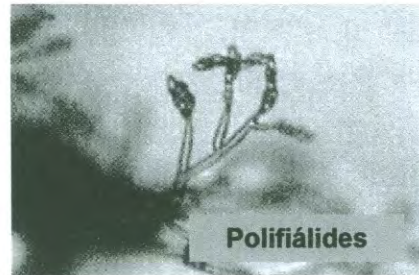
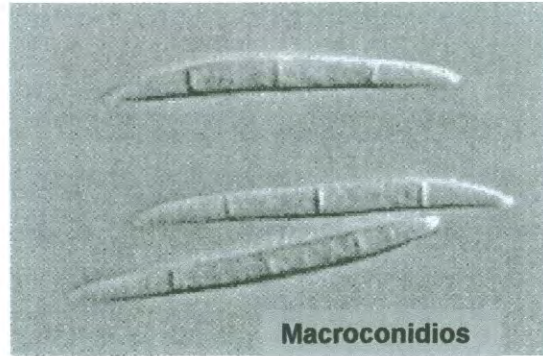


Figura 6. Macroconidios y Microconidios de *Fusarium proliferatum*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

no en cadenas, tienen mono y polifialides, aunque las polifialides son más abundantes. No produce clamidosporas (Figura 7). Desde 1930 se le identificó como un patógeno del maíz y un componente importante en la putrefacción de ésta planta en Australia y Estados Unidos. Posteriormente se ha encontrado en países como Sudáfrica, Canadá, Perú, Italia, Polonia y Austria, entre otros. Produce diversas micotoxinas como moniliformina, beauvericina, ácido fusárico, bajos niveles de fumonisinas y altos niveles de fusaproliferinas (Logrieco y col., 1993 b; Krska y col., 1996; Logrieco y col., 1996; Pitt y Hocking, 1999; Doyle y col., 2001; Desjardins, 2006; Leslie y col., 2006).

***Fusarium oxysporum* (Sección *Elegans*).** No se conoce su estado sexual. El crecimiento en PDA varía desde poco a abundante y presenta un color de blanco a violeta. La longitud de sus macroconidios es corta a media, rectos, relativamente delgados y generalmente con 3 septas. La célula apical es curva y la célula basal es en forma de pie. Sus microconidios son ovales, elípticos o en forma de riñón y normalmente no son septados. Se presentan en falsas cabezas y monofialides cortas. Forma clamidosporas en un lapso de 2 a 4 semanas, aunque algunas cepas pueden requerir más tiempo. Generalmente se forman solas o en pares, aunque se pueden encontrar en racimos o cadenas (Figura 8). Es un saprófito del suelo y se le ha encontrado en las raíces y semillas de una gran variedad de plantas como plátano, algodón, tomate, maíz y leguminosas. Es productor de diferentes micotoxinas, entre ellas zearalenona, tricotecenos, beauvericina, eniانتinas, ácido

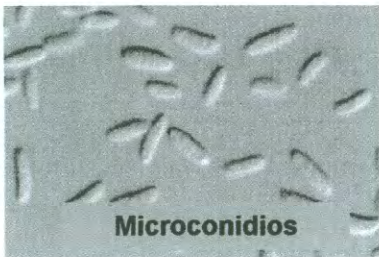
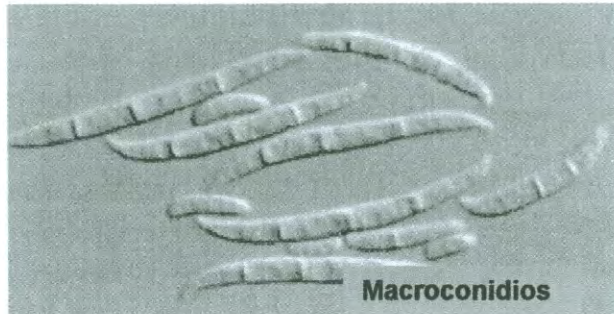


Figura 7. Macroconidios y Microconidios de *Fusarium subglutinans*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

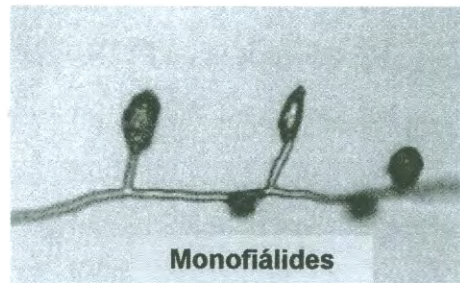
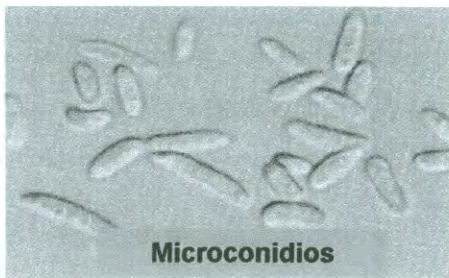
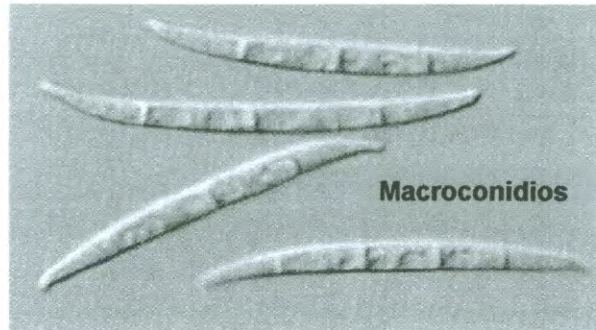


Figura 8. Macroconidios y Microconidios de *Fusarium oxysporum*.
Fuente: Leslie y col., 2006.

fusárico, fusarina C, moniliformina y algunas cepas pueden producir fumonisinas (Chelkowski, 1989; Pitt y Hocking, 1999; Leslie y col., 2003; Leslie y col., 2006).

Micotoxinas Producidas por *Fusarium*

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por hongos que crecen o se multiplican en los alimentos. Las micotoxicosis son enfermedades inducidas por estas toxinas en los animales y en el hombre. Los hongos del género *Fusarium* tienen la capacidad de producir diferentes micotoxinas como son fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, moniliforminas, ácido fusárico, beauvericina, fusaproliferinas, fusarinas, ácido giberélico, entre otras, las cuales representan un peligro a la salud humana y animal (Moreno, 1988; Fotso y col., 2002). A continuación se señalan las micotoxinas de *Fusarium* de mayor importancia.

Fumonisinias

Son una familia de micotoxinas descubiertas en 1988 a partir de cepas de *F. moniliforme* (ahora *F. verticillioides*), aunque el número de especies productoras ha aumentado a partir de esa fecha (*F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. sacchari* y *F. nygamai* entre otras) (Rheeder y col., 2002). Se conocen 28 análogos de fumonisinas de los cuales solamente la FB₁, FB₂ y FB₃ son producidas en suficiente cantidad, siendo la FB₁ la más abundante y tóxica en la naturaleza. Las fumonisinas han sido encontradas en maíz y en sus derivados. La diferencia entre ellas se basa en el grado de hidroxilación de la cadena hidrocarbonada (Figura 9) (Edrington y col., 1995; Melcion y col., 1997).

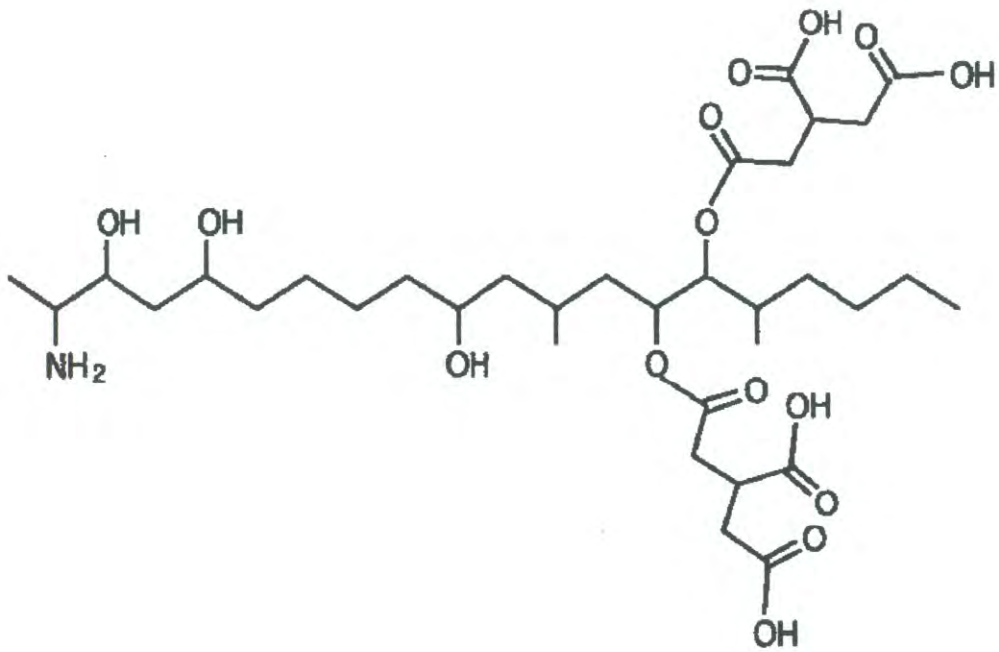


Figura 9. Estructura de Fumonisina B₁.
Fuente: Carrillo, 2003.

Las fumonisinas causan varias enfermedades en animales, como edema pulmonar porcino, leucoencefalomalacia equina, cáncer de hígado y riñón en roedores (Humpf y col., 1998; Shephard y col., 1999; Caldas y Silva, 2007). Las fumonisinas no son reactivas al ADN, pero el daño al hígado y riñones es un prerrequisito para el cáncer. Son inhibidores de la enzima ceramida sintetasa, clave en la síntesis de esfingolípidos. Su toxicidad y carcinogenicidad se encuentra estrechamente relacionada con la interrupción del metabolismo de esfingolípidos (Munkvold y Desjardins, 1997; Palencia y col., 2003). La presencia de *F. verticillioides* y grandes cantidades de FB₁ y FB₂ han sido asociados a cáncer esofágico humano (Melcion y col., 1997). En 1993, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer las colocó en el grupo de carcinogénicos categoría 2B (Rheeder y col., 2002). En el 2002 el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios FAO/WHO estableció el límite máximo de consumo permisible diario de 2 µg/kg de peso corporal de FB₁, FB₂ y FB₃ solas o en conjunto (Marasas y col., 2004).

Tricotecenos

Constituyen una familia de micotoxinas estructuralmente relacionada, producidas por muchas especies de *Fusarium* y hongos relacionados (*Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*). Son tóxicos potentes de las células eucarióticas y causan lesiones dérmicas, diarreas, vómitos, hemorragias, problemas reproductivos, alteraciones de

la respuesta inmune e inhibición de la síntesis de macromoléculas (Betina, 1989; Abramson y col., 2001; Edwards y col., 2001; Desjardins, 2006).

De acuerdo a las diferencias en el núcleo tricoteceno, los ésteres sencillos se dividen en: A) los que presentan fluorescencia azul por acción del H_2SO_4 y no reacciona con $AlCl_3$, y B) los que adquieren fluorescencia azul con $AlCl_3$ (Carrillo, 2003). Entre los principales tricotecenos se encuentran el desoxinivalenol o vomitoxina (DON) (Figura 10) y la toxina T-2 (Figura 11).

Las especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos son *F. graminearum*, *F. venenatum*, *F. camptoceras*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* y *F. solani* (Betina, 1989; Desjardins, 2006). Los tricotecenos inhiben la síntesis de proteínas, dañan las membranas celulares de los glóbulos rojos y tienen un efecto inmunosupresor. El rechazo de alimentos por los cerdos se debe al efecto neurotóxico de DON (Desjardins, 2006). Los humanos son tan sensibles como los cerdos, mientras que los bovinos pueden tolerarla debido a que los microorganismos del rumen la transforman, disminuyendo su toxicidad. En cambio, la toxina T-2 causa hemorragias severas (Carrillo, 2003).

Zearalenona

Es un compuesto con una estructura estrechamente relacionada a metabolitos estrogénicos, producida muchas veces junto con los tricotecenos, por especies que colonizan los granos: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti*, *F. roseum*, *F. avenaceum* y *F. solani*, entre otros (Figura 12) (Betina, 1989). Es débilmente genotóxica causando daño en el DNA de algunos

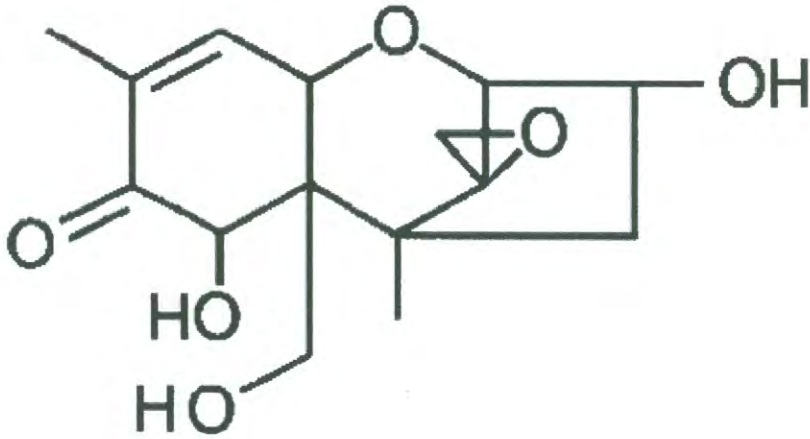


Figura 10. Estructura de Desoxinivalenol o Vomitoxina (tipo B).
Fuente: Carrillo, 2003.

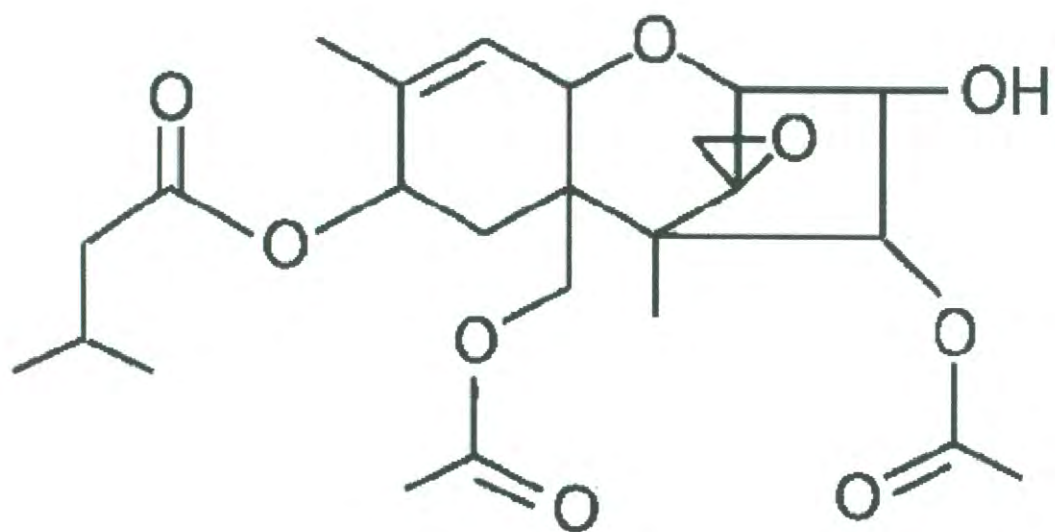


Figura 11. Estructura de Toxina T-2 (tipo A).
Fuente: Carrillo, 2003.

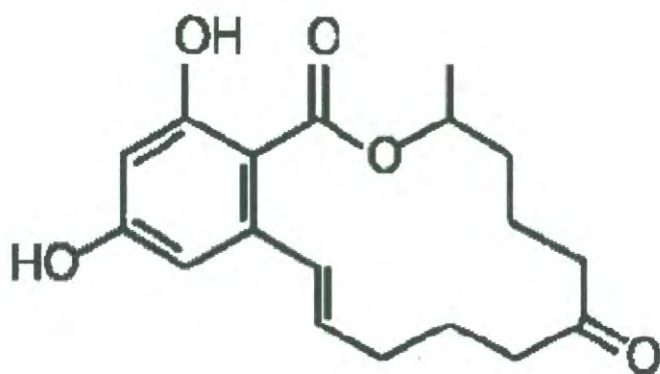


Figura 12. Estructura de Zearalenona.
Fuente: Carrillo, 2003.

sistemas celulares de microorganismos y mamíferos. Produce hiperestrogenismo en los cerdos, en las hembras causa agrandamiento de las glándulas mamarias y de los órganos genitales, atrofia de ovarios, infertilidad y menor peso en las crías. En los machos incluye agrandamiento de las glándulas mamarias y atrofia de los testículos. Estos síntomas también se presentan en ganado y roedores (Betina, 1989; Campas y Ledesma, 1995; Desjardins, 2006). La dosis oral letal media (DL₅₀) para ratas es de 4 mg/g (Carrillo, 2003). El nivel máximo admisible de zearalenona oscila entre 30 y 1,000 mg/kg en cereales, leguminosas y nueces según el país (Carrillo, 2003). La ingesta diaria promedio de la toxina proveniente de cereales y leguminosas fue estimada en 1.5 mg/día para la dieta de Europa y 3.5 mg/día para la de Oriente Medio. La ingesta diaria tolerable máxima ha sido establecida en 0.5 mg/kg de peso corporal (Carrillo, 2003). Basado en diversos estudios, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer concluyó en 1993, que hay evidencia limitada que demuestre la carcinogenicidad de esta toxina en animales de experimentación y una evidencia inadecuada de toxicidad hacia los humanos (Desjardins, 2006).

Moniliformina

Esta micotoxina fue obtenida por primera vez en 1973 de una cepa de *Fusarium verticillioides* aislada de maíz, posteriormente se encontraron más especies productoras como *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. anthophilum* y *F. subglutinans*, entre otras (Betina, 1989; Desjardins, 2006).

Su nombre se deriva de *F. moniliforme* (*F. verticillioides*), que fue la primer especie que se reportó como productora de esta toxina. Es una pequeña molécula iónica que se produce naturalmente como sal de sodio o potasio (Figura 13). Debido a su alta solubilidad en agua, es difícil aislarla de matrices biológicas (Desjardins, 2006).

En animales de experimentación causa efectos patológicos en tejidos del corazón. Análisis toxicológicos revelan que causa una muerte rápida en animales sin causar daño celular. En las pruebas realizadas con bacterias no se ha encontrado que sea mutagénica, incluida la prueba de Ames. Es también un potente inhibidor de la oxidación del piruvato en la mitocondria (Betina, 1989; Fotso y col., 2002; Desjardins, 2006).

Beauvericina (BEA)

Es un péptido cíclico lipofílico que contiene una secuencia alternada de 3 D- α -hidroxi-isovaleril y 3 N-metil-L-fenilalanina con un peso molecular de 784 Da (Figura 14) (Krska y col., 1996; Thakur y Smith, 1997). La estructura de BEA es similar a la de las eniantinas (micotoxinas producidas por *Fusarium*), con la única diferencia de que en éstas el amino aromático es reemplazado por combinaciones de N-metil derivadas de isoleucina (eniantina A), valina (eniantina B) y leucina (eniantina C) (Braden y col., 1980; Plattner y Nelson, 1994; Calo y col., 2003).

La BEA fue aislada por primera vez del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en 1969. Comenzó a estudiarse debido a sus propiedades insecticidas contra el mosquito *Aedes aegypti* y a su toxicidad contra *Artemia salina*. Es un

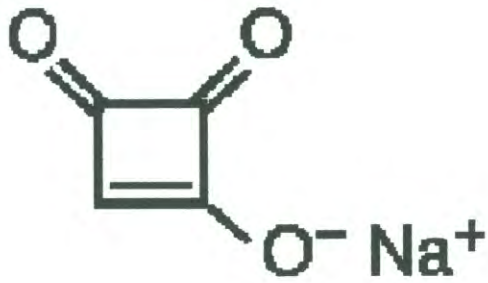


Figura 13. Estructura de Moniliformina.
Fuente: Carrillo, 2003.

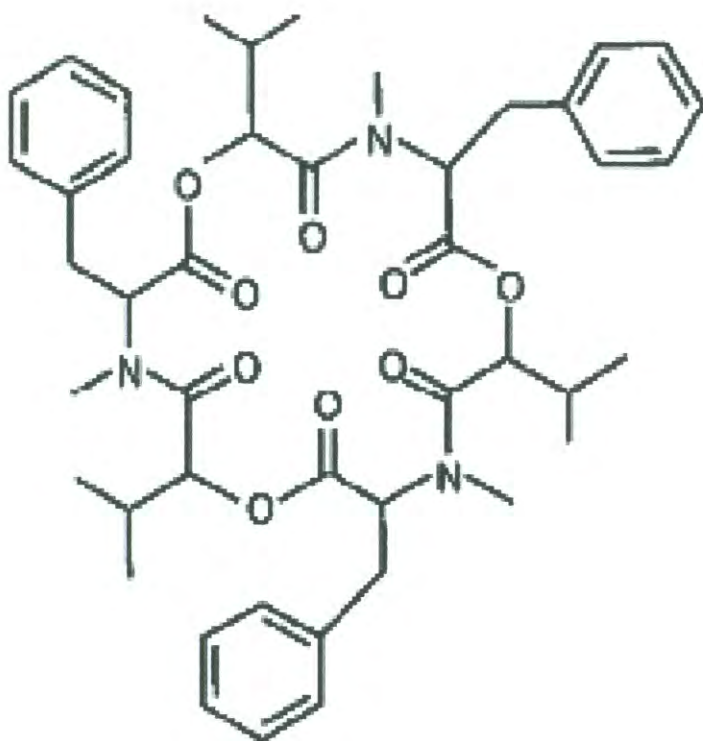


Figura 14. Estructura de Beauvericina.
Fuente: Thakur y Smith, 1997.

antibiótico ionóforo similar a las eniantinas A y B, inhibiendo el crecimiento de las bacterias gram positivas y micobacterias (Hamill y col., 1969; Ovchinnikov y col., 1971; Champlin y Gula, 1979; Castlebury y col., 1999; Rosas, 2003). Esta propiedad ionófora hace que la toxina se solubilice en la bicapa lipídica de la membrana celular formando complejos con cationes como K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , lo cual puede afectar la homeostasis iónica (Krska y col., 1996; Kouri y col., 2003; Klaric y Pepeljnjak, 2005; Tang y col., 2005).

Gupta y col. (1991), aislaron por primera vez BEA del micelio de *Fusarium semitectum* y *Fusarium subglutinans*, encontrando que este metabolito era tóxico para el escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Plattner y Nelson, 1994).

Logrieco y col. (1993 b), reportaron la aparición de BEA en maíz de Polonia contaminado con *Fusarium subglutinans*, obteniendo de 5 a 200 mg/kg de BEA. Esta especie se reportó como la primera productora de la micotoxina en maíz. En el mismo año se encontró que *F. subglutinans* de maíz peruano producía de 50 a 250 mg/kg, siendo el primer reporte de BEA en Sudamérica. A esta especie le siguió *Fusarium proliferatum*, el cual se encontró en maíz de Italia utilizado para forraje, obteniéndose una producción de BEA de 300 a 1,100 mg/kg (Logrieco y col., 1993 a; Plattner y Nelson, 1994). El número de especies productoras siguió en aumento reportándose *F. sambucinum*, *F. acuminatum* var. *acuminatum*, *F. acuminatum* var. *armeniicum*, *F. equiseti*, *F. longipes*, *F. anthophilum*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. beomiforme*, *F. dlamini* y *F. nygamai*, así como la variedad de sustratos (espárrago, papa, soya, uva, trigo, arroz, entre otros). Estas especies fueron aisladas de diferentes países como España, Alemania, Inglaterra,

Francia, Filipinas, Panamá, Ecuador, India, Argentina, Australia y Sudáfrica y la producción de BEA fue de 2 a 3,200 $\mu\text{g/g}$ (Logrieco y col., 1998; Torres y col., 2001).

La aparición de beauvericina en Estados Unidos fue reportada por Munkvold y col. (1998), en cantidades de 0.1 a 350 $\mu\text{g/g}$. En este estudio reportan que *F. subglutinans* no produjo la toxina, siendo uno de los principales productores, por lo que consideran que los orígenes geográficos son de suma importancia para la producción de esta micotoxina.

Logrieco y col. (2002), reportaron niveles de BEA de 0.64 a 3.5 $\mu\text{g/g}$ en trigo por especies de *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum* y *F. poae*. Un estudio realizado por Jurjevic y col. (2002), reporta en maíz de Croacia 67.3 ng/g de BEA y las cepas productoras fueron *F. verticillioides* y *F. subglutinans*.

Se ha encontrado que BEA puede coexistir con otras micotoxinas como fusaproliferina, fumonisina B₁, fumonisina B₂ y ocratoxina. Así mismo, se ha comprobado un efecto sinérgico con fumonisina B₁ y ocratoxina A, en células de riñón de cerdo PK15 en donde causa un aumento en la peroxidación lipídica, con un sucesivo decremento del glutatión intracelular, lo cual conlleva a la muerte celular, así como apoptosis y citólisis, por lo que se considera que una exposición simultánea a estas micotoxinas puede ser un disparador para desarrollar daños renales crónicos en humanos (Klaric y col., 2006; Klaric y col., 2007). Así mismo, en estudios realizados con células y tejidos del corazón de cobayos, se ha comprobado que BEA no tiene una relación sinérgica con moniliformina (Kamyar y

col., 2006). Sin embargo, el efecto que puede tener la entrada de BEA en la cadena alimenticia aún permanece desconocido (Ritieni y col., 1997; Jurjevic y col., 2002).

Los estudios para demostrar las propiedades insecticidas de BEA han continuado, Calo y col. (2003), reportaron que la micotoxina mostraba efectos citotóxicos en células SF-9 de la palomilla *Spodoptera frugiperda*, encontrando que los efectos son tiempo y dosis dependiente. La concentración citotóxica 50% (CC₅₀) para BEA después de 4 y 24 horas de exposición fue de 85 y 10 μM , respectivamente. Esto confirma que es tóxica para las células de insectos y sugiere futuras aplicaciones como un agente de control biológico contra los insectos que afectan la agricultura.

En otros estudios se ha demostrado que la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa en los protoplastos de tomate, se ve disminuida después de 3 horas de tratamiento con BEA (Paciolla y col., 2004).

Publicaciones anteriores han demostrado que BEA es un potente inhibidor de la enzima colesterol aciltransferasa (Acil-CoA) en microsomas de hígado de rata, causando el 50% de la inhibición con una dosis de 3.0 μM de BEA (Tomoda y col., 1992). Se ha reportado también que BEA afecta las funciones inmunes en pavos, suprimiendo la proliferación e induciendo apoptosis de los linfocitos de la sangre periférica (Dombrink- Kurtzman, 2003).

Así mismo, se ha descubierto que es un inhibidor de los canales de calcio tipo L, lo cual indica que posee propiedades antiarrítmicas. Sin embargo, también puede afectar la fuerza de contracción y la acción potencial de los músculos

papilares del corazón, agotamiento de ATP, así como afectar el balance iónico y pH del cerdo de guinea (Wu y col., 2002; Kouri y col., 2005).

También se ha encontrado que BEA posee actividad antitumoral, causando apoptosis en varias células cancerígenas. Estudios señalan que BEA muestra actividad citotóxica contra células cancerígenas humanas de pulmón, páncreas, pecho, glioma y células de leucemia linfoblástica e inhibe la migración de células cancerígenas en metástasis de próstata y pecho. Además, se demostró su actividad antiangiogénica en células endoteliales (Calo y col., 2004; Chen y col., 2006; Zhan y col., 2007).

El mecanismo mediante el cual BEA induce apoptosis y fragmentación del DNA, incluye la liberación de calcio del retículo endoplásmico aumentando así la concentración de éste en el citoplasma (Ojcius y col., 1991; Nash y col., 1998; Kim y col., 2002). En estudios realizados en células cancerígenas humanas de pulmón y leucemia linfoblástica, se ha encontrado que el calcio puede actuar como mediador en la señal de la muerte celular, dando como resultado una reducción de la membrana mitocondrial, incremento en la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 3. Además, aún a bajas concentraciones forma un complejo beauvericina-oligonucleótido (25 pmol/L), sin tener una preferencia de base nitrogenada (Pocsfalvi y col., 1997; Jow y col., 2004; Lin y col., 2005).

En otras publicaciones se ha mostrado que la proteína Bcl-2 es resistente a la apoptosis en células de colangiocarcinoma humanas, pero con la adición de un oligonucleótido anti-sentido Bcl-2 se puede reducir la expresión de esta proteína y aumentar la apoptosis inducida por BEA. Esto puede tener aplicaciones

terapéuticas ayudando a que los tumores sean más susceptibles a la apoptosis y aumentar el efecto del tratamiento anticancerígeno (radiación, quimioterapia, etc) (Harnois y col., 1997).

Se ha encontrado que existe un sinergismo entre BEA y quetoconazol para el tratamiento de infecciones fúngicas en pacientes con sistema inmunocomprometido. El quetoconazol solo, es un fungistático, mientras que la combinación con BEA lo hace un fungicida. Se observó sinergismo contra hongos de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Aspergillus*. La dosis de 0.5 mg/kg de BEA y 0.5 mg/kg de quetoconazol mostró que la proliferación de *Candida parapsilosis* en hígado, pulmones y cerebro se redujo a un (\log_{10} UFC) 1.3, 1.2 y 0.9, respectivamente (Zhang y col., 2007).

Métodos de Detección para Beauvericina

La cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) fue una de las técnicas de detección utilizadas inicialmente para BEA (Logrieco y col., 1993 b). En la actualidad, el método más empleado para su detección es la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV con arreglo de diodos, para la comparación de los espectros. Comúnmente se emplea una mezcla de acetonitrilo-agua como fase móvil, una columna de fase inversa C_{18} y una longitud de onda de 192 a 225 nm (Fotso y col., 2002; Logrieco y col., 2002). En algunos casos se ha utilizado como método de detección y/o identificación la espectrometría de masas con "electrospray", ya que permite detectar con gran precisión la composición de los elementos químicos presentes, separando los núcleos atómicos en función de

su relación masa-carga. Sin embargo, tiene la desventaja de ser una técnica costosa y se necesita de personal experimentado para su uso (Thakur y Smith, 1997; Shephard y col., 1999; Desjardins y col., 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras

El tamaño de la muestra es una característica muy importante. La muestra debe ser lo suficientemente grande para asegurar que todas las especies más comunes serán recuperadas con un nivel estadístico y un grado de confianza.

Si una especie en particular presenta una frecuencia a en la muestra, entonces la probabilidad de que la especie sea seleccionada en cualquier toma individual de la muestra es a , y la probabilidad de que no sea seleccionada es $1 - a$. Así, mientras más bajo el valor de a , más grande tendrá que ser la muestra para tener la certeza de que las especies serán recuperadas en la muestra.

Para lograr un tamaño de muestra apropiado se utilizó la fórmula $1 - (1 - a)^x$, en donde, para tener un 95% de certeza de que una especie se encuentra presente con una frecuencia del 5%, el tamaño de la muestra debe ser de 60 (Leslie y col., 2006; Rosas y col., 2006).

Se recolectaron muestras de maíz durante el mes de diciembre del 2006 de la región Costa de Hermosillo (Campo Santa Cruz, ubicado a 28°, 34', 07.23" N y 111°, 30', 12.0" W). Las muestras fueron tomadas al azar directamente del campo, recolectándose 122 mazorcas de un total de 40 hectáreas. Cada muestra se colocó en bolsas de papel estériles y etiquetadas para su análisis posterior.

Manejo, Preparación y Determinación de Humedad de las Muestras

En el laboratorio se tomaron 60 mazorcas al azar de las 122 mazorcas recolectadas en el campo y se desgranaron manualmente. Las muestras se colocaron en bolsas de papel estériles para evitar su contaminación y humedecimiento (Ramírez, 2000).

Posteriormente se realizó un muestreo en donde se tomaron 10 muestras al azar, para determinar su contenido de humedad, utilizando una estufa de secado convencional, empleando el método oficial 44-15A de la AACC (2001).

Porcentaje de Invasión por Hongos

Inmediatamente después de realizar el desgranado manual, se tomaron 50 granos sanos (los granos quebrados o que presentaban fisuras fueron descartados) de cada muestra y se desinfectaron superficialmente con una solución al 1% de hipoclorito de sodio (NaOCl, Clorox[®]) durante 60 segundos. Para eliminar el exceso de la solución clorada, los granos se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con una sanita estéril (Sauer y Burroughs, 1986). Los granos se sembraron en placas de Petri con agar malta sal al 4% y se incubaron durante 7 días a 25° C (Anexo 1).

Las colonias desarrolladas se observaron utilizando un estereoscopio modelo Carl Zeiss con objetivos de 1.6 y 4X. La identificación se realizó basándose en las características macro y microscópicas de cada colonia.

Aislamiento e Identificación de Especies del Género *Fusarium*

Las colonias con características del género *Fusarium* se trasladaron a agar hoja de clavel (CLA) y se incubaron durante 7 días a 25° C, bajo un fotoperíodo de luz blanca y oscuridad (12 horas c/u) (Anexo 1).

Se considera de gran importancia para la obtención de cultivos puros, realizar el aislamiento de una sola espora. La técnica utilizada en este trabajo fue la de micromanipulación en donde se tomó un asa con punta redonda y se sumergió en una solución al 0.2% de tween 80, una vez que se formó una burbuja en el asa se tomó parte de la colonia (preferentemente se toma de las hojas de clavel, ya que los macroconidios que se desarrollan ahí, son más consistentes en tamaño y forma) y se sembró en una sola estría en una caja de Petri con agar agua al 3% (Anexo 1). El cultivo se incubó durante 1 día a 25° C. Posteriormente el medio se observó al microscopio y se tomó una sola espora, la cual fue transferida a tubos de agar papa dextrosa (PDA) y se incubó durante 7 días a 25° C (Anexo 1) (Leslie y col., 2006).

Para la identificación de las especies de *Fusarium*, las colonias desarrolladas en los tubos de PDA se transfirieron a CLA, SNA y PDA y se incubaron 7 días a 25° C, bajo un fotoperíodo de luz blanca y oscuridad (12 horas c/u) (Anexo 1). La identificación de las especies se basó en las características macro y microscópicas (pigmentación del medio, tamaño y forma de macroconidios y microconidios, presencia y tamaño de monofíalides y polifíalides, longitud de las cadenas y la presencia o no de falsas cabezas) (Leslie y col., 2006).

Las especies de *Fusarium* identificadas se trasladaron a una solución de glicerol-agua al 15% en microtubos estériles y fueron almacenadas a -70° C (Leslie y col., 2006).

Producción de Beauvericina

Se siguió la metodología descrita por Munkvold y col. (1998), con modificaciones. Se tomó como substrato 100 g de maíz (previamente colocado en autoclave por 15 min a 120° C y 45% humedad), el cual fue inoculado en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con 2 ml de una suspensión acuosa, la cual contenía 10^7 conidios de *Fusarium* / ml aproximadamente. Las muestras fueron incubadas a 25° C durante 4 semanas. Los controles fueron tratados de la misma manera con la excepción de que no fueron inoculados con conidios de *Fusarium* previamente identificados.

Las modificaciones a la metodología original fueron las siguientes; la técnica original dice: una vez concluido el tiempo de incubación, las muestras son secadas en un horno con aire forzado a 60° C durante 48 horas, finalmente las muestras son molidas y almacenadas a 4° C para sus análisis. No se pudo llevar a cabo esta parte ya que no se consiguió un horno disponible para el secado de las muestras.

Extracción de la Toxina

Se tomaron 10 g de cada muestra, los cuales fueron molidos y homogenizados (6,500 X g por 3 min) con 50 ml de metanol a temperatura

ambiente. Posteriormente se centrifugó a 2,000 X g por 5 minutos. Las muestras se filtraron a través de un papel Whatman No. 4, recolectándose 30 ml del filtrado (corresponde a 3 g de muestra) (Leslie y col., 2004, con modificaciones). A continuación se tomó 1 ml del filtrado y se centrifugó a 15,000 X g por 15 min antes de su inyección en el HPLC.

Las modificaciones realizadas a la metodología de Leslie y col. (2004), fueron las siguientes: a) Se tomó el doble de muestra, aumentando así la relación muestra-solvente, por lo que se incrementa la concentración del compuesto en la solución. b) Se omitió la reducción del volumen por secado, se utilizó el extracto directamente. c) No se purificó la muestra pasándola a través del cartucho C₁₈, este paso no fue necesario y d) El paso del filtrado a través del Acrodisk (tamaño de poro de 0.22 µm), se substituyó por centrifugación a alta velocidad y por tiempo prolongado (15,000 X g por 15 min).

Cuantificación de la Toxina

La cuantificación de beauvericina se determinó siguiendo la metodología descrita por Monti y col. (2000), con pequeñas modificaciones. Se utilizó un HPLC (bomba ternaria) marca Varian Pro Star equipado con un detector de arreglo de diodos y una columna C₁₈ de 250 x 4.6 mm (marca Varian). Como fase móvil se utilizó una solución de acetonitrilo-agua (65:35 v/v) durante los primeros 5 minutos y se modificó a un 70% de acetonitrilo en 10 minutos. Después de 1 minuto de permanecer constante a 70% de acetonitrilo, la fase móvil se llevó a su

concentración original en 4 minutos. El flujo utilizado fue de 1.5 ml por minuto, con un volumen de inyección de 20 μ l y una longitud de onda para la detección de 192 nm. La cuantificación de la toxina se realizó mediante una comparación de los picos de las muestras con los estándares de beauvericina (Sigma Chemical Co.), así como sus espectros en UV (Krska y col., 1996). Los extractos que resultaron positivos se corrieron por duplicado.

La modificación realizada a la metodología de Monti y col. (2000) fue la longitud de onda la cuál se cambió de 205 nm a 192 nm, ya que absorbe más a esta longitud de onda, por lo tanto se incrementa la sensibilidad. Ésta fue tomada de la metodología de Krska y col. (1996).

Prueba de Recuperación

Se tomaron 2 g de maíz estéril, los cuales fueron molidos y contaminados con 25 μ g/ml del extracto obtenido de una cepa productora (*F. proliferatum*, clave: 31-4-2). La mezcla se dejó secar hasta el día siguiente, donde posteriormente se extrajo para hacer la determinación de beauvericina. Se tomó 1 g y se homogenizó con 5 ml de metanol durante 3 minutos y se centrifugó a 2,000 X g por 5 minutos. Las muestras se filtraron a través de papel Whatman No. 4 y el extracto obtenido se centrifugó 15,000 X g por 15 min antes de su inyección en el HPLC (Leslie y col., 2004, con modificaciones las cuales fueron mencionadas anteriormente).

La metodología seguida para la determinación en HPLC fue la misma utilizada para las muestras (Krska y col., 1996; Monti y col., 2000). La prueba de recuperación se realizó por duplicado.

Análisis Estadístico

Se realizó una estadística descriptiva y un análisis de frecuencias de las cepas reportadas en las muestras obtenidas de la costa de Hermosillo y las cepas encontradas productoras en los cultivos *in vitro*, utilizando el programa XL- STAT-Pro versión 7.0 (2003 Addinsoft) para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Contenido de Humedad

La determinación de humedad es considerada el factor más importante para un almacenamiento seguro, ya que la actividad biológica existe solamente si hay humedad presente en los granos. Cuando el grano es almacenado con exceso de humedad, es más fácilmente atacado por hongos e insectos, dañándolo y acelerando su descomposición (González, 1995). El análisis en sí determina si el contenido de humedad presente en una muestra se encuentra dentro de los límites de seguridad establecidos (Álvarez y col., 1988).

La especie, variedad, madurez del grano, humedad y temperatura del medio pueden afectar el equilibrio higroscópico, los granos con alto contenido de aceite absorben menos humedad del medio que las semillas con alto contenido de almidón (González, 1995).

Los valores de humedad de las muestras obtenidas de la costa de Hermosillo durante el mes de diciembre de 2006 fueron muy altos, encontrándose en un intervalo de 33.14 a 41.03% con un promedio de $36.73\% \pm 2.74$. Estos valores se deben a la temporada de siembra (otoño- invierno), en donde se presentan temperaturas bajas, además de que en el año 2006 se presentaron lluvias que favorecieron el contenido de humedad de la planta (Tabla 1) (Anexo 3). Según datos reportados, cuando la planta de maíz alcanza su madurez fisiológica

Tabla 1. Promedio Mensual de Temperatura Máxima y Mínima y Precipitación Pluvial de Hermosillo de Agosto a Diciembre de 2006.

Mes	T° máxima (°C)	T° mínima (°C)	Precipitación pluvial (mm)	HR (%)
Agosto	43.0	23.5	106.0	69
Septiembre	41.5	20.0	152.0	69
Octubre	41.5	14.0	55.0	62
Noviembre	29.2	13.6	0.0	44
Diciembre	23.4	3.8	7.0	50

T°: Temperatura

HR: Humedad Relativa

Fuente: Gerencia del Servicio Meteorológico Nacional, Subdirección General Técnica, CNA, 2006.

puede llegar a contener humedades del grano que fluctúan entre 30-35% y este pudo ser otro factor que influyó en el contenido de humedad, ya que las muestras fueron obtenidas directamente del campo y no de almacenes, donde ya se les ha dado un tratamiento de secado previo para un almacenamiento seguro (González, 1995; White y Johnson, 2003).

Porcentaje de Invasión por Hongos

El grado de invasión total de las muestras fue de 24% (Figura 15). Se encontró un crecimiento levaduriforme (56%) el cual posiblemente es *Fusarium* degenerado, debido a que las colonias presentaban un color rosa característico de este género, por lo que fueron transferidas a los medios de cultivo correspondientes para la identificación de *Fusarium* y un 2% se desarrolló propiamente como *Fusarium*. Los hongos del género *Aspergillus* representaron el 11% de la invasión total. Estos hongos causan el deterioro de muchos productos alimenticios. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* y/o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Carrillo, 2003; Molina, 2003).

Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos (aflatoxinas, ocratoxinas y ácido kójico, entre otros) tanto para el hombre como para otros animales. Se ha reportado que casi 50 especies de *Aspergillus* producen

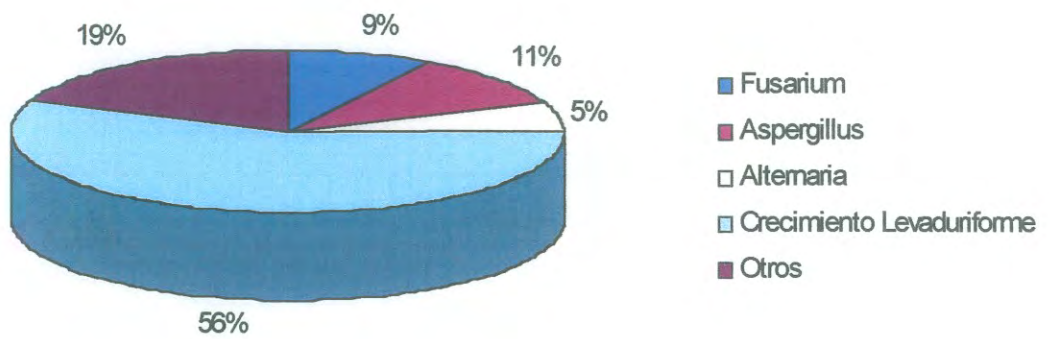


Figura 15. Porcentaje de Invasión por Hongos por Género.

micotoxinas, pero las más importantes de todas en los alimentos son las aflatoxinas. La aflatoxina B₁ es probablemente el carcinógeno más potente del hígado para un gran número de especies, incluido el hombre (Betina, 1989; Nava, 1995; Doyle y col., 2001). La exposición crónica a las aflatoxinas produce carcinoma hepatocelular (Caldas y Silva, 2007).

Del género *Fusarium*, uno de los hongos más importantes, ya que induce a la pudrición de raíz, tallo y mazorca, se obtuvo el 9% de la invasión total por hongos. Las especies de *Fusarium* se encuentran en los vegetales antes de la cosecha salvo *F. culmorum*. Las especies de *Fusarium* no compiten bien con las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Algunos son patógenos de los cereales y pueden producir micotoxinas en los granos, aún antes de la cosecha. Otras especies de *Fusarium* pueden crecer en el refrigerador y aquellos con capacidad competitiva contribuyen a la podredumbre de frutas y hortalizas almacenadas. La persistencia de *Fusarium* en el suelo durante uno a varios años, se debe principalmente a la presencia de clamidosporas, las cuales son estructuras de resistencia ante ambientes adversos, que garantizan la propagación y supervivencia del hongo. Los hongos del género *Fusarium* requieren para germinar fuentes exógenas de nutrientes, por lo que son muy sensibles al antagonismo, pero su distribución casi universal indica la omnipresencia de los microambientes específicos (Carrillo, 2003; Leslie y col., 2003; Desjardins, 2006).

El género *Alternaria* representó el 5% de la invasión total y otros hongos de campo (Mucorales) representaron el 19%. Es muy común encontrar *Alternaria* en los granos recién cosechados, ya que es, después de las especies de

Cladosporium, el hongo cuyas esporas se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son colonizados por especies de *Alternaria* y puede haber una penetración sub-epidérmica, si toleran las aplicaciones de los fungicidas, reduciendo el rendimiento de las cosechas. El género *Alternaria* es productor de micotoxinas, entre ellas, alternariol, ácido tenuazónico, monometiléter de alternariol, altenueno, altertoxinas I y II, las cuales son tóxicas para mamíferos, aves y plantas. También es considerado antagonista de *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium* (Lacey, 1989; Doyle y col., 2001; Carrillo, 2003).

Existen publicaciones en donde se ha establecido una correlación entre el grado de invasión y la temperatura, en regiones donde se tienen temperaturas promedio anuales que oscilan entre 25 a 30° C y con presencia de lluvias que favorecen el desarrollo de hongos al aumentar la humedad relativa (Christensen y Kaufmann, 1976; Álvarez y col., 1988).

En estudios realizados por Cortez- Rocha (1997) con trigo rojo duro durante el invierno de 1993 a 1996 en Kansas, demostró que existe una correlación entre el grado de invasión, la presencia de lluvias y las temperaturas cálidas.

Anteriormente Álvarez y col. (1988), Ramírez (2000), Molina (2003), y Rosas y col. (2006), reportaron la presencia de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria* en maíz de Sonora. Lo anterior coincide con nuestros resultados, estableciendo la presencia de estos géneros y mostrando que las condiciones climatológicas que se presentan en el estado, promueven el desarrollo de diferentes tipos de hongos en granos. Así mismo, que las diferencias climáticas que

se presentan de un ciclo a otro hacen que la invasión por género no se mantenga constante de un ciclo agrícola a otro.

Porcentaje de Invasión por Hongos del Género *Fusarium*

A partir de las muestras que presentaron *Fusarium* en la determinación del porcentaje de invasión, así como las que tenían un crecimiento levaduriforme, se prosiguió a su identificación en base a sus características micro y macroscópicas, encontrándose un total de 55 cepas de *Fusarium* (Anexo 2). Se encontró que la especie mayormente aislada en las muestras de maíz fue *F. verticillioides* con 54% (Figura 16). Estos resultados coinciden con los reportados por Ramírez (2000) y Molina (2003), en donde esta especie fue la más aislada en maíz de Sonora. A esta especie le siguió *F. proliferatum* con 42% y en menor proporción *F. subglutinans* y *F. oxysporum* con 2% (una sola colonia encontrada). Estos resultados concuerdan con estudios publicados anteriormente, en donde las especies mayormente encontradas en maíz a nivel mundial son *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Kedera y col., 1994; Krska y col., 1996; Logrieco y col., 1996; Rosas y col., 2006). En los estudios realizados por Molina (2003) y Rosas y col. (2006), *F. oxysporum* fue una de las especies presentes en mayor cantidad en las muestras, lo cual no coincidió en nuestro estudio. Asimismo, ellos reportan que la especie de *F. proliferatum* solo había sido encontrada en la zona del Valle del Yaqui, mientras que en este estudio se obtuvo un alto porcentaje de invasión en las muestras de la costa de Hermosillo.

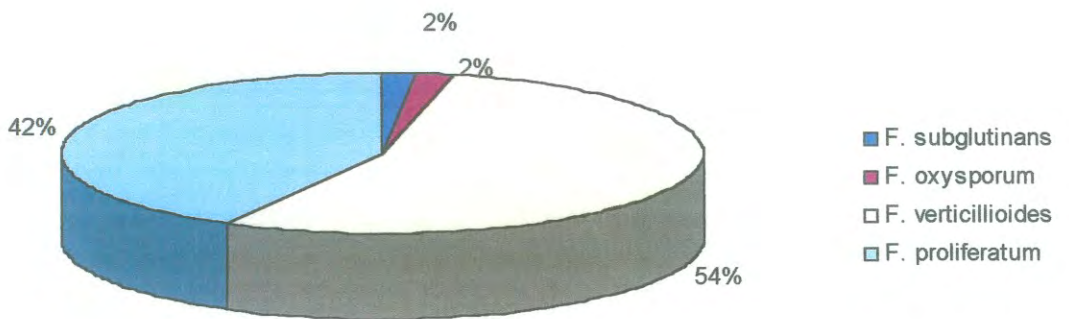


Figura 16. Porcentaje de Invasión por Hongos del Género *Fusarium*.

Estos resultados confirman que las especies de *Fusarium* presentes en los granos varían de un ciclo a otro, debido a los cambios en las condiciones climáticas. Por lo que es importante generar información sobre la microflora presente en los cultivos en cada ciclo agrícola para conocer las especies que surjan en nuestros cultivos, así como aquellas que siguen estando presentes a través de los años. Esto con el fin de conocer los efectos que causan en la planta las distintas especies así como la producción de micotoxinas y el peligro que pueden representar para el hombre.

Contenido de Beauvericina

Una vez llevada a cabo la producción de BEA por cultivo *in vitro* según la metodología descrita por Munkvold y col. (1998), se prosiguió a realizar una curva estándar inyectando concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ del estándar de BEA en el HPLC (Figura 17). Posteriormente se determinó y cuantificó la presencia de BEA en todos los cultivos *in vitro* (55 muestras), por medio de un análisis de cromatografía de alta resolución (HPLC), en donde las muestras se compararon con el estándar de BEA, así como con su espectro en UV, el cual mostró su máxima absorbancia a los 199 nm (Figura 18). Se encontraron 4 cepas productoras de la toxina (7.2%), con cantidades de 4.74 a 239.11 $\mu\text{g/g}$, de las cuales tres pertenecían a *F. proliferatum* y una a *F. oxysporum* (Figura 19) (Tabla 2), teniéndose un límite de detección de 4.5 $\mu\text{g/g}$. Anteriormente Plattner y Nelson (1994) y Shephard y col. (1999) reportaron a *F. proliferatum* como productor de

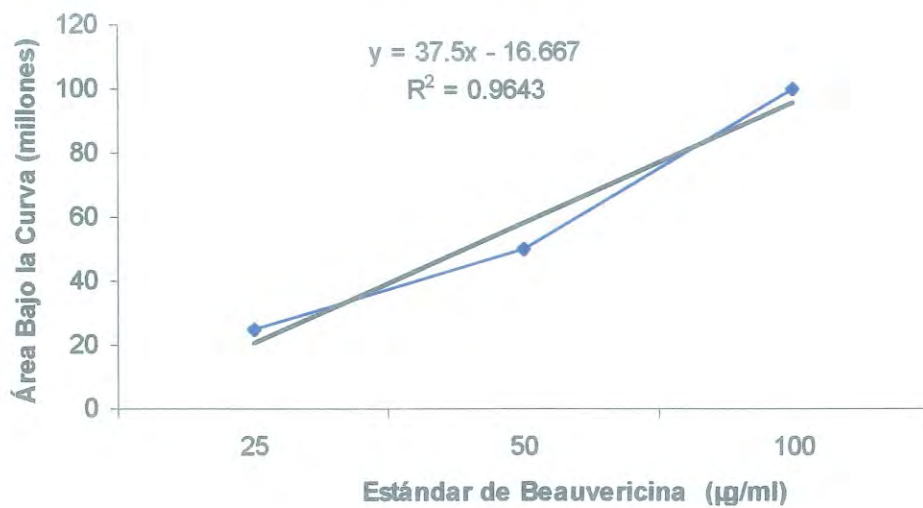


Figura 17. Curva Estándar de Beauvericina.

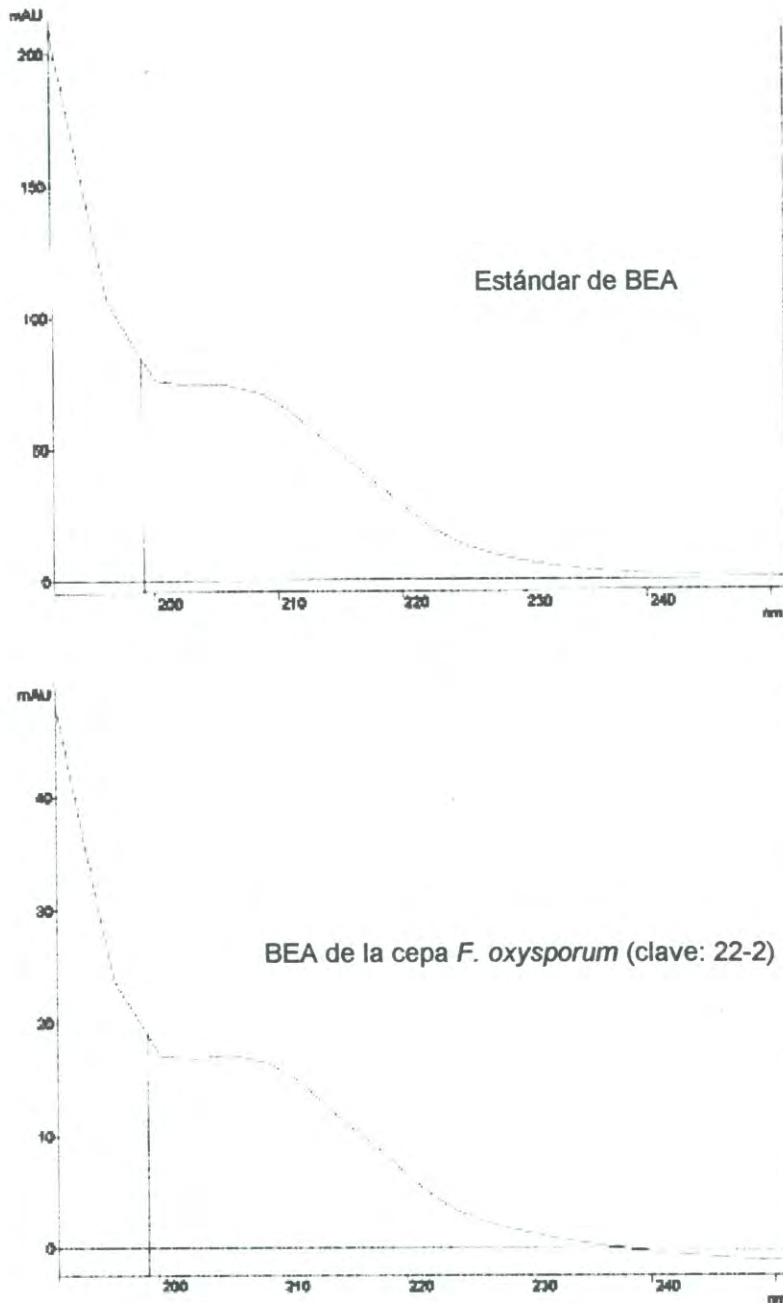


Figura 18. Espectros de UV de Estándar de BEA y un Extracto Productor de BEA.
Nota: el primer número de la clave pertenece al número de muestra y el segundo al número de caja de Petri.

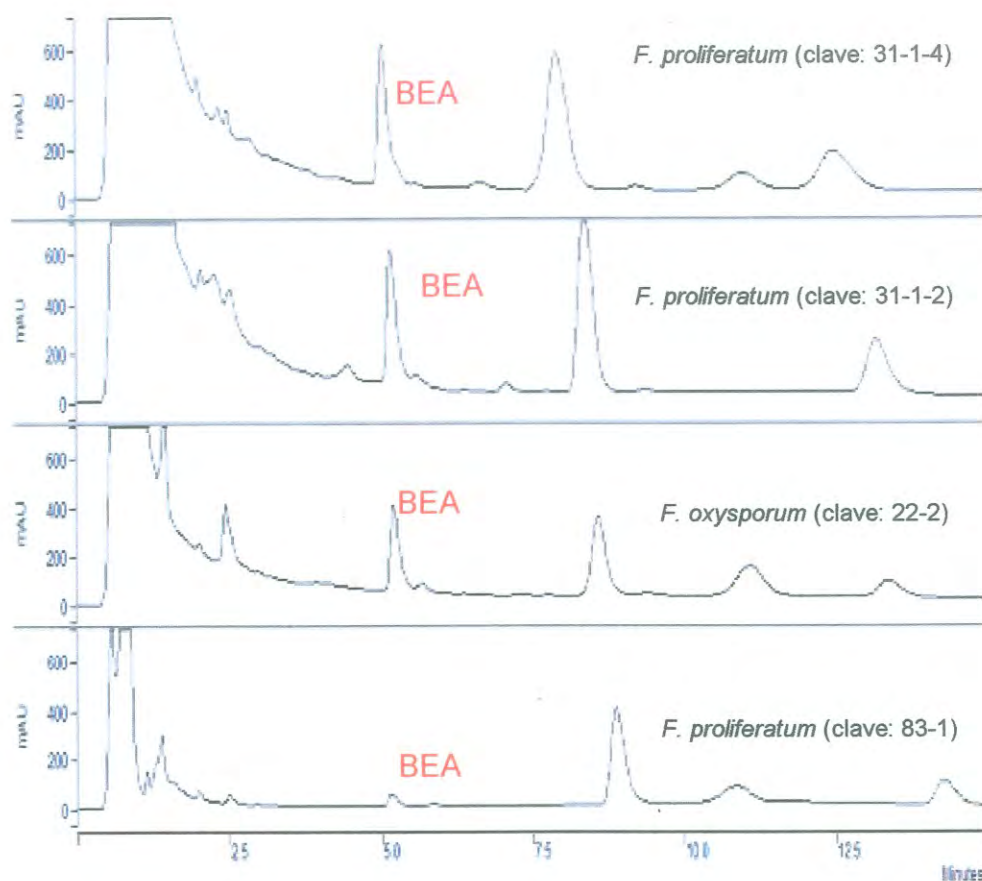


Figura 19. Cromatogramas de Cepas Productoras de BEA. Nota: el primer número de la clave pertenece al número de muestra, el segundo al número de caja de Petri y el tercero al número de colonia en la caja de Petri.

Tabla 2. Concentraciones Promedio de Beauvericina Obtenidos por HPLC.

Muestra y Clave	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
<i>F. oxysporum</i> (22-2)	20.43 \pm 0.11
<i>F. proliferatum</i> (31-4-2)	239.11 \pm 0.63
<i>F. proliferatum</i> (83-1)	4.74 \pm 0.70
<i>F. proliferatum</i> (31-1-2)	112.91 \pm 0.51

esta toxina. En estudios realizados por Ritieni y col. (1997), reportaron cantidades de 7 y 28 mg/kg de producción de BEA por *F. proliferatum*, y en este mismo estudio *F. oxysporum* no produjo la toxina. Sin embargo, en un estudio de Logrieco y col. (1998), se encontraron cuatro cepas de *F. oxysporum* productoras de BEA (13 a 3,200 µg/g). Los autores atribuyen estas diferencias a que BEA puede ser específica solamente para ciertas cepas, aún perteneciendo a la misma especie (Logrieco y col., 1998).

En este estudio no se encontraron niveles detectables de BEA por las especies de *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, siendo ambos productores en países como Italia, Polonia, Perú y Croacia. Sin embargo, Munkvold y col. (1998), reportaron que estas dos especies tampoco produjeron niveles detectables de la toxina en Iowa, coincidiendo con nuestro estudio, lo que confirma que los orígenes geográficos tienen un efecto importante en la producción de BEA (Logrieco y col., 1993 a; Logrieco y col., 1993 b; Jurjevic y col., 2002).

En un estudio por Leslie y col. (2004), encontraron que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* produjeron de 2 a 9 µg/g y 5 a 10 µg/g de BEA, respectivamente. Estos resultados son muy bajos con respecto a los reportados anteriormente por Logrieco y col. (1993 b), en donde *F. subglutinans* produjo hasta 200 mg/kg de BEA y los de Plattner y Nelson (1994) en donde detectaron hasta 300 mg/kg de BEA por *F. verticillioides*.

Mediante el análisis por HPLC se pudo obtener el tiempo de retención de las muestras, el cual fue de 5.23 ± 0.01 minutos, siendo similar al tiempo de retención del estándar de BEA que fue de 5.47 ± 0.08 minutos. Las diferencias entre ambos

se deben a que se corrieron a diferentes tiempos en el HPLC (los estándares se corrieron al comenzar el estudio y los extractos al finalizar el estudio) y las condiciones de la columna cambian un poco (Figura 20).

Se realizó la prueba de recuperación para determinar la eficiencia del método de extracción, en donde se obtuvo un porcentaje de recuperación de beauvericina del $95.5\% \pm 0.09$.

Las especies que producen BEA se encuentran alrededor del mundo y pueden crecer en diversos climas, así como en distintas plantas. Los altos niveles de BEA que se presentaron en este estudio, reflejan la habilidad de estos hongos para producir esta micotoxina, esto puede deberse a que el hongo colonizó gran parte de los granos y tuvo así más biomasa a su disposición para la producción de toxinas (Ritieni y col., 1997).

En estudios realizados por Jestoi y col. (2004), detectaron niveles mayores de BEA en las muestras de granos que fueron cosechadas al terminar el otoño, ya que estas recibieron mayor cantidad de lluvias, confirmando así, la importancia de las condiciones climatológicas tanto en el desarrollo del hongo, como en la producción de micotoxinas.

Se pudieron observar ciertas ventajas en el método de extracción utilizado y el original, ya que al no realizar el secado se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación de 94 a 95.5% (Leslie y col., 2004). Además al no llevar a cabo la purificación se ahorra tiempo y reactivos.

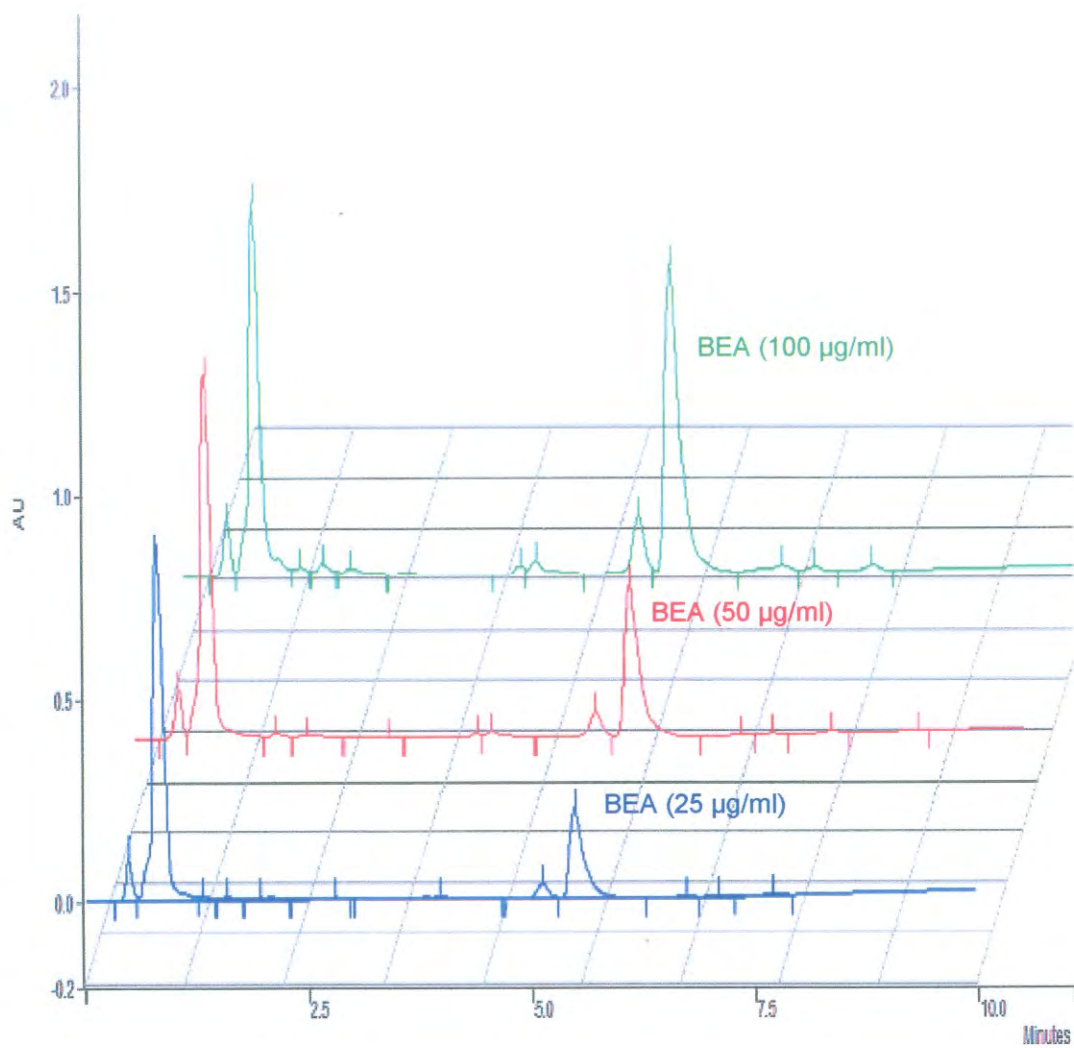


Figura 20. Tiempo de Retención del Estándar de Beauvericina.

Los datos presentados en este trabajo confirman la importancia de las especies de *Fusarium* como patógenos del maíz alrededor del mundo, debido a sus efectos en la planta y a la producción de toxinas.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron los géneros de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y otros hongos de campo, generalmente presentes en maíz recién cosechado.
2. Se aislaron en mayor proporción las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, y en menor grado *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, siendo todas estas especies las mayormente encontradas en la planta de maíz a nivel mundial y regional.
3. Únicamente el 7.2% de los cultivos de *Fusarium* produjeron beauvericina en condiciones *in vitro* en concentraciones de 4.74 a 239.11 µg/g.
4. No se detectaron niveles de BEA en este estudio por especies de *F. verticillioides* y *F. subglutinans*, por lo que se puede concluir que los orígenes geográficos pueden influir en la producción de micotoxinas.
5. Se considera importante la información generada en este trabajo, ya que se determinó por primera vez la capacidad de producción de beauvericina *in vitro* en los cultivos de *Fusarium*, aislado de la región de la costa de Hermosillo.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios periódicos para conocer la presencia y distribución de las especies de hongos que contaminan el maíz en las principales regiones productoras de Sonora, así como el surgimiento de nuevas especies, ya que la información que se cuenta sobre estos aspectos es insuficiente.

Ampliar el muestreo a otras zonas agrícolas del estado para detectar la presencia de beauvericina, ya que las especies de *Fusarium* que la producen se encuentran presentes invadiendo la planta de maíz.

Determinar la presencia natural de beauvericina en los cultivos de maíz y evaluar la coexistencia de beauvericina con otras micotoxinas presentes en el maíz del estado como son fumonisinas y aflatoxinas.

Continuar con estas investigaciones, ya que en México aún no se conoce la producción de esta toxina en otros estados productores de maíz, por lo que no se cuenta con la información suficiente para poder comparar los niveles de producción de BEA y las especies que la producen con otras regiones del país.

REFERENCIAS

- AACC. American Association of Cereal Chemists. 2001. Official Methods of Analysis. Met. 40-15A. AACC. St. Paul. MN. USA.
- Abramson D., Clear R., Gaba D., Smith D., Patrick S. and Saydak D. 2001. Trichothecene and Moniliformin Production by *Fusarium* Species from Western Canadian Wheat. J. Food Protection. 64 (8): 1220-1225.
- Álvarez C. R., Marroquin J. A. y Tequida M. 1988. Análisis de Microflora y Micotoxinas en Trigo y Maíz Almacenados y Destinados a Consumo Animal en el Estado de Sonora. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- Betina V. 1989. Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects. Ed. Elsevier. Checoslovaquia.
- Braden B., Hamilton A., Sabesan N. and Steinrauf L. 1980. Crystal Structure of a Beauvericin Barium Picrate Complex. Journal American Chemical Society. 102 (8): 2704- 2709.
- Caldas E. and Silva A. 2007. Mycotoxins in Corn Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assessment for Fumonisin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (19): 7974- 7980.
- Calo L., Fornelli F., Ramírez R., Nenna S., Cursi A., Caiaffa M. and Macchia L. 2004. Cytotoxic Effects of the Mycotoxin Beauvericin to Human Cell Lines of Myeloid Origin. Pharmacol Res. 49 (1): 73-77.
- Calo L., Fornelli F., Nenna S., Tursi A., Caiaffa M. and Macchia L. 2003. Beauvericin Cytotoxicity to the Invertebrate Cell Line SF-9. J. Appl. Genet. 44 (4): 515-520.
- Campas O. y Ledesma A. 1995. Análisis de Aflatoxinas en Productos de Maíz Nixtamalizados en el Estado de Sonora Utilizando Cromatografía de Afinidad con Anticuerpos. Tesis de Lic. Departamento de Ciencias. Químico-Biológicas. Universidad de Sonora.
- Carrillo L. 2003. Los Hongos de los Alimentos y Forrajes. 1 ed. Salta. Medio de Divulgación: Hipertexto, Argentina. Sitio: www.unsa.edu.ar/matbib.
- Castlebury L., Sutherland J., Tanner L., Henderson A. and Cerniglia C. 1999. Use of a Bioassay to Evaluate the Toxicity of Beauvericin to Bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 15 (3): 119-121.

- Champlin F. R. and Gula E. A. 1979. Noninvolvement of Beauvericin in the Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 37 (6): 1122-1125.
- Chelkowski J. 1989. *Fusarium*. Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Ed. Elsevier. Netherlands.
- Chen B., Tsai M. and Jow G. 2006. Induction of Calcium Influx from Extracellular Fluid by Beauvericin in Human Leukemia Cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 340 (1): 134-139.
- Christensen C. y Kaufmann H. 1976. Contaminación por Hongos en Granos Almacenados. Ed. Pax. México.
- Christensen C. and Kaufmann H. 1969. Grain Storage. Ed. University of Minnesota. United States. pp.18, 100.
- CNA. Comisión Nacional del Agua. 2006. Centro de Estadística Agropecuaria. Sitio: www.siap.sagarpa.gob.mx/Monitor/gas/rsss/redsino6.pdf
- Cortez- Rocha, M. O. 1997. The Occurrence of Fungi in Kansas Corn and Extrusion Processing to Reduce Fumonisin B₁ and Hydrolyzed Fumonisin B₁ in Alkali-Cooked Corn Flour. Ph. D. Dissertation. Kansas State University. Manhattan Kansas.
- Desjardins A. 2006. *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. Ed. American Phytopathological Society. USA.
- Desjardins A., Manandhar H., Plattner R., Manandhar G., Poling S. and Maragos C. 2000. *Fusarium* Species from Nepalese Rice and Production of Mycotoxins and Gibberellic Acid by Selected Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(3): 1020-1025.
- Dombrink- Kurtzman M. 2003. Fumonisin and Beauvericin Induce Apoptosis in Turkey Peripheral Blood Lymphocytes. *Mycopathologia*. 156 (4): 357-364.
- Doyle M., Beuchat L. and Montville T. 2001. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2^oed. Ed. ASM Press. USA.
- Edrington T., Kamps- Holtzapple C., Harvey R., Kubena L., Elissalde M. and Rottinghaus G. 1995. Acute Hepatic and Renal Toxicity in Lambs Dosed with Fumonisin Containing Culture Material. *J. Anim. Sci*. 73: 508-515.
- Edwards S., Pirgozliev R., Hare M. and Jenkinson P. 2001. Quantification of Trichothecene Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR to Determine Efficacies of Fungicides Against *Fusarium* Head Blight of Winter Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (4): 1575-1580.

- Frazier W. and Westhoff D. 1993. Microbiología de los Alimentos. 4^oed. Ed. Trillas. España.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1993. El Maíz en la Nutrición Humana. Roma. Sitio: www.fao.org/docrep/T0395s/T039500.htm#Contents
- FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2007. Sitio: www.faostat.fao.org
- Fotso J., Leslie J. and Smith J. 2002. Production of Beauvericin, Moniliformin, Fusaproliferin, and Fumonisin B₁, B₂, and B₃ by Fifteen Ex Type Strains of *Fusarium* Species. Applied and Environmental Microbiology. 68 (10): 5195-5197.
- Gil M. 2003. Detección y Cuantificación de Fumonisina B₁ y su Hidrolizado en Harina de Maíz Nixtamalizado. Tesis de Maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.
- González U. 1995. El Maíz y su Conservación. Ed. Trillas. México.
- Gupta S., Krasnoff S., Underwood N., Renwick J. and Roberts D. 1991. Isolation of Beauvericin as an Insect Toxin From *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Mycopathologia. 115 (3): 185-189.
- Hamill R., Higgins E., Boag M. and Gorman M. 1969. The Structure of Beauvericin, a New Desispeptide Antibiotic Toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Letters. 49: 4255-4258.
- Harnois D., Que F., Celli A., LaRusso N. and Gores G. 1997. Bcl-2 is Overexpressed and Alters the Threshold for Apoptosis in a Cholangiocarcinoma Cell Line. Hepatology. 26 (4): 884-890.
- Hernández J. y García P. 1998. Aislamiento de Teleomorfos de Muestras Clínicas. Rev Iberoam Micol. 15: 235-242.
- Humpf H., Schmelz E., Meredith F., Vesper H., Vales T., Wang E., Menaldino D. Liotta D. and Merrill A. H. Jr. 1998. Acylation of Naturally Occurring and Synthetic 1- Deoxysphinganine by Ceramide Synthase. J. Biol. Chem. 273 (30): 19060-19064.
- Jestoi M., Rokka M., Yli-Mattila T., Parikka P., Rizzo A. and Peltonen K. 2004. Presence and Concentrations of the *Fusarium*- Related Mycotoxins Bauvericin, Enniatins and Moniliformin in Finnish Grain Samples. Food Addit Contam. 21(8) 794-802.

- Jow G., Chou C., Chen B. and Tsai J. 2004. Beauvericin Induces Cytotoxic Effects in Human Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Through Cytochrome C Release, Caspase 3 Activation: The Causative Roll of Calcium. *Cancer Lett.* 216 (2): 165-173.
- Jurjevic Z., Solfrizzo M., Cvjetkovic B., De Girolamo A. and Visconti A. 2002. Occurrence of Beauvericin in Corn from Croatia. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (2): 91-94.
- Kamyar M., Kouri K., Rawnduzi P., Studenik C. and Lemmens Gruber R. 2006. Effects of Moniliformin in Presence of Cyclohexadepsipeptides on Isolated Mammalian Tissue and Cell. *Toxicol in vitro.* 20 (8): 1284-1291.
- Kedera C.J., Leslie J. F. and Claffin L. E. 1994. Genetic Diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in Individual Maize Stalks. *Phytopathology.* 84: 603-607.
- Kim M., Seong S., Seoh J., Han T., Song H., Lee J., Shin J., Lim B. and Kang J. 2002. *Orienta tsutsugamushi* Inhibits Apoptosis of Macrophages by Retarding Intracellular Calcium Release. *Infection and Immunity.* 70 (8): 4692-4696.
- Klaric M., Pepeljnjak S., Rumora L. and Ljubanovic D. 2007. Cytotoxicity and Apoptosis Induced by Fumonisin B₁, Beauvericin and Ochratoxin A in Porcine Kidney PK15 Cells: Effects of Individual and Combined Treatment. *Arch Toxicol.* En Prensa.
- Klaric M., Pepeljnjak S., Domijan A. and Petrik J. 2006. Lipid Peroxidation and Glutation Levels in Porcine Kidney PK15 Cells After Individual and Combined Treatment with Fumonisin B₁, Beauvericin and Ochratoxin A. *Journal Compilation.* 100: 157-164.
- Klaric M. and Pepeljnjak S. 2005. Beauvericin: Chemical and Biological Aspects and Occurrence. *Arh High Rada Toksikol.* 56 (4): 343-350.
- Kouri K., Duchon M. and Lemmens Gruber R. 2005. Effects of Beauvericin on the Metabolic State and Ionic Homeostasis of Ventricular Myocytes of the Guinea Pig. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 1661- 1668.
- Kouri K., Lemmens M. and Lemmens Gruber R. 2003. Beauvericin Induces Channels in Ventricular Myocytes and Liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1609 (2): 203: 210.
- Krska R., Josephs R., Schuhmacher R. and Grasserbauer M. 1999. A Rapid Method for the Determination of the *Fusarium* Mycotoxin Beauvericin in Maize. *Fresenius J. of Anal. Chem.* 363: 130-131.

- Krska R., Lemmens M., Schuhmacher R., Grasserbauer M., Pronczuk M., Wisniewska H. and Chelkowski J. 1996. Accumulation of the Mycotoxin Beauvericin in Kernels of Corn Hybrids Inoculated with *Fusarium subglutinans*. J. Agric. Food Chem. 44: 3665- 3667.
- Lacey J. 1989. Pre- and Post- harvest Ecology of Fungi Causing Spoilage of Foods and Other Stored Products. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplementary :11S-25S.
- Leslie J., Summerell B. and Bullock S. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ed. Blackwell Publishing, United States.
- Leslie J., Zeller K., Logrieco A., Mule G., Moretti A. and Ritieni A. 2004. Species Diversity of and Toxin Production by *Gibberella fujikuroi* Species Complex Strains Isolated from Native Prairie Grasses in Kansas. Applied and Environmental Microbiology. 70 (4): 2254-2262.
- Leslie J., Salleh B. and Summerell B. 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. Plant Disease. 87 (2): 117- 128.
- Lin H., Lee Y., Chen B., Tsai M., Lu J., Chou C. and Jow M. 2005. Involvement of Bcl-2 Family, Cytochrome C and Caspase 3 in Induction of Apoptosis by Beauvericin in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. Cancer Lett. 230 (2): 248-259.
- Logrieco A., Rizzo A., Ferracane R. and Ritieni A. 2002. Occurrence of Beauvericin and Enniatins in Wheat Affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. Applied and Environmental Microbiology. 68 (1): 82- 85.
- Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kostecki M., Golinski P., Ritieni A. and Chelkowski J. 1998. Beauvericin Production by *Fusarium* Species. Applied and Environmental Microbiology. 64 (8): 3084- 3088.
- Logrieco A., Moretti A., Fornelli F., Fogliano V., Ritieni A., Caiaffa M., Randazzo G., Bottalico A. and Macchia L. 1996. Fusaproliferin Production by *Fusarium subglutinans* and its Toxicity to *Artemia salina*, SF-9 Insect Cells, and IARC/LCL 171 Human B Lymphocytes. Applied and Environmental Microbiology. 62 (9): 3378-3384.
- Logrieco A., Moretti A., Altomare C., Bottalico A. and Carbonell E. 1993 a. Occurrence and Toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian Maize. Mycopathologia. 122 (3): 185-190.
- Logrieco A., Moretti A., Ritieni A., Chelkowski J., Altomare C., Bottalico A. and Randazzo G. 1993 a. Natural Occurrence of Beauvericin in Preharvest

Fusarium subglutinans Infected Corn Ears in Poland. J. Agric. Food Chem. 41: 2149-2152.

- Marasas W., Riley R., Hendricks K., Stevens V., Sadler T., Waes J., Missmer S., Cabrera J., Torres O., Gelderblom W., Allegood J., Martínez C., Maddox J., Miller J., Starr L., Sullards M., Roman A., Voss K., Wang E. and Merrill A. 2004. Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and *in vivo*: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. Journal of Nutrition. 134: 711-716.
- Melcion D., Cahagnier B. and Richard Molard D. 1997. Study of the Biosynthesis of Fumonisin B₁, B₂ and B₃ by Different Strains of *Fusarium moniliforme*. Letters in Applied Microbiology. 24: 301-305.
- Molina D. 2003. Detección de las Especies de Hongos del Género *Fusarium* y Cuantificación de Fumonisin B₁ en Maíz. Tesis de Maestría. Depto. De Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.
- Monti S., Fogliano V., Logrieco A., Ferracane R. and Ritieni A. 2000. Simultaneous Determination of Beauvericin, Enniatins, and Fusaproliferin by High Performance Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem. 48: 3317-3320.
- Moreno E. 1988. Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Munkvold G., Stahr M., Logrieco A., Moretti A. and Ritieni A. 1998. Occurrence of Fusaproliferin and Beauvericin in *Fusarium*-Contaminated Livestock Feed in Iowa. Applied and Environmental Microbiology. 64 (10): 3923- 3926.
- Munkvold G. and Desjardins A. 1997. Fumonisin in Maize: Can we Reduce Their Occurrence? Plant Dis. 81 (6): 556-565.
- Nash P., Purner M., Leon R., Clarke P., Duke R. and Curiel T. 1998. *Toxoplasma gondii* Infected Cells are Resistant to Multiple Inducers of Apoptosis. Journal of Immunology. 160: 1824-1830.
- Nava G. 1995. Determinación de Aflatoxina B₁ en Tortilla de Maíz que se Expende en la Ciudad de Hermosillo Sonora. Tesis de Lic. Departamento de Ciencias Químico- Biológicas. Universidad de Sonora.
- Ojcius D., Zychlinsky A., Zheng L. and Young J. 1991. Ionophore Induced Apoptosis: Role of DNA Fragmentation and Calcium Fluxes. Exp Cell Res. 197 (1): 43-49.

- Ovchinnikov Y., Ivanov V. and Mikhaleva I. 1971. The Synthesis and Some Properties of Beauvericin. *Tetrahedron Letters*. 2: 159-162.
- Paciolla A., Mule R., Logrieco G., Dipierro, N. and Dipierro, S. 2004. The Mycotoxins Beauvericin and T-2 Induce Cell Death and Alteration to the Ascorbate Metabolism in Tomato Protoplast. *Physiol Mol Plant Pathol*. 65 (1): 49-56.
- Palencia E., Torres O., Hagler W., Williams L. and Riley R. 2003. Total Fumonisin are Reduced in Tortillas Using the Traditional Nixtamalization Method of Mayan Communities. *Journal of Nutrition*. 133: 3200-3203.
- Plattner R., and Nelson P. 1994. Production of Beauvericin by a Strain of *Fusarium proliferatum* Isolated from Corn Fodder for Swine. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (10):3894-3896.
- Pitt J. and Hocking A. 1999. *Fungi and Food Spoilage* 2° ed. Ed. Aspen Publisher Inc. USA.
- Pitt J. and Hocking A. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Ed. Academic Press. Australia.
- Pocsfalvi G., Di Landa G., Ferranti P., Ritieni A., Randazzo G. and Malorni A. 1997. Observation of Non Covalent Interactions Between Beauvericin and Oligonucleotides Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 11 (3): 265-272.
- Prescott L., Harley J. and Klein D. 1990. *Microbiology*. Ed. Wm. Brown Publishers. USA.
- Ramírez W. 2000. Presencia y Distribución de *Fusarium moniliforme* en Maíz (*Zea mays*) Cosechado en el Río Sonora, Centro y Sur de Sonora y Determinación de Fumonisina B₁. Tesis de Maestría. Depto. de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.
- Rheeder J., Marasas W. and Vismer H. 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2101-2105.
- Rosas E. C., Castorena M., Cienfuegos V., Sánchez R., Moreno G., y Cortez-Rocha M. O. 2006. Análisis de la Micobiota y Fumonisin Presentes en Maíz Recién Cosechado en el Estado de Sonora. *Biotecnia*. 8 (2): 41-48.
- Rosas J. L. 2003. Actividad Biológica de los Exudados y Filtrado Crudo de *Hirsutella thompsonii* Fisher (Cepa HtM 1201) Sobre *Tetranychus urticae* Koch y otros Artópodos. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias. Área Biotecnología. Universidad de Colima.

- Ritieni A., Moretti A., Logrieco A., Bottalico A., Randazzo G., Monti S., Ferracane R. and Fogliano V. 1997. Occurrence of Fusaproliferin, Fumonisin B₁ and Beauvericin in Maize from Italy. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4011- 4016.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2005. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Sitio: www.sagarpa.gob.mx
- Sauer D. and Burroughs R. 1986. Desinfection of Seed Surface with Sodium Hypochlorite. *Phytopathology.* 76: 745-749.
- Shephard G., Sewram V., Nieuwoudt T., Marasas W. and Ritieni A. 1999. Production of the Mycotoxins Fusaproliferin and Beauvericin by South African Isolates in the *Fusarium* Section *Liseola*. *J. Agric. Food Chem.* 47 (12): 5111-5115.
- Suárez M. 2005. Efecto de Compuestos Naturales Sobre el Crecimiento y Producción de Fumonisina B₁ en *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora.
- Thakur R. and Smith S. 1997. Liquid Cromatography/Thermospray/Mass Spectrometry Analysis of Beauvericin. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1234- 1239.
- Tang C., Chen Y., Jow G., Chou C. and Jeng C. 2005. Beauvericin Activates Ca⁺² Activated Cl⁻ Currents and Induces Cell Deaths in *Xenopus oocytes* via Influx of Extracellular Ca⁺². *Chem. Res. Toxicol.* 18 (5): 825-833.
- Tomoda H., Huang X., Cao J., Nagao R., Okuda S., Tanaka H., Omura S., Arai H. and Inoue K. 1992. Inhibition of Acyl CoA: Cholesterol Acyltransferase Activity by Cyclodepsipeptide Antibiotics. *J. Antibiot.* 45 (10): 1626-1632.
- Torres A., Reynoso M., Rojo F., Ramírez M. and Chulze S. 2001. *Fusarium* Species (Section *Liseola*) and its Mycotoxins in Maize Harvested in Northern Argentina. *Food Addit Contam.* 18 (9): 836-843.
- USDA. 2007. United States Department of Agriculture. Informe mensual de Granos. Sitio:www.adnmundo.com/contenidos/comercio/informe_usda_granos_ce_110507.html
- USDA. 1999. United States Department of Agriculture. Grain Fungal Diseases and Mycotoxin Reference.
- White P. and Johnson L. 2003. Corn: Chemistry and Technology. 2^oed. Ed. AACC. USA.

- Wu S., Chen H., Liu Y. and Chiang H. 2002. Block of L- Type Ca^{+2} Current by Beauvericin, a Toxic Cyclopeptide, in the NG108-15 Neuronal Cell Line. *Chem. Res. Toxicol.* 15 (6): 854-860.
- Zhan J., Burns A., Liu M., Faeth S. and Gunatilaka L. 2007. Search for Cell Motility and Angiogenesis Inhibitors with Potential Anticancer Activity: Beauvericin and other Constituents of two Endophytic Strains of *Fusarium oxysporum*. *J. Nat. Prod.* 70 (2): 227-232.
- Zhang L., Yan K., Zhang Y., Huang R., Bllan J., Zheng C., Sung H., Chen Z., Sun N., An R., Min F., Zhao W., Zhuo Y., You J., Song Y., Yu Z., Liu Z., Yang K., Gao H., Dai H., Zhang X., Wang J., Fu C., Pei G., Liu J., Zhang S., Goodfellow M., Jiang Y., Kuai J., Zhou G. and Chen X. 2007. High- throughout Synergy Screening Identifies Microbial Metabolites as Combination Agents for the Treatment of Fungal Infections. *PNAS.* 104 (11): 4606-4611.

ANEXO I

Preparación de Medios de Cultivo

Agar Malta Sal (MSA). Para la preparación de un litro de este medio se requieren 20 g de extracto de malta, 15 ó 20 g de agar, y dependiendo de las especies de hongos que se desee aislar se le agrega de 40 a 150 g de cloruro de sodio. El medio de cultivo MSA al 4 ó 6% de sal, permite aislar prácticamente a la mayoría de hongos que invaden a los granos y semillas, tanto hongos de campo como hongos de almacén. La alta presión osmótica de los medios con alto contenido de sal (10 ó 15% de NaCl) inhibe el desarrollo de ciertos hongos (*Rhizopus* y *Mucor*) y limita el de otros, facilitando el desarrollo de los hongos de los grupos *A. glaucus* y *A. restrictus*. Las especies del grupo *A. glaucus* son las más comunes en los granos almacenados. Además el cloruro de sodio inhibe la germinación de los granos, facilitando las tareas de cuantificación de granos invadidos y la identificación de los hongos. Si se quiere aislar la mayoría de los hongos que normalmente se encuentran en los granos e ingredientes de los alimentos para animales, es necesario emplear diferentes medios de cultivo. Sin embargo, para aislar la microflora que comúnmente deteriora los productos almacenados y que presenta un riesgo potencial como toxígeno, el usar uno o dos medios, de acuerdo a la experiencia personal del micólogo, es suficiente.

En cuanto a la calidad de la sal se recomienda usar grado técnico. Uno de los problemas que frecuentemente se tienen para la cuantificación e identificación de los hongos en las cajas Petri, es que las colonias de éstos se juntan y

sobreponen. David Sauer del U. S. Grain Marketing and Research Laboratory de Manhattan, Kansas, recomendó la adición de 0.2 ml de tergitol NPX para limitar el crecimiento de las colonias del medio de cultivo, quedando éstas pegadas a los granos, sin cambiar las características morfológicas esenciales para su identificación (Moreno, 1988).

Agar Hoja de Clavel (CLA). Es un medio natural preparado asépticamente, en donde se prepara agar agua 2% (20 g de agar en 1 L de H₂O) y se colocan piezas de hojas de clavel estériles de 3 a 5 mm² en una caja Petri. Generalmente se añade una pieza de hoja de clavel por 2 ml de medio. En una caja Petri de 60 mm de diámetro se añaden de 5 a 6 piezas y en una caja de 100 mm de diámetro de 10 a 12 piezas.

Las piezas de hojas de clavel se preparan de hojas frescas libres de residuos de fungicidas o insecticidas. Inmediatamente después de la recolección, las hojas se cortan en pedazos de 5 a 8 mm² (se encogen después del secado) y se secan en una estufa de aire forzado (~ 70° C) durante 3 a 4 horas. Las hojas de clavel también pueden ser secadas en un horno microondas; el tiempo de secado varía dependiendo del horno. Las piezas secas se empaquetan en contenedores de aluminio o policarbonato y se esterilizan por radiación gama (2.5 megarads). Las piezas estériles secas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por más de 12 meses antes de utilizarse.

La mayoría de las especies de *Fusarium* forman esporas entre 6 a 10 días. Las especies que se desarrollan en CLA producen macroconidios que son más

uniformes en tamaño y forma, que aquellas especies que se desarrollan en medios ricos en carbohidratos como PDA o Czapek- Dox. Los macroconidios se desarrollan primeramente en esporodoquios, que normalmente se desarrollan en las hojas de clavel. Los macroconidios formados en esporodoquios se prefieren para cuestiones de identificación, ya que son más consistentes en forma y tamaño que los microconidios aislados de fiálides.

Es más común que los microconidios se desarrollen en las hifas sobre el agar, usualmente, lejos de las hojas de clavel. La formación de microconidios es monofiálides o polifiálides, la presencia de falsas cabezas o cadenas de microconidios y la presencia de clamidosporas puede ser determinado por la examinación directa utilizando un microscopio compuesto (100x), cuando las especies están creciendo en cajas Petri pequeñas de CLA (60 mm diámetro) (Leslie y col., 2006).

Agar Agua 3%. Consiste en 30g de agar en 1 L de agua destilada. Este medio es recomendado para la germinación de conidios de *Fusarium* que serán utilizados para iniciar un cultivo (Leslie y col., 2006).

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

Para preparar este medio a partir de papas naturales se procede de la siguiente manera: se lavan de 200 a 300 gramos de papas, no es necesario

pelarlas, rebánelas y hiérvalas hasta que estén suaves, y exprímalas a través de dos a tres capas de manta delgada (gasa). Reciba el filtrado en un matraz, añada 20g de dextrosa y 20g de agar, afore a un litro. Esterilice el medio 20 minutos a 15 libras de presión. Cuando el medio este casi frío ($\pm 40^{\circ}$ C) viértalo en las cajas de Petri. En este medio de cultivo ciertos hongos, como *Neurospora*, *Mucor* y *Rhizopus*, que frecuentemente son contaminantes en los laboratorios, crecen rápidamente y enmascaran el desarrollo de otros hongos más lentos; otros medios, como el malta sal agar, son menos favorables para estos hongos contaminantes de crecimiento rápido. Para eliminar bacterias se le añade al medio, justo antes de vaciarlo a las cajas Petri, 3 ml de HCl al 1% por litro de medio (Moreno, 1988).

Los conidios formados en PDA no son consistentes en tamaño y forma como los formados en agar hoja de clavel (CLA) o en agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), además de que son menos confiables para utilizarse con fines de identificación. Sin embargo, la morfología de la colonia, pigmentación del medio y rango de crecimiento de la mayoría de las especies de *Fusarium* en PDA son consistentes si el medio es preparado de una manera consistente, y si las cepas provienen de un inóculo estándar y han sido incubadas bajo condiciones estándar. Estas características son utilizadas por lo regular como un criterio secundario para identificación.

PDA es utilizado por varios investigadores para el aislamiento de especies de *Fusarium*. No se recomienda este medio para estos propósitos, ya que varios hongos saprófitos y bacterias también pueden crecer en el medio e interferir con la recuperación de hongos del género *Fusarium* presentes. Si se utiliza PDA para la

recuperación de los hongos provenientes de plantas, entonces se debe reducir la concentración de papa y dextrosa entre un 50 a 75% y añadir antibióticos de amplio espectro para inhibir el crecimiento de bacterias (Leslie y col., 2006).

Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA). Es un medio pobre en nutrientes usado para la identificación y mantenimiento de especies de *Fusarium* y *Cylindrocarpon*. Este medio se prepara agregando 1g de KH_2PO_4 , 1g de KNO_3 , 0.5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g de KCl, 0.2g de glucosa, 0.2g de sucrosa, 20g de agar en 1 L de agua destilada, y esterilizar en autoclave (Leslie y col., 2006).

La degeneración de los cultivos que ocurre comúnmente en medios sintéticos no ocurre en SNA. El medio promueve la esporulación y un buen desarrollo de las células conidiógenas. Sin embargo, la formación de esporodoquios es limitada, la morfología de los macroconidios no es tan uniforme y confiable como lo es en CLA. Los cultivos que se desarrollan en SNA se utilizan principalmente para la examinación de los microconidios. Muchas especies forman clamidosporas más fácilmente en SNA que en CLA (Leslie y col., 2006).

ANEXO II

Características Macroscópicas y Microscópicas de las cepas de *Fusarium* Aisladas

Muestra (clave)	Agar papa dextrosa (PDA)	Agar hoja de clavel (CLA)	Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)	Especie de <i>Fusarium</i>
31-2 (2)	Violeta claro / violeta.	Micro: ovales, y obovoides NO MACRO	Cadenas largas, monofiálides largas	<i>verticillioides</i>
18-2	Durazno/durazno.	Micro:ovales. Macro: poco curvos y curvos; 1-4 septas. Basal: poca muesca. Apical: sin filo e hisopo Nota: 1 a 2 septas, muy chicos para ser macro y muy grandes para ser micro, posibles micro pasando a macro.	Cadenas cortas, polifiálides.	<i>subglutinans</i>
87-4	Café oscuro/café oscuro.	Micro: oval, y obovoide, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas muy largas, monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

119-1	Violeta claro/violeta oscuro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: rectos, poco curvos y curvos; 3 septas. Basal: forma de pie Apical: hisopo y sin filo.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-10	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. 0 a 1 septa. Macro: delgados y normales; 3, 5 septas; curvos, rectos. Apical: gancho, sin filo. Basal: forma de pie	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-4 (2)	Crecimiento anormal.	Micro: oval y obovoide. Macro: curvo, poco curvo y recto, 3 septas. Apical: sin filo y gancho. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas cortas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-1	Rosa/violeta claro.	Micro: oval y obovoide NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

31-2	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoide. 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-5 (2)	Rosa/violeta claro.	Micro: oval y obovoide. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-4	Durazno claro/ café-violeta.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo y gancho. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-6 (2)	Rosa/ violeta.	Micro: ovales y obovoides. Macro: curvo, poco curvos y rectos, 3 a 4 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: forma de pie y poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-7 (2)	Rosa/ café-violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

		muesca y pie alargado.		
12-4	Rosa-gris/ violeta oscuro-gris.	Micro: ovales y obovoides Macro: recto, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
119-9	Rosa/ violeta-naranja.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: forma de pie y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides	<i>proliferatum</i>
119-2	Rosa- naranja/ violeta con rosa claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-3 (2)	Rosa/ violeta claro con beige.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Polifiálides y monofiálides.	<i>proliferatum</i>

31-1 (2)	Durazno/ naranja.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas cortas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-9	Rosa/ violeta claro con rosa.	Micro: ovales y obovoides. Macro: curvo, poco curvo y recto, 3 septas. Apical: sin filo e hisopo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
83-2	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
30-2	Durazno/ naranja-violeta-café.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
36-4	Durazno/ beige-violeta.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3-4 septas. Apical: sin filo. Basal:	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

		poca muesca.		
77-2	Durazno/naranja-beige.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septa. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
22-2	Durazno con café/ naranja claro.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas cortas. Monofiálides cortas.	<i>oxysporum</i>
30-1	Durazno/ violeta durazno.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
12-5	Rosa- violeta/ violeta oscuro.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septa. Macro: recto, poco curvo, cortos, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

113-1	Rosa/violeta.	Micro: ovales y obovoides. Macro: casi rectos, 3-4 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: muesca clara y forma de pie.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
64-2	Rosa-morado/ morado fuerte.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas cortas. Monofiálides	<i>verticillioides</i>
63-1	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-8	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: curvo, recto, 3 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
54-1	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septas. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo y	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

		gancho. Basal: forma de pie		
36-2	Durazno/ violeta claro-beige.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y forma de pie.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
30-5	Durazno/ violeta claro-beige.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
13-3	Rosa con violeta al centro/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
87-1	Beige (muy claro)/beige con violeta (muy poco violeta).	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septas. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
119-3	Rosa/ violeta - beige.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
119-10	Rosa con partes violetas/ negro- café.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

18-4	Rosa (con un color morado-verdoso al centro)/ violeta-beige a la orilla.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, grueso, 3 septas. Apical: gancho. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas	<i>verticillioides</i>
121-12	Durazno/violeta claro-beige.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
96-3	Durazno/durazno.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: gruesos y delgados, cortos, poco curvos, 3 septas. Apical: hisopo. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
36-1	Durazno/violeta claro-beige (muy poco violeta).	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal:	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

		poca muesca.		
18-1	Durazno/ violeta-beige.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
18-3	Durazno con violeta al centro/ violeta claro-rosa.	Micro: ovales y obovoides. Macro: delgados, poco curvos, 3 septas. Apical: sin filo y gancho. Basal: poca muesca, forma de pie y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
12-3	Durazno/violeta-beige (muy poco violeta).	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
36-3	Durazno/violeta-beige.	Micro: ovales y obovoides. Macro: largos y delgados, rectos, poco curvos, 3-4 septas. Apical: sin filo y gancho.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

96-1	Durazno/ durazno.	Basal: poca muesca y muesca clara.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: curvo, poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
96-2	Durazno/ durazno-violeta (oscuro-gris al centro).	Micro: ovales y obovoides. Macro: delgado, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Micro: ovales y obovoides. Macro: delgado, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Polifiálides y monofiálides.	<i>proliferatum</i>
2-4	Durazno/ violeta claro-durazno en la orilla.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca y muesca clara.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
2-7	Durazno claro/ violeta claro- beige.	Micro: ovales. NO MACRO	Micro: ovales. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>

83-1	Rosa/ violeta.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>verticillioides</i>
96-6	Rosa/ violeta con la orilla blanca.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: curvo, recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides largas.	<i>proliferatum</i>
96-4	Durazno/ durazno.	Micro: ovales y obovoides NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
2-6	Durazno/violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
2-5	Durazno/ violeta claro- beige.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
2-8	Durazno/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3	Cadenas largas. Polifiálides y monofiálides.	<i>proliferatum</i>

septas.
 Apical: sin
 filo. Basal:
 poca
 muesca.

77-1	Durazno con el centro violeta/ durazno con un poco de violeta al centro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
-------------	--	--	--	----------------------------

Nota: el primer número de la clave pertenece al número de muestra, el segundo al número de caja de Petri y el tercero al número de colonia en la caja de Petri.

ANEXO III

Reporte de la Red Sinóptica de Superficie de Agosto a Diciembre de 2006

Mes	Temperatura °C					Precipitación (mm)		HR (%)	INS (h)	EVAP (mm)	Lluvia (días)	Helada (días)	GRA (días)
	Media	Normal	Anomalía	Máxima	Mínima	Total	Anomalía						
Agosto	33.0	31.5	1.5	43.0	23.5	106.0	31.8	69	203	333	6	0	0
Septiembre	26.4	31.0	-4.6	41.5	20.0	152.0	23.4	69	185	276	7	0	0
Octubre	22.8	ND	ND	41.5	14.0	55.0	11.2	62	180	288	2	0	0
Noviembre	17.2	20.5	-3.3	29.2	13.6	0.0	-9.9	44	169	216	0	0	0
Diciembre	14.1	16.9	-2.8	23.4	3.8	7.0	-27.9	50	178	66	1	0	0

HR: Humedad Relativa

INS: Insolación

EVAP: Evaporación

GRA: Granizo

Fuente: Gerencia del Servicio Meteorológico Nacional, Subdirección General Técnica, CNA, 2006.