

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA Y POR MICOTOXINAS EN LAS
VARIETADES DE MAÍZ ALSA 036W, ALSA 038W, LUCERO 901, LUCERO 807,
P30G40 Y UDG 600”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PRESENTAN:

**P.M.V.Z. JENIFFER LILIANA ARELLANO MUÑOZ
P.M.V.Z. NANCY ESTELA TORRES LAGUNA**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ**

**ASESORES:
M.C. JOSÉ MIGUEL PADILLA GARCÍA
M.C. SILVIA RUVALCABA BARRERA**

CONTENIDO

	Página
Agradecimientos	i
Lista de Tablas	ii
Resumen	iii
INTRODUCCIÓN	1
1. El cultivo de maíz	1
2. Hongos productores de micotoxinas	4
2.1 Micotoxinas	4
2.1.1 Aflatoxinas	6
2.1.2 Ocratoxinas	7
2.1.3 Fumonisinias	9
2.1.4 Tricotecenos	11
2.1.5 Zearalenona	14
3. Prevención y control de micotoxinas	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
1. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> de diferentes híbridos de maíz	22
1.1. Identificación de las especies de <i>Fusarium</i>	23
2. Detección y cuantificación de micotoxinas	25
3. Análisis de la condiciones climatológicas	27

	Página
RESULTADOS	28
1. Porcentaje de infección de las especies de <i>Fusarium</i> de la sección <i>Liseola</i> aisladas de diferentes variedades de maíz	28
1.1. Identificación de las especies de <i>Fusarium</i> de la sección <i>Liseola</i> aisladas de diferentes variedades de maíz	29
2. Contaminación por micotoxinas en las diferentes variedades de maíz	31
3. Condiciones climáticas	33
3.1. Temperaturas registradas durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003	33
3.2. Precipitación pluvial registrada durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003	35
3.3. Humedad relativa (HR) registrada durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003	35
DISCUSIÓN	37
1. Infección por especies de <i>Fusarium</i> en maíz	37
2. Contaminación por micotoxinas en el maíz	38
3. Condiciones climáticas registradas	41
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO I	51
ANEXO 2	52
ANEXO 3	52
ANEXO 4	53
ANEXO 5	54
ANEXO 6	55

AGRADECIMIENTOS

A Dios :

Por quien soy partícipe de este mundo y al que contribuiré con los conocimientos adquiridos. Por permitirme llegar a ésta, una de mis metas... Gracias.

A nuestros Padres :

Teresa Muñoz López

Rubén Arellano Plascencia

Alma Rosa Laguna Urzúa

Miguel Torres Meza

Por ser el medio por el que llegamos a este mundo, por la formación espiritual y moral que nos dieron, con mucho cariño, admiración y respeto, por que a base de sacrificios y esfuerzos nos motivaron a superarnos y con su ayuda fue posible lograr ésta meta anhelada, por la confianza que nos infunden en todo momento e inquietarnos a seguir progresando enfrentando las adversidades como retos pequeños.

A nuestros Amigos :

A NAJECY y compañeros de generación que nos brindaron su amistad, apoyo y confianza para seguir adelante.

A ti ARGELIA LOZANO GONZALEZ por brindarme tu incondicional amistad y confiar en mí, por estar conmigo en todo momento, por compartir tantas alegrías, tristezas y sueños juntas, por ser mi amiga, mi hermana y mi confidente, mil gracias.

A mi hijo JULIAN ANDREE BENITES ARELLANO por ser el mañana de mi esperanza, en quién brilla una nueva estrella que ilumina mi existencia.

A ti MI AMOR por tu ayuda moral y espiritual, en los momentos más difíciles que pase en mi situación personal, te la dedico con mucho amor, aprecio y respeto.

Directora de Tesis :

Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez por el apoyo brindado en la realización de la tesis, compartiendo sus conocimientos y por brindarnos su incondicional apoyo y amistad.

Asesores y H. Jurado :

Dra. Silvia Ruvalcaba Barrera y al M.C. José Miguel Padilla García por su apoyo en el asesoramiento de la tesis. A la Dra. Delia Guillermina González Aguilar, Dr. Mario Noa Pérez y Dr. Manuel Rosales Cortes, por su disponibilidad para formar parte del jurado y sus aportaciones durante la revisión de la tesis.

Instituciones :

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. División de Ciencias Veterinarias.

El Area de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública, CUCBA.

Por su apoyo de instalaciones, equipo y personal docente que contribuyeron en nuestra formación profesional.

LISTA DE TABLAS

Cuadro No.	Página
1. Micotoxinas representativas de las principales categorías biosintéticas de metabolitos secundarios	5
2. Niveles máximos de micotoxinas toleradas en los cereales y en alimentos a base de maíz para consumo animal	17
3. Características diagnósticas de las especies de <i>Fusarium</i> Sección <i>Liseola</i>	24
4. Incidencia de <i>Fusarium</i> (Sección <i>Liseola</i>) en muestras de diferentes híbridos cosechados en una localidad del estado de Jalisco.	28
5. Caracterización morfológica y cultural de las cepas de <i>Fusarium</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz	31
6. Niveles de contaminación por deoxinivalenol en las variedades de maíz estudiadas	32
7. Niveles de contaminación por fumonisinas en las variedades de maíz estudiadas	32
8. Niveles de contaminación por ocratoxinas en las variedades de maíz estudiadas	33
9. Temperaturas máximas, promedio y mínimas registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003. . .	34
10. Precipitación pluvial registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003	35
11. Humedad relativa registrada en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003	36

RESUMEN

Las especies de hongos del género *Fusarium* destacan por su capacidad productora de micotoxinas, entre las cuales se encuentran las fumonisinas, los tricotecenos y la zearalenona. El maíz es el sustrato ideal para el desarrollo de estas especies, por lo que es frecuente encontrar niveles de micotoxinas en este cereal. Además durante el almacenamiento pueden incrementarse los niveles de las micotoxinas o bien generarse nuevas como las aflatoxinas y ocratoxinas, producidas por otros géneros de hongos. El presente estudio tuvo como propósito evaluar el porcentaje de contaminación por especies de *Fusarium* en distintas variedades de maíz que se cultivan en el estado de Jalisco, además de analizar la presencia de micotoxinas al término de la cosecha. Para lo cual se obtuvieron muestras de 6 variedades de maíz cosechadas en parcelas experimentales del CUCBA durante el cultivo primavera-verano 2003. Se cuantificó el porcentaje de infección por especies de *Fusarium* de acuerdo a las claves taxonómicas descritas por Nelson y col., en 1983. Los niveles de micotoxinas se analizaron mediante cromatografía de inmunoafinidad y detección fluorométrica (Vicam), descrita por Ware y col., en 1994. Se analizaron las condiciones climáticas registradas durante el ciclo de cultivo de 2003 obtenidas en la estación meteorológica cercana a las parcelas. Los resultados se analizaron mediante ANOVA a un nivel de significancia de 0.05. Se encontró contaminación por especies de *Fusarium* en todas las variedades estudiadas (Alsa036W, Alsa038W, Lucero 901, Lucero 807, P30G40 y UDG 600), en un rango de infección de 17 al 100%. La especie predominante fue *Fusarium verticillioides* (68%), seguida por *F. subglutinans* (19%) y *F. proliferatum* (9%). Las determinaciones de micotoxinas en el maíz permitieron observar niveles de contaminación por deoxinivalenol (DON), fumonisinas y ocratoxinas, sin detectarse la presencia de aflatoxinas y zearalenona. Los niveles de DON fueron similares estadísticamente entre variedades ($p > 0.05$), y mostraron niveles promedio entre 2.93 ppm (UDG 600) y 8.16 ppm (P30G40); fumonisinas mostró niveles diferentes entre variedades ($p < 0.05$), la mayor contaminación la presentó la variedad Lucero 807 (10.25 ppm) y la menor se presentó en la variedad Lucero 901 (1.75 ppm); los niveles promedio de ocratoxinas en el maíz fluctuaron de 0.71 ppb (Lucero 807) a 9.68 ppb (Alsa036W), sin encontrarse diferencia estadística entre variedades ($p > 0.05$). De acuerdo a la alta incidencia de especies de *Fusarium* y a la contaminación por DON y fumonisinas en el maíz se considera que existe riesgo de exposición a la salud humana y animal, por lo que deben implementarse medidas preventivas y de control tanto en campo como en almacenamiento para disminuir la presencia de micotoxinas en el maíz, así como recomendar estrategias que permitan reducir el riesgo de exposición al consumo de alimentos balanceados en los animales.

INTRODUCCION

1. El cultivo de maíz

El maíz es uno de los cereales que ocupa a nivel mundial, uno de los primeros lugares en producción y superficie, representa el 5.4% del total de las fuentes alimenticias de la población humana y ocupa el tercer lugar después del trigo y el arroz. En América Latina ocupa un lugar importante, ya que la alimentación se fundamenta en la gama de subproductos que de él se obtienen (28).

Una de las principales características del maíz, es su gran adaptación, ya que se cultiva desde el Ecuador a diferentes latitudes norte a sur; desde el nivel del mar hasta más de 3200 metros sobre el nivel del mar; en suelos y climas muy variables y con una tecnología muy diversa. Las principales regiones en el mundo con mejor productividad son: el cinturón o faja maicera en Estados Unidos con localización principal en Iowa e Illinois, Cuenca del Danubio en Europa, extendiéndose desde el Suroeste de Alemania hacia el Mar Negro, las llanuras del Río Po, en el norte de Italia, las llanuras del norte de China, noreste de Argentina, sureste de Brasil, América Central, noroeste de América del sur y México. Se adapta mejor en suelos húmedos y fértiles, en regiones subtropicales altas, con temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche (64).

Entre los países con mayor volumen de producción se encuentran: Estados Unidos de Norteamérica, China, Brasil, México y Argentina. En México representa el 43% de la superficie cultivada; por su volumen de producción, área cultivada y valor de producción, es el cultivo más importante (64).

Las siembras de maíz en México ocupan una superficie de casi 8 millones de hectáreas con una producción aproximada de 14 millones de toneladas (28).

El estado de Jalisco, ocupa uno de los primeros lugares a nivel nacional en la producción de maíz. Durante el ciclo agrícola primavera-verano 2002, el Estado ocupó el primer lugar, registrando una producción de 3 millones 29 mil 144 toneladas de maíz, en comparación con las 2 millones 870 mil 779 toneladas obtenidas en el ciclo pasado (8).

La producción de maíz durante los últimos años se ha mantenido en los rangos de 2 millones a 2 millones 500 mil toneladas. De acuerdo con la SAGARPA, los principales municipios productores de maíz en Jalisco son: La Barca, Ocotlán, Ayotlán, Ameca, Degollado, Tototlán, Zapopan, Tlajomulco de Zúñiga y Ciudad Guzmán, entre otros.

En México, el maíz es el cultivo más importante y tradicional ya que es base de la alimentación de la población. El consumo per cápita se calcula en 300 gramos por día, que aportan el 56% de las calorías y el 47% de las proteínas en la alimentación del mexicano, en las áreas rurales estos porcentajes son del 76% y 56% respectivamente (28).

La producción de maíz en México se desarrolla predominantemente en el ciclo de cultivo primavera-verano, bajo la modalidad de temporal con una participación de 81.7%, mientras que ciclo otoño-invierno representa el 18.3%. La oferta total de maíz grano en México esta determinada principalmente por la producción nacional y en menor medida por las importaciones, de tal manera que el grano nacional contribuye en promedio con el 86 % de la oferta total.

El maíz se produce prácticamente en todos los estados de la republica, bajo un mosaico de formas y procedimientos productivos con diferentes grados de tecnificación y utilización de una amplia variedad de semillas, que se reflejan en las características del producto (7).

Durante el cultivo, el maíz presenta diversos factores que afectan la calidad y el rendimiento del grano. Entre los factores bióticos, después de los insectos, los hongos son los principales causantes del daño al maíz. La FAO estima que en América Latina las pérdidas por granos dañados varían de 25 a 50 % (28).

La contaminación por hongos en campo, ocasiona invasión a la planta y mazorca provocando roña, manchas y decoloración en el grano, y frecuentemente la infección puede desarrollarse desde las etapas tempranas, produciendo germinación prematura o muerte de la planta.

Después de la cosecha, el grano almacenado bajo condiciones inapropiadas de humedad y temperatura pueden ser susceptible de la contaminación por otras generaciones de hongos, destacando los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*.

El grano rehidratado en el almacén alcanzan contenidos de humedad de 13.5 a 14% que están en equilibrio con una humedad relativa del 70%, esto causa calentamiento, malos olores (moho, fermentación rancia y etílica), aglomeración de granos e inclusive pueden producir incendios.

La contaminación por hongos productores de micotoxinas en los cultivos de cereales y consecuentemente en los granos destinados a nutrición humana y animal es un problema a nivel mundial, que indudablemente se ha hecho más evidente con el mejoramiento de las técnicas analíticas que han permitido identificar a un número cada vez mayor de estas sustancias. Los cereales contaminados con micotoxinas utilizados en nutrición animal, pueden causar no solo pérdidas económicas a los productores agropecuarios, sino también un riesgo en la salud humana por la generación de residuos potencialmente tóxicos transmitidos a través de la formación de toxinas en productos de origen animal que se obtienen de las explotaciones pecuarias (5).

2 Hongos productores de micotoxinas.

Los géneros de hongos considerados de campo requieren altos contenidos de humedad para desarrollarse (20 - 21% en base humedad); invaden y atacan los granos antes de la cosecha. Entre los géneros que conforman este grupo se encuentran: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Fusarium*, este último género es de relevancia por su capacidad productora de micotoxinas (28).

2.1 Micotoxinas

Los metabolitos secundarios de los hongos microscópicos denominados micotoxinas son sintetizados por diferentes vías a partir de uno o más metabolitos provenientes del metabolismo primario del hongo.

Se han realizado diversos intentos para la clasificación de los metabolitos secundarios, entre los que se ha propuesto categorizarlos en base a su origen biosintético, es decir el metabolito primario a partir del cuál se inicia la vía biosintética (74,76).

En base a este criterio podemos clasificar a las micotoxinas en cuatro grupos: a) policétidos, b) terpenos, c) sustancias derivadas del ácido shikímico, d) metabolitos derivados de aminoácidos (Tabla 1). La síntesis de las micotoxinas se realiza mediante reacciones químicas específicas a partir de unos pocos metabolitos primarios: acetil coenzima A, ácido mevalónico, alfa aminoácidos e intermediarios del ácido shikímico. La diversidad estructural se deriva desde unas pocas reacciones químicas: condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación.

Tabla 1. Micotoxinas representativas de las principales categorías biosintéticas de metabolitos secundarios.

Categoría biosintética	Micotoxinas representativas
POLICETIDOS	
DI-	Moniliformina
Tetra-	Patulina, Acido penicilico
Penta-	Citrinina, Ocratoxina
Hexa-	Maltorizina
Hepta-	Rugulosina, viomelleina, xantomegnina
Octa-	Ergocrosmos, luteoskirina
Nona-	Citrioviridina, fumonisinas, zearalenona
Deca-	Aflatoxinas, ácido norsolorínico
ÁCIDO TETRAMICO	
Ácido ciclopiazónico, ácido tenuazónico	
DICETOPIPERAZINAS	
Simples	Ácido aspergílico, equinulinas
Modificadas	Fumitremórgenos, roquefortina, verruculotoxina
PEPTIDOS	
Ergotamina, fomopsinas	
TERPENOS	
Mono-	Viridicatumtoxina
Sesqui-	Tricotecenos
Di -	Penitrems, Alfatrem, janthitrems

El impacto de las micotoxinas en la salud humana y animal es ampliamente reconocido y se estima que causa graves pérdidas económicas a los sectores agropecuarios y de la industria (57).

2.1.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas (Afs) son un grupo de toxinas descubiertas en el año de 1960 después de una intoxicación aguda en Inglaterra conocida como Enfermedad X de los pavos. Se conocen cuatro Afs principales B₁, B₂, G₁, G₂. La Afs B fluorescen cuando se exponen a la luz UV de color azul y los del grupo G de color verde.

Son producidos principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. La susceptibilidad de los animales a las Afs varían de acuerdo a la especie, raza, edad y estado nutricional del animal considerado. Los más susceptibles son los pollos, patos y cerdos mientras que las cabras, ratas, ratones y vacunos son menos susceptibles (29).

La respuesta biológica a las Afs B₁ en términos de genotoxicidad y citotoxicidad parecen dependientes de la formación metabólica del compuesto exo-8,9-epóxido de AFB₁ que le permite unirse covalentemente al DNA, RNA, proteínas y otras moléculas. La unión con el DNA produce la sobreexpresión de un cierto grupo de oncogenes, proceso presumiblemente involucrado en la inducción de tumores malignos en tejidos blancos. Además las Afs principalmente conocidas como hepatotóxicas y hepatocarcinógenas, poseen numerosos efectos inmunosupresivos (53).

Existen suficientes evidencias para involucrar a las Afs en la producción de cáncer hepático en el mundo (44,58). En 1987, la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (36), declaró a las AFB₁ como un carcinógeno de clase 1 sobre la base de ensayo en los animales. Los estudios sobre los posibles casos de

aflatoxicosis en humanos han sido informados en muchos países en el sureste de Asia y África (44, 58, 77).

Los primeros signos clínicos de intoxicación crónica en aves y mamíferos son malestar general acompañado de pérdida del apetito y del peso corporal; aunque estos signos clínicos no conducen a un diagnóstico específico. En observaciones patológicas de bajos niveles de intoxicación, revelan ictericia generalizada y cirrosis hepática con proliferación celular de los conductos biliares y fibrosis periportal. En los casos de intoxicación aguda se manifiesta ictericia de las membranas mucosas, hemorragias diseminadas, acumulación de ácidos grasos en hígado. La patología hepática es la principal característica en la mayoría de las especies ensayadas, asociado con un aumento en los niveles de fosfatasa alcalina sérica, lo cual constituye un buen indicador del mal funcionamiento hepático asociado con aflatoxicosis (63).

2.1.2 Ocratoxina

La segunda micotoxina en importancia después de las aflatoxinas son las ocratoxinas. Si bien se han aislado un amplio rango de metabolitos derivados de ocratoxina como OB, solo la OA ha sido detectada en productos agrícolas. Esta toxina es producida principalmente por *P. verrucosum* en regiones de clima cálido y templado; y por algunas especies de *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotium*, *A. mellus*) en regiones de clima tropicales (24, 78).

En muchos casos se ha detectado a OA en co-ocurrencia con citrinina, donde esta ocurre en niveles superiores. Las especies productoras de esta toxina son *P. citrinum*, *P. verrucosum* y *P. viridicatum*.

Los órganos principalmente afectados durante la ocratoxicosis son hígado y riñón. En el hígado, ataca al retículo endoplásmico de los hepatocitos produciendo degeneración hialina y necrosis focal junto una infiltración grasa. En riñón se produce

necrosis epitelial en los túbulos proximales, acompañada por cambios degenerativos del núcleo y engrosamiento de la membrana basal. Los riñones aumentan de tamaño, el color es pálido, aparecen quistes y focos fibrosos. Este síndrome se presenta en cerdos, gallinas ponedoras y pollos de engorda y su presentación puede ser por intoxicación aguda, los animales aparecen deprimidos, con anorexia, paresia, edema perineal en verracos, ascitis, hidrotórax, edemas subcutáneos y mesentéricos.

En la intoxicación crónica por OA se disminuye el apetito y el crecimiento de los animales, aumenta el consumo de agua y aparece poliuria. Se encuentran residuos de ocratoxina A (OA) en hígado, riñón, grasa y carne. (61) En pollos los síntomas varían dependiendo de la dosis, con diarreas, disminución del peso y de la velocidad de crecimiento y rechazo del alimento. En las aves ponedoras, la ocratoxicosis retrasa la madurez sexual, disminuye la producción de huevos estos son pequeños y de cascarón delgado, con aspecto de caucho y frágiles, rompiéndose con frecuencia (39).

La OA tiene efecto sinérgico con la actividad inmunosupresora de las aflatoxinas. Ambas micotoxinas combinadas pueden producir anemia, hipoproteinemia, linfocitopenia, heterofilia, disminución del peso de la bolsa de fabricio y disminución de la actividad del complemento. Disminuye el número de células productoras de inmunoglobulinas en los órganos linfoides y de los niveles circulantes (42).

La OA produce efectos nefrotóxicos en todas las especies monogástricas, incluso a dosis de 200 ppb en alimentos. Se observaron efectos teratogénicos en ratones expuestos a dosis de 3 mg/kg de peso corporal administrados vía oral, estos se acentuaron con una ración baja en proteínas, en ratas que recibieron por vía oral dosis de 0.75 mg/kg de peso corporal se observó resorción fetal. La OA es inhibidora de la síntesis de proteínas y de la sintetasa del ARNt en microorganismos. (12). El consumo de alimentos contaminados con OA ha sido asociado con la nefropatía endémica de los Balcanes, estudios más recientes proveen evidencias de que esta

toxina puede estar involucrada en patologías renales en humanos en muchos países (30, 40). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (37), clasificó a esta toxina como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) solo en base a suficientes evidencias en la producción de carcinogenicidad en animales de laboratorio.

2.1.3 Fumonisinias

Las fumonisinias (FBs) constituyen una familia de micotoxinas producidas principalmente por dos especies de la sección *Liseola*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Estas especies son las de mayor importancia e infectan con gran frecuencia los cultivos de maíz en todo el mundo (67). Otras especies relacionadas: *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. anthophilum* y *F. diamini* son consideradas productoras de estas toxinas (67). Las FBs fueron aisladas por un grupo de investigadores a partir de cultivos de la cepa *F. moniliforme* (*F. verticillioides*) MRC 826 (25). Su aislamiento se realizó a raíz de la muerte de caballos principalmente en Nueva Caledonia, que padecían leucoencefalomalacia y un elevado índice de cáncer esofágico en el sur de África. Estos dos grupos de trabajo en Sudáfrica y en Nueva Caledonia en forma independiente aislaron la fumonisina más abundante fumonisina B₁ (FB₁) a partir de este alimento.

Hasta el momento se han aislado y purificado diez tipos de fumonisinias, denominadas fumonisinias A₁ (FA₁), A₂ (FA₂), B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), B₃ (FB₃), B₄ (FB₄), C₁ (FC₁), C₂ (FC₂), C₃ (FC₃), C₄ (FC₄). Las FBs correspondientes a la serie B y C son contaminantes naturales en alimentos a base de maíz para consumo humano y animal (59). Mientras que las de la serie A, son formadas únicamente durante el proceso de purificación (60, 71).

Las FBs son claramente la causa de varias enfermedades en animales, tanto naturales como inducidas experimentalmente (67). Estas toxinas están asociadas con la leucoencefalomalacia equina (ELEM) y el síndrome de edema pulmonar porcino (PPE) (10), actividad inmunosupresora en aves de corral (53), cáncer de

hígado en ratas (26) y recientemente se la relacionó con un aumento en el riesgo de cáncer de esófago en humanos (EC), que consumen maíz contaminado (65, 73). También FB_2 y FB_3 son promotoras de cáncer con una actividad similar en hígado de ratas (27). La Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC); recientemente evaluó a las toxinas derivadas de *F. verticillioides* como grupo 2B o posibles carcinógenos en seres humanos (38).

La Leucoencefalomalacia equina (ELEM), es una enfermedad neurotóxica equina, caracterizada por una necrosis multifocal de la materia blanca de uno de los hemisferios bajos del cerebro. Es una de las micotoxicosis más comunes relacionadas a las FBs. El síndrome se asocia al consumo de alimentos contaminados con FB_1 y FB_2 , producidas especialmente por *F. verticillioides*. El examen histopatológico de los animales intoxicados revela frecuentemente la presencia de lesiones hepáticas y renales como también focos hemorrágicos en los hemisferios cerebrales y en otras partes del sistema nervioso central como bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal (47). Ante la falta de recomendaciones, miembros del Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, a través del Laboratorio de Diagnóstico recomiendan no destinar a equinos, alimentos con un contenido de FB_1 superior a 5 ppm (20, 51, 66).

El síndrome de edema pulmonar porcino (PPE), es una enfermedad inusual en esta especie animal, se caracteriza por dificultad respiratoria, postración y eventual muerte del animal. Las necropsias de los animales afectados se caracterizan por presentar un severo edema de pulmón e hidrotórax (31, 51). El PPE está asociado al consumo de maíz y especialmente a los desperdicios de maíz constituidos por granos rotos, restos de tallos, paja y otros residuos, contaminados con *F. verticillioides* y FBs. Según Ross (1994), la morbilidad de la enfermedad varía entre 5 y 50% con una mortalidad mayor al 50%, y el curso clínico agudo varía entre 1 y 2 días (50). Otros órganos susceptibles a la acción de las FBs en cerdos son hígado y páncreas. Si bien todavía no hay una regulación oficial para FBs, el Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, a través del Laboratorio de Diagnóstico

recomienda no destinar a cerdos alimentos con un contenido de FB_1 superior a 10 ppm (20, 48, 66).

El consumo de dietas contaminadas con *F. verticillioides* en pollos de engorda, se asocia a la producción de cambios funcionales en las aves como: necrosis hepática multifocal, hiperplasia biliar, reducción en el peso corporal, de hígado y bazo, anomalías esqueléticas (arqueamiento de patas), alteración en los parámetros bioquímicos y elevada mortalidad (15). En pavos se han observado alteraciones en el miocardio. El Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, recomienda no destinar para el consumo de aves de corral alimentos con un contenido de FB_1 superior a 50 ppm (20, 66).

Debido al elevado índice de cáncer de esófago en la población de Transkei, Sudáfrica, se estudió la relación entre consumo de maíz y la presencia de *F. verticillioides*. Además este cereal constituye el alimento básico (90%) de la población de esa zona. Varios estudios mostraron que FB_1 podría ser responsable del cáncer esofágico, junto a otros factores predisponentes como el hábito de fumar, el consumo de alcohol, la dieta rica en maíz y las deficiencias nutricionales (23). El rango de concentración reportado por presentación natural en maíz asociado con cáncer esofágico es de 0.0 a 10500 ng/g (ppb) en maíz considerado como "sano" y entre 600 y 63200 ng/g en maíz obviamente "mohoso" (33). Los niveles de fumonisinas en alimentos de animales asociados con brotes de leucoencefalomalacia equina se encuentran entre 1300 y 150000 ng/g de FB_1 , 100 y 23 000 ng/g de FB_2 , mientras que los niveles asociados con el edema pulmonar porcino son 105000 a 155000 ng/g de FB_1 (32).

2.1.4 Tricotecenos

Los tricotecenos son una familia de epoxisesquiterpenos, producidos por numerosas especies del género *Fusarium* y otros géneros fúngicos relacionados (*Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Verrucaria*), estos se pueden encontrar como

contaminantes naturales en distintos productos de origen agrícola, fundamentalmente trigo y maíz. Su nombre deriva de *Trichothecium roseum*, a partir del cual se aisló en el año de 1984, el primer miembro del grupo, el tricotecin. Estas toxinas son potentes inhibidores de la síntesis proteica en organismos eucariotas incluyendo animales, hongos y plantas. El interés reside en su toxicidad y en el hecho de que la contaminación de las cosechas, alimentos e insumos para animales es un problema permanente y de alcance mundial (13).

Los tricotecenos de *Fusarium* son alcoholes relativamente simples y ésteres de cadena corta; y se ha propuesto una clasificación en cuatro grupos: A, B, C y D. Por su incidencia natural y asociación con micotoxicosis en seres humanos y animales, los grupos A y B son los de mayor significancia. Pertenecen al grupo A: toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2), diacetoxiscirpenol (DAS) y neosolaniol (NEO). Pertenecen al grupo B: deoxinivalenol (DON, vomitoxina), 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON), 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON), nivalenol (NIV) y furasenona X (FX).

Todas las especies animales que han sido expuestas parecen ser susceptibles a los tricotecenos, micotoxinas capaces de producir una amplia variedad de efectos tóxicos (68). Los síntomas de enfermedad varían ampliamente según la especie animal y el tricoteceno particular de que se trate, los niveles y las vías de exposición. Experimentos llevados a cabo con tricotecenos químicamente puros a bajas dosis, han reproducido varios de los aspectos observados en las toxicosis asociadas con la ingesta de granos enmohecidos incluyendo: anemia e inmunosupresión, hemorragias, emesis y rechazo de alimento en ganado porcino, vacuno y aves de corral. Los cerdos y otros animales monogástricos (incluyendo los humanos) son los más sensibles a estas toxinas, los pollos y los patos, son los más tolerantes, seguidos por los rumiantes (70).

La experimentación con animales ha demostrado que estas toxinas son teratogénicas, inhibidoras de la síntesis proteica y potentes inmunosupresores, predisponiendo a los animales a otras enfermedades (56). En general, en todas las

especies que sufren síntomas de intoxicación por tricotecenos, se produce una excelente recuperación cuando el alimento contaminado es retirado de la ración.

En pollos y pavos se necesitan altos niveles de tricotecenos para lograr una respuesta tóxica. El consumo de T-2 y DAS en forma crónica, inducen reducción en el consumo de alimento y en la ganancia de peso, lesiones orales, necrosis de ciertos tejidos (linfoide, hematopoyético, mucosa gástrica), posibles desordenes neurológicos y plumaje anormal (1).

En 1993, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) en función de la limitada información disponible en seres humanos y animales, determinó que los tricotecenos DON, NIV, FX y T-2 no pueden ser clasificados como carcinógenos para seres humanos, por lo tanto fueron asignados dentro del grupo 3 para la IARC (6).

Los efectos tóxicos ocasionados en animales por DON son reducción de la ganancia de peso, rechazo del alimento, anemia e inmunosupresión. Los cerdos son extremadamente sensibles a esta micotoxina. En pollos se ha observado irritación del tracto gastrointestinal superior, hemorragias, desordenes nerviosos, disfunción renal y respuesta inflamatoria indefinida. Si bien los niveles de contaminación natural con DON en los alimentos avícolas son bajos para producir micotoxicosis, se debe considerar la incidencia de más de una toxina que pueden interactuar potenciando el efecto (41).

En general, bajo condiciones *in vivo* con varios animales domésticos el DON suprime la respuesta inmune normal e induce efectos autoinmunes, con superproducción de citocinas, activación de macrófagos y células T (68).

Los niveles de riesgo varían según la especie animal y es influenciado por la edad y el estado general de salud. Una vez que el alimento contaminado es retirado, el animal retorna a los niveles normales de consumo. Los niveles preventivos para DON recomendados por la FDA son de 1 ppm en los productos de trigo para

consumo humano; 10 ppm para cereales y subproductos destinados para la alimentación del ganado vacuno y aves de corral, que no exceda del 50% del total de la composición del mismo; 5 ppm para cerdos y otras especies como perros y gatos, que no exceda del 20% de la dieta (70).

2.1.5 Zearalenona

Las micotoxinas estrogénicas constituyen una clase importante de estrógenos ambientales. El nombre zearalenona (ZEA) deriva de *Gibberella zeae*, que fue el primer organismo descubierto como productor. Esta toxina es producida principalmente por la especie *F. graminearum*, contaminante común de los cereales e insumos animales: seguida por *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. gibbosum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* y *F. lateridium*. La ZEA causa significantes problemas en las explotaciones pecuarias, particularmente en la producción porcina debido a su contribución a la contaminación ambiental con estrógenos (72).

En cuanto a su mecanismo de acción ZEA actúa como un estrógeno, adoptando una conformación muy similar al 17- β -estradiol y otros estrógenos naturales que le permite unirse a receptores estrogénicos de los tejidos (72).

Los cerdos son los animales más sensibles a los efectos tóxicos de la ZEA, aunque también se han observado síntomas en vacas lecheras, pavos y patos. El hiperestrogenismo es la enfermedad causada principalmente por esta toxina. Los síntomas observados en cerdas son vulvovaginitis, pudiendo progresar a un prolapso vaginal en los casos más severos. También se ha observado atrofia de los ovarios, con aumento de tamaño y edema en útero y glándulas mamarias. En machos jóvenes, esta toxina produce síntomas de feminización: engrosamiento de prepucio, atrofia testicular y desarrollo de las glándulas mamarias.

En machos maduros no se ve afectado el potencial reproductivo. Estos efectos adversos han sido observados con concentraciones de ZEA de 10 a 20 ppm: niveles más elevados (25 a 100 ppm) producen estros continuos, estados de pseudopreñez e infertilidad. Debido a la alta sensibilidad de estos animales a la ZEA aun a niveles tan bajos como 1 ppm se comienzan a observar efectos adversos (62).

Pocas alteraciones en los parámetros bioquímicos se han observado con la ingestión crónica de ZEA, estos incluyen: aumento en los niveles de la progesterona sérica y disminución de las hormonas luteinizante y prolactina. Signos de teratogenicidad han sido demostrados en cerdas y en ratas hembras alimentadas con insumos conteniendo altas concentraciones de ZEA (70). Los casos a campo de problemas inducidos por la ingestión de ZEA en vacunos han sido bien documentados, consumiendo alimentos o raciones contaminadas con niveles de 10 a 15 ppm. Las manifestaciones clínicas se asocian típicamente con el síndrome hiperestrogénico, diarrea, estados de estro continuo, infertilidad, vaginitis, disminución en la producción de leche y abortos. En vacunos, no se observaron cambios en los parámetros bioquímicos aun con niveles elevados de ZEA (11,80).

A elevadas concentraciones de ZEA en el alimento, los pavos pequeños son más sensibles que las ponedoras y los pollos en la misma edad. Estos últimos, son las aves de corral más resistentes a los efectos tóxicos de esta toxina. Con los niveles comúnmente informados en los insumos, no se observan cambios en el consumo de alimento, ganancia de peso, producción de huevos, en los parámetros bioquímicos y hematológicos, en la apariencia histológica de los tejidos. Existen limitadas evidencias para considerar a la ZEA como posible agente carcinógeno en seres humanos (6).

3. Prevención y control de micotoxinas

Actualmente, 90 países poseen regulación o propuestas sobre límites de micotoxinas en sus alimentos, 77 países tienen algunas regulaciones, mientras 13 no poseen

ninguna reglamentación vigente (19). La mayoría de las normas vigentes están referidas a las aflatoxinas en diversos alimentos, principalmente aquellos destinados al consumo humano (3).

Son pocos los países donde se establecen límites de micotoxinas en maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo animal (Tabla 2). Menos frecuentes son las regulaciones para: patulina, ocratoxina A (OA), fumonisina B₁(FB1), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) y toxina T-2. Obviamente, la necesidad de una legislación que imponga límites para las toxinas fúngicas en alimentos es ampliamente reconocida por los países industrializados en el mundo.

Entre las medidas preventivas para el crecimiento de hongos en los cultivos y la disminución de la producción de micotoxinas se encuentra el uso de híbridos y variedades de semillas resistentes.

En México el mejoramiento genético de semillas se inició en la década de los 40's, como resultado de estos trabajos se han generado variedades mejoradas para las diferentes condiciones agroclimáticas.

Actualmente, se llevan a cabo evaluaciones con la finalidad de comparar entre variedades ya definidas o establecidas genéticamente, para elegir las más adaptadas a una región determinada.

Tabla 2. Niveles máximos de micotoxinas toleradas en los cereales y en alimentos a base de maíz para consumo animal.

PAÍS	PRODUCTOS	MICOTOXINAS (µg/kg)
Argentina	Maíz y subproductos	AFB 1: 5 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 20
Bosnia	Maíz, trigo, arroz y cereales	AFB1, AFG1 : 1
Brasil	Maíz	AFB1, AFG1: 30 ZEA: 200
Bulgaria	Cereales y subproductos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 2.5
China	Maíz y aceite de maíz	AFB1: 20
Costa Rica	Maíz	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 35
Cuba	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 5
Chipre	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 10
Dinamarca	Cereales y subproductos	Ocratoxina A
República	Maíz y subproductos	AFB1, AFG1 : 0
Dominicana	Maíz importado	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 20
Egipto	Cereales y subproductos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 10
	Maíz	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 20
Finlandia	Todos los alimentos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 :5
Francia	Todos los alimentos	AFB1: 10
	Cereales	ZEA: 200 Ocratoxina A: 5
Alemania	Todos los alimentos	AFB1: 5
Grecia	Maíz	AFB1: 5
Guatemala	Maíz	Afs totales : 10
Honduras	Todos los alimentos	AFB1, AFG1, AFG2 :1
	Maíz	AFB1 : 1
Israel	Maíz y subproductos	AFB1: 5 AFB1, AFB2, AFG1 AFG2 : 15
Italia	Todos los alimentos	AFB1 :5 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 10
Jamaica	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 10
Jordania	Cereales y maíz	AFB1: 15 Afs Totales: 30
Macedonia	Maíz, trigo, arroz, cereales	AFB1, AFG1: 1
Nigeria	Todos los alimentos	AFB1 : 20
Países Bajos	Cereales y subproductos	Todas las micotoxinas: 0
Rusia	Cereales	AFB1 : 5 Zea : 1000 Toxina t-2 : 100, DON: 1000
Polonia	Todos los alimentos	AFB1: 0
Rumania	Todos los alimentos	AFB1:0 ZEA: 30 Patulina: 30
El Salvador	Todos los alimentos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 20
Sudáfrica y España	" " "	AFB1: 5 AFB2, AFG1, AFG2: 10
Suecia	Todos los alimentos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 5
Suiza	Maíz y cereales	AFB1: 2 AFB2, AFG1, AFG2: 5
	Productos a base de maíz	FB1 y FB2: 1000
Taiwán	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 50
Uruguay	Cereales y maíz	Ocratoxina A: 50 ZEA: 200
Estados Unidos	Todos los alimentos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 20
Zimbawe	Maíz	AFB1:5 , AFG1: 4

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación fúngica y de micotoxinas en el maíz representa un problema mundial que ocasiona importantes pérdidas económicas para los sectores agropecuarios y de la industria.

Los efectos adversos de la contaminación por hongos en los cultivos se traduce en menor rendimiento a la cosecha, pérdida de nutrientes y de la calidad del grano, así como incremento en los costos para el transporte y almacenamiento; para los ganaderos las pérdidas económicas se deben al impacto de las micotoxinas sobre los parámetros productivos, causando menor rendimiento en los animales, problemas de reproducción, aumento en la incidencia de enfermedades, gasto en personal veterinario, aumento en los costos de descontaminación y pérdida en los mercados; para la industria, se incrementan los costos en los procesos tales como secado, destoxificación y capacidad de almacenamiento, pérdida de producto, además de costos para supervisión y análisis de micotoxinas en los productos (35,54).

Es difícil estimar las pérdidas económicas en dichos sectores productivos, y esto se vuelve imposible cuando se considera el impacto a la salud pública, por lo que deben tomarse medidas que permitan prevenir y controlar la contaminación por micotoxinas en los cultivos.

Organismos mundiales como la FAO y la FDA, recomiendan el uso de variedades de semillas resistentes a fin de reducir el porcentaje de infección de granos contaminados con hongos productores de micotoxinas, sin embargo, existen pocos estudios que valoren la eficiencia de los híbridos y variedades desarrollados en el mercado, respecto a la resistencia a dicha contaminación.

JUSTIFICACIÓN

El maíz en México se considera un cultivo de trascendencia social dado su valor para la alimentación de la población, si bien su utilización también es de gran importancia para las explotaciones pecuarias.

El maíz es un excelente sustrato para la contaminación por hongos, lo cual ocurre tanto en campo como en almacenamiento, generándose la formación de una gran diversidad de micotoxinas, las cuales ocasionan numerosos trastornos a la salud de humanos y animales.

Entre las estrategias para el control de la contaminación por hongos en campo, se utilizan variedades mejoradas de maíz, las cuales se han desarrollado con propósitos de interés agrícola, entre estos incrementar el rendimiento, adaptabilidad en campo. Sin embargo, se requieren estudios que permitan determinar la eficiencia de dichas variedades respecto a la resistencia a las diferentes especies de hongos fitopatógenos que afectan el rendimiento del cultivo así como de especies productoras de micotoxinas.

El presente estudio pretende evaluar la contaminación por hongos y micotoxinas en diferentes variedades de maíz cosechadas en una localidad del estado de Jalisco, dando inicio a un proyecto de investigación que pretende valorar las características de adaptación, rendimiento y resistencia de los diferentes germoplasmas de las variedades de maíz durante tres ciclos de cultivos consecutivos. El cual permitirá al productor utilizar la variedad de maíz más resistente a la contaminación por hongos y micotoxinas así como determinar la influencia de las condiciones ambientales.

HIPÓTESIS

Existe variación en el porcentaje de infección por hongos y en los niveles de contaminación por micotoxinas entre las variedades de maíz cosechadas en una localidad del estado de Jalisco.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el porcentaje de infección por *Fusarium* y la contaminación por micotoxinas en diferentes variedades de maíz cosechadas en una localidad de Jalisco durante el ciclo primavera – verano 2003.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el porcentaje de infección por especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* en el maíz de las variedades Alsa036W, Alsa038W, Lucero 901, Lucero 807, P30G40 y UDG 600 cosechadas en las parcelas experimentales del CUCBA.
2. Valorar la contaminación por aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina y zearalenona en las diferentes variedades de maíz estudiadas mediante cromatografía de inmunoafinidad.
3. Relacionar las condiciones climatológicas de temperatura y precipitación pluvial que prevalecieron durante el cultivo primavera – verano 2003.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Área de Micotoxilogía del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Muestreo

A partir de la cosecha de maíz correspondiente al cultivo primavera-verano 2003 se seleccionaron bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con un factor (DBCA), muestras de las variedades de maíz: ALSA 036W, ALSA 038W, LUCERO 901, LUCERO 807, P30G40 y UDG 600, cultivadas en cuatro parcelas experimentales del CUCBA, cada parcela de 4 surcos de 5 m de longitud a 0.77m de separación entre surco y surco.

Se obtuvieron 4 repeticiones por variedad n=24 muestras, cada una de las cuales se obtuvieron a partir de la cosecha de dos surcos las mazorcas, posteriormente se desgranaron para la toma de las submuestras representativas (3 repeticiones/submuestra).

1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* de diferentes híbridos de maíz

De cada una de las submuestras se tomaron cien granos, los cuales fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto. Los granos se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en el medio de Nash –Snyder, selectivo para el aislamiento de especies de *Fusarium* (50). Las muestras se incubaron a 24° C durante 7-10 días bajo ciclos de 12h/12h de luz blanca y luz negra, respectivamente (Anexo 1). Se observaron macroscópicamente las colonias desarrolladas y se determinó el porcentaje de

género *Fusarium* fueron transferidas al medio Agar hojas de clavel (AHC) e incubadas durante 7 días a 24° C bajo ciclos de 12h/12h de luz blanca y luz negra, respectivamente, para su posterior identificación.

1.1. Identificación de las especies de *Fusarium*

A partir del medio AHC se realizaron aislamientos monospóricos, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de propágulos fúngicos y se realizó una suspensión en 10 mL de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión se la transfirió a una placa de Petri con agar agua, se diseminó por rotación y se descartó. Las placas se incubaron inclinadas durante 16 a 18 h a 24° C para permitir la germinación de las esporas. Posteriormente se procedió a la obtención de conidios germinados bajo lupa (40 X) mediante aguja histológica. Un conidio se transfirió a AHC en placas de Petri de 6 cm y, otro a tubos de ensayos con Agar Papa Glucosado (APG). Los cultivos se incubaron durante dos semanas con ciclos alternativos de luz blanca /luz negra de 12 h a 24° C. La identificación de las cepas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nelson y col. 1983 (50).

Para la identificación de las especies de *Fusarium* se observaron las características microscópicas luego del desarrollo de las cepas en AHC, y las características culturales en APG (Anexo 3). El medio AHC favorece la esporulación sobre el desarrollo micelial, produciéndose conidios y conidióforos en abundancia, uniformes en tamaño y forma, reduciendo así la variación fenotípica. Las principales características de las especies pertenecientes a la Sección *Liseola* que se tuvieron en cuenta para la clasificación se detallan en la tabla 2.

Las especies de *Fusarium* aisladas e identificadas fueron mantenidas en medio Agar Jugo V8 (50) a fin de evitar mutaciones o cambios en las características de las cepas.

Tabla 3. Características diagnósticas de las especies de *Fusarium* Sección *Liseola*.

Características	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. anthophilum</i>	<i>F. globosum</i>
Macroconidios	Forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas. Paredes finas.	Leve forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.	Forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.	Leve forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.	Leve forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas
Macroconidióforos	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.
Microconidios	Unicelulares, ovals a ovoides con base truncada en falsas cabezas y cadenas.	Unicelulares, ovals a ovoides, piriformes a napiformes. En falsas cabezas y cadenas.	Unicelulares, fusiformes a ovals. En falsas cabezas.	Unicelulares, ovals a ovoides, piriformes a napiformes. En falsas cabezas.	Unicelulares, forma de clava a elipsoidales, en cadena o falsas cabezas. Globosos en grupos, nunca en cadena.
Microconidióforos	Monofiálides largas ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.
Clamidosporas	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Agar papa Glucosado	Micelio aéreo blanco a naranja pálido, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a naranja pálido, marrón a púrpura.	Micelio aéreo blanco, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.	Micelio aéreo blanco a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.	Micelio aéreo blanco a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.	Colonia flocosa, micelio blanco. Reverso incoloro a púrpura.

(Anexo 4-6)

2. Detección y cuantificación de micotoxinas.

Técnica de Cromatografía por Inmunofinidad y detección Fluorométrica:
(79).

AFLATOXINAS

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregaron 100 mL de metanol al 80% y licuaron a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasó a través de un filtro de papel aflautado y se colectó en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyó con 40 mL de agua destilada.
3. Se filtró el extracto diluido a través de papel microfibras de vidrio y 10 mL del extracto filtrado se agregó a la columna de inmunofinidad.
4. Se lavó dos veces la columna con 10 mL de agua destilada.
5. Se realizó la elución de la micotoxina con 1 mL de metanol grado HPLC y colectó en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro. Se añadió 1 mL del revelador Aflatest y se cuantificó la concentración en el fluorómetro.

DON

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregaron 200 mL de agua destilada y licuaron a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasó a través de un filtro de papel aflautado, se realizó una segunda filtración en papel microfibras de vidrio.
3. Se agregaron 6 mL del extracto filtrado a la columna de inmunofinidad.
4. Se lavó dos veces la columna con 10 mL de agua destilada.
5. Transfirieron la columna a una jeringa de vidrio seca.
6. Se realizó la elución de la micotoxina con 0.75 mL de metanol grado HPLC y colectó en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro.
7. Se transfirieron 0.5 mL del eluato a un segundo tubo fluorométrico, se añadió 0.5 mL de metanol grado HPLC, posteriormente 0.5 mL del revelador A y 0.5 mL del revelador B y se mezcló en vortex por 5 segundos. Se cuantificó la concentración en el fluorómetro.

FUMONISINAS

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregaron 100 mL de metanol al 80% y licuaron a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasó a través de un filtro de papel aflautado y se colectó en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyó con 40 mL de solución 0.1% Tween PBS.
3. Se filtró el extracto diluido a través de filtro microfibras y 10 mL del extracto filtrado se agregaron a la columna de inmunoafinidad.
4. Se lavó la columna con 10 mL de solución 0.1% Tween PBS y un segundo lavado con 10 mL de agua destilada.
5. Se realizó la elución de la micotoxina con 1 mL de metanol grado HPLC y colectó en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro. Se añadió 1 mL del revelador Fumonitest y se cuantificó la concentración.

OCRATOXINAS

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregaron 100 mL de metanol al 80% y licuaron a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasó a través de un filtro de papel aflautado y se colectó en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyó con 40 mL de agua destilada.
3. Se filtró el extracto diluido a través de filtro microfibras y 10 mL del extracto filtrado se agregó a la columna de inmunoafinidad.
4. Se lavó la columna con 10 mL de buffer de lavado para micotoxinas y posteriormente con 10 mL de agua destilada.
5. Se realizó la elución de la micotoxina con 1.5 mL con solución de Ocratest y colectó en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro y se cuantificó la concentración.

ZEARALENONA

1. Se colocaron 20 g de muestra con 2 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregaron 50 mL de metanol al 80% y licuaron a alta velocidad durante 2 minutos.

2. Se pasó a través de un filtro de papel aflautado y se colectó en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyó con 40 mL de solución 0.1% Tween PBS.
3. Se filtró el extracto diluido a través de filtro microfibras y 10 mL del extracto filtrado se agregó a la columna de inmunoafinidad.
4. Se lavó la columna con 10 mL de solución 0.1% Tween PBS y un segundo lavado con 10 mL de agua destilada.
5. Se realizó la elución de la micotoxina con 1 mL de metanol grado HPLC y colectó en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro. Se añadió 1 mL del revelador Z y se cuantificó la concentración en el fluorómetro.

3. Análisis de las condiciones climatológicas.

Se obtuvieron los registros de los Archivos de la Estación Meteorológica cercana a la localidad estudiada y se analizaron los valores registrados de temperatura máxima, mínima y promedio, así como la precipitación pluvial y humedad relativa (HR) de mayo a diciembre del 2003.

Análisis Estadístico.

Los resultados se contrastaron mediante el Análisis de Varianza y se aplicó la prueba de Tukey para comparación de medias a un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

1. Porcentaje de infección de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* aisladas de diferentes variedades de maíz

La evaluación del grado de contaminación con especies de *Fusarium*, de las muestras de los seis diferentes híbridos de maíz cosechados en las parcelas experimentales del Centro de Producción de Semillas del CUCBA, mostró un porcentaje de infección promedio en el medio Nash-Snyder del 64% (rango 17–100%) considerando granos dañados y asintomáticos (Tabla 4). La variedad P30G40 presentó el mayor porcentaje de infección con especies de *Fusarium* (100%), mientras que la variedad Alsa 038W mostró el menor porcentaje de infección (17%).

Tabla 4. Incidencia de *Fusarium* (Sección *Liseola*) en muestras de diferentes híbridos cosechados en una localidad del estado de Jalisco

Híbrido	Infección con <i>Fusarium spp</i> ^a	Distribución de las especies ^a			
		<i>F. verticillioides</i> (número) ^b	<i>F. subglutinans</i> (número) ^b	<i>F. proliferatum</i> (número) ^b	Otros ^b (número) ^{b,c}
UDG 600	39 (40)	68 (27)	23 (9)	2 (1)	7 (3)
Alsa 036W	63 (43)	65 (28)	16 (7)	14 (6)	5 (2)
Alsa 038W	17(16)	81 (13)	13 (2)	6 (1)	-
Lucero 807	40 (27)	63 (17)	22 (6)	11(3)	4 (1)
P30G40	100 (25)	92 (23)	-	8 (2)	-
Lucero 901	63 (68)	59 (40)	26 (18)	9 (6)	6 (4)
Total de cepas	219	148	42	19	10

^a Los datos son expresados en porcentaje, son la media de 3 submuestras evaluadas.

^b Número total de cepas aisladas

^c Especies de *Fusarium* no pertenecientes a la sección *Liseola*, incluyen *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. semitectum*.

1.1. Identificación de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* aisladas de diferentes variedades de maíz

La identificación de las especies de *Fusarium* se realizó mediante la observación microscópica de los cultivos desarrollados en AHC a 10X y 40X, y de las características macroscópicas (culturales) en el medio APG.

La tabla 5 muestra las características morfológicas y culturales de las cepas de *Fusarium* aisladas de diferentes híbridos de maíz. La evaluación de las colonias en APG de la mayoría de las cepas aisladas mostró un micelio aéreo blanco a naranja pálido, lavanda a púrpura, reverso incoloro a naranja pálido, marrón a púrpura.

La observación microscópica (10x) de las colonias demostró que un 77% (167 cepas) de las mismas presentaban microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas de microconidios, mientras que el 19% de los cultivos presentaron sólo falsas cabezas de microconidios. Las características microscópicas (40X) se observaron en preparados en fresco y revelaron la presencia de un micelio hialino, septado, microconidios unicelulares, ovales a ovoides con base truncada, macroconidios en forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas y de paredes finas, y múltiples conidióforos ramificados y no ramificados.

Del total de cepas que presentaban microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas de microconidios, el 68% (148 cepas) de ellas presentaron sólo monofiálides, mientras que el 9% (19 cepas) restante presentaron monofiálides y polifiálides. De acuerdo con éstas características dichas cepas se clasificaron como *F. verticillioides* y *F. proliferatum* pertenecientes a la sección *Liseola*, respectivamente, según la clave taxonómica propuesta por Nelson y col., 1983 (50).

Tabla 5. Caracterización morfológica y cultural de las cepas de *Fusarium* aisladas de diferentes híbridos de maíz.

Especie	AHC (10 X)		AHC (40X)			APG
	Falsas cabezas de microconidios	Cadenas de microconidios	Monofiálides	Polifiálides	Clamidosporas	Color de la colonia
<i>F. verticillioides</i>	+	+	+	-	-	Micelio aéreo blanco a naranja pálido, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a naranja pálido, marrón a púrpura.
<i>F. proliferatum</i>	+	+	+	+	-	Micelio aéreo blanco, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.
<i>F. subglutinans</i>	+	-	+	+	-	Micelio aéreo blanco a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.

Con respecto a aquellas cepas que sólo presentaban falsas cabezas de microconidios pero que no formaron cadenas de microconidios en AHC, la observación microscópica en 40X reveló la presencia de monofiálides y polifiálides, además de las otras características descritas para las otras dos especies, por lo que, se las clasificó como *F. subglutinans* de acuerdo a Nelson y col., 1983 (50).

F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg, fue la especie predominante en todas las variedades evaluadas con un porcentaje promedio del 68% (rango 59 – 92%), seguida por *F. subglutinans* (Wallenweber and Reinking) Nelson, Tousson and Marasas con 19% (0 – 26%) y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg con 9% (2 – 14%) (Tabla 4).

Cabe señalar que también se aislaron otras especies de *Fusarium* no pertenecientes a la sección *Liseola* (4%), que por sus características morfológicas se clasificaron principalmente como *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. semitectum*.

2. Contaminación por micotoxinas en las diferentes variedades de maíz

Se encontró contaminación con deoxinivalenol (DON) en el 100% del maíz analizado, por fumonisinas en el 95% y por ocratoxinas en el 75% de las muestras. No se detectó aflatoxinas y zearalenona en ninguna de las variedades evaluadas.

La tabla 6 muestra los niveles de contaminación por DON detectados en el maíz de las diferentes variedades de maíz. La mayor contaminación se observó en la variedad P30G40 con niveles de 15 ppm, mientras que la menor correspondió a la variedad Alsá 036W con 2.9 ppm, no se encontró diferencia estadística entre variedades ($p > 0.05$).

Tabla 6. Niveles de contaminación por deoxinivalenol en las variedades de maíz estudiadas.

Variedades de maíz						
ppm	Alsa036W	Alsa038W	L 901	P30G40	UDG 600	L 807
Promedio	5.13	7.66	5.7	8.16	2.93	7.53
Máximo	6.4	11	7.2	15	5.7	9.3
Mínimo	2.9	3.8	3.4	4.9	2.4	5.5
S	1.93	3.62	2.02	5.06	0.46	1.91
C.V.	0.37	0.47	0.35	0.62	0.16	0.25

L: lucero, s: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación

La contaminación por fumonisinas se observa en la tabla 7, apreciándose un rango de contaminación de 0-16 ppm. La variedad Lucero 807 presentó niveles promedio de 10.25 ppm, mayor estadísticamente ($p < 0.05$) que la variedad Lucero 901 que mostró niveles de 1.75 ppm, el resto de las variedades fueron similares estadísticamente ($p > 0.05$).

Tabla 7. Niveles de contaminación por fumonisinas en las variedades de maíz estudiadas.

Variedades de maíz						
ppm	Alsa036W	Alsa038W	L 901	P30G40	UDG 600	L 807
Promedio	7.75ab	4.75ab	1.75b	6ab	4.33ab	10.25a
Máximo	15	7	3	8	8	16
Mínimo	3	3	0	4	2	5
S	5.12	1.70	1.26	1.82	2.62	4.57
C.V.	0.66	0.36	0.72	0.30	0.61	0.45

L: lucero, s: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación. Las literales indican diferencia estadística entre variedades ($p < 0.05$)

La determinación de la contaminación por ocratoxinas en el maíz se presenta en la tabla 8. No se encontró diferencia estadística entre variedades. Los niveles promedio mayores correspondieron a la variedad Alsa 036W (9.68 ppb) y los menores se presentaron en la variedad Lucero 807 (0.71 ppb). El rango de contaminación por ocratoxinas fue de 0 -24 ppb.

Tabla 8. Niveles de contaminación por ocratoxinas en las variedades de maíz estudiadas.

ppb	Variedades de maíz					
	Alsa036W	Alsa038W	L 901	P30G40	UDG 600	L 807
Promedio	9.68	0.87	0.325	2.01	1.26	0.71
Máximo	24	3.3	1.3	5.7	1.8	0.97
Mínimo	0	0	0	0.45	0.84	0.24
S	10.84	1.62	0.64	2.47	0.4	0.31
C.V.	1.12	1.86	1.99	1.23	0.31	0.44

L: lucero, s: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación

3. Condiciones climáticas

3.1. Temperaturas registradas durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003

La tabla 9 muestra las temperaturas registradas por la estación meteorológica Tipo "B" adscrita a la Base Aérea Militar No. 5 de Zapopan, Jalisco, cercana a las parcelas experimentales del CUCBA, se incluyen los promedios de las máximas y mínimas y el promedio global.

Tabla 9. Temperaturas máximas, promedio y mínimas registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003

	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Máximas	26.3	26.1	26.3	26.5	25.6	26.6	25.7	23.0
Normal*	33.4	30.8	27.6	27.4	27.4	27.5	26.3	24.9
Promedio	25.0	23.0	21.0	21.0	21.0	20.0	19.0	15.0
Normal*	23.9	23.4	21.5	21.4	21.5	20.6	18.4	17.0
Mínimas	15.0	17.0	16.0	16.0	17.0	15.0	11.0	5.0
Normal*	14.5	16.0	15.5	15.5	15.7	13.8	10.5	9.1

* valores obtenidos a partir del registro de 40 años

Respecto a las temperaturas máximas promedio, todos los meses considerados se encuentran por debajo de la normal, registrándose la diferencia máxima durante el mes mayo en 6°C por debajo de la normal.

Las temperaturas promedio durante el periodo considerado, solo durante los meses de mayo y noviembre se registraron temperaturas promedio por encima de la normal, los meses restantes permanecieron por debajo de la misma, sin embargo las temperaturas tuvieron una oscilación normal, observándose los máximos durante los meses de primavera y los mínimos en invierno.

Las temperaturas mínimas promedio, presentan caso contrario con respecto a las temperaturas máximas promedio en el mismo periodo, registrándose temperaturas por encima de la normal en casi todos los meses, excepto durante el mes de diciembre, sin alejarse mas de 2°C por encima respecto a la normal.

3.2. Precipitación pluvial registrada durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003

El análisis de la precipitación pluvial se presenta en la tabla 10, reportándose los niveles máximos, mínimos y totales durante los meses de mayo a diciembre. Las precipitaciones se comportaron por abajo de la normal en los meses de mayo, agosto, octubre y diciembre, y por arriba de la normal en los meses de junio, julio, septiembre y noviembre dando como resultado una diferencia de 243 mm de precipitación por arriba de la normal.

Tabla 10. Precipitación pluvial registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003

mm	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Máxima	1	55	60	43.2	51	26.3	16.3	0
Mínima	INAP	INAP	INAP	INAP	INAP	INAP	0	0
Precipitación Total	1	252	393	185	285	38	16	0
Normal*	28	174	255	222	151	64	15	18

* valores obtenidos a partir del registro de 40 años. INAP: inapreciable en la escala

3.3. Humedad relativa (HR) registrada durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003

El registro de las HR reportadas por la estación meteorológica se presenta en la tabla 11. La humedad máxima durante el periodo considerado, muestra que durante los meses de primavera y verano se presentó como humedad máxima 100%, solamente a partir del mes de octubre se presentó ligera disminución del valor de este elemento climatológico.

Respecto a la humedad relativa mínima registrada, revela que la estación seca terminó en el mes de mayo, siendo la estación húmeda del mes de junio hasta del mes de octubre, donde la humedad relativa mínima osciló entre los 20 a 45 por ciento.

La humedad relativa promedio muestra un comportamiento análogo a la humedad relativa mínima, siendo los meses de junio a octubre los que presentan la mayor cantidad de humedad en el ambiente.

Tabla 11. Humedad relativa registrada en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003

	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Máximas	92	100	100	100	100	94	92	84
Normal*	92	98	98	96	99	98	98	96
Promedio	37	64	74	77	81	70	61	47
Normal*	53	64	67	71	68	66	56	65
Mínimas	6	18	16	39	46	45	34	22
Normal*	24	36	44	42	40	40	29	31

* valores obtenidos a partir del registro de 40 años

En términos generales, la humedad observada en el periodo comprendido de junio a octubre se mantuvo por encima de la normal, por lo que se consideran los meses de mayor humedad y los meses de noviembre y diciembre los más secos.

DISCUSIÓN

1. Infección por especies de *Fusarium* en maíz

El porcentaje de infección promedio por especies del género *Fusarium* en el maíz evaluado en el presente estudio fue de 64%, por lo que coincide con lo reportado por otros investigadores, ya que este género es considerado comunmente como hongo de campo por presentarse en más del 50% de los granos de maíz antes de la cosecha (4).

La contaminación del maíz por especies de *Fusarium* en las diferentes variedades de maíz demostró que *F. verticillioides* (Sac) Nirenberg fue la especie de mayor incidencia, seguida por *F. subglutinans* (Wollew & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas. Estos resultados concuerdan con los reportados en otros países, donde se ha encontrado a *F. verticillioides* como la especie más frecuentemente aislada en el maíz enfermo (49).

La alta incidencia de *F. verticillioides* presente en las parcelas experimentales de CUCBA coincide con algunas investigaciones realizadas en Argentina. Saubois y Piontelli en 1995 (69), encontraron esta especie como predominante en el maíz cultivado en la zona centro-norte de Santa Fe, Argentina (52.6%), mientras que Chulze y col. en 1996 (9) reportaron un porcentaje mayor de *F. verticillioides* en Córdoba, Argentina (70%).

Estudios posteriores efectuados por Torres y col. en 2001 mostraron mayor incidencia para *F. subglutinans* (30-50%), seguida por *F. verticillioides* (12-50%) y *F. proliferatum* (10-12%), lo cual pudo ser indicativo de la influencia de las condiciones climáticas de la región estudiada y del año de cosecha (75). La dominancia de *F. subglutinans* en las muestras provenientes de Buenos Aires coincide con lo observado en estudios realizados en otras áreas más frías, tales como Alemania, Austria, Polonia y el norte de Argentina (43, 45).

Doko y col. en 1996, reportaron a *F. verticillioides* como el hongo aislado más frecuente del maíz y de productos derivados en Francia, España e Italia (14). Orsi y col. en 2000, encontraron en Brasil a *F. verticillioides* como la especie predominante del maíz (52). De igual manera Fandohan y col. en 2003, reportan en algunos países del continente Africano, esta especie como la de mayor frecuencia en el maíz (16).

Es importante señalar que en distintas regiones geográficas, con condiciones climáticas y tipos de cultivares diferentes, la distribución de las especies de *Fusarium* del complejo *Gibberella fujikuroi* puede variar. Se ha demostrado que *F. verticillioides* tiene una distribución cosmopolita, no sólo en climas húmedos y templados, sino también en regiones tropicales y subtropicales. Ha sido aislado en América Central, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Estados Unidos, India, Italia, Jamaica, Japón y Nueva Zelanda, entre otros. En cambio, sólo se ha detectado en baja frecuencia en regiones con temperaturas frías, excepcionalmente se ha aislado en Rusia e Islandia (46).

2. Contaminación por micotoxinas en el maíz

Las variedades de maíz mostraron contaminación importante de deoxivalenol (DON) y fumonisinas y en menor proporción de ocratoxinas en tanto que no se detectaron niveles de aflatoxinas y zearalenona.

Los niveles de de DON presentes en el maíz de todas las variedades a excepción de la UDG 600 se consideran de riesgo a la salud de humanos y animales ya que sobrepasan los niveles permisibles que la FAO recomienda (18). El límite permisible para humanos es de 1 mg/Kg de DON en productos terminados a base de trigo, como harinas, salvado y germen; de 5 mg/Kg en materia prima para la elaboración de alimentos balanceados para cerdos y no debe exceder el ingrediente en cuestión en más del 20% en la composición de la dieta, mientras que para aves y rumiantes de carne los niveles sugeridos son de 10 mg/Kg, sin exceder del 50% del total de la composición del alimento, sin embargo niveles de 0.5 mg/Kg de DON en la dieta

pueden causar problemas de palatabilidad resultando en pérdidas económicas por el bajo consumo de alimento.

Los límites tolerables para DON en trigo y otros cereales han sido reportados en un documento presentado por la FAO en 2002, destacando en los países de la Unión Europea como límite en alimentos 750 ug/kg, mientras que en otros países el rango puede estar entre 300 ug/kg de peso hasta 2000 ug/kg. Por otra parte se reporta como niveles de ingesta tolerable en humanos 12 ug/kg de peso vivo por día (46).

Las fumonisinas han sido detectadas en todos los tipos de alimentos derivados de maíz en diferentes regiones del mundo, incluyendo Argentina, Alemania, Brasil, Corea, China, Dinamarca, España, Estados Unidos, Guatamala, Honduras, Hungría, Holanda, India, Inglaterra, Irán, Italia, Japón, Kenia, Nepal, Polonia, Sudáfrica, Suiza, Uruguay y Venezuela. Encontrándose los mayores niveles de contaminación por fumonisinas en maíz en países con clima calurosos como: Bennis, Italia, Portugal y Zambia (48).

Los niveles de contaminación en maíz entero reportados en distintos países se encuentran sobre 10 ug/g de fumonisinas mientras que niveles entre 63 – 140 ug/g se han reportado en maíz mohoso (65). En general los niveles mayores han sido detectados en productos de maíz no asociados en alimentos para humanos como, maíz dañado y porciones de mazorcas y de tallos (4). El maíz que ha sido tamizado puede contener niveles altos de fumonisinas mayores a 5 ug/g y en algunos lotes de contaminación supera los 20 ug/g, niveles que han estado implicados en brotes de leucoencefalomalacia equina y edema pulmonar porcino (46).

Los niveles detectados de fumonisinas en todas las variedades de maíz estudiadas en la presente investigación sobrepasan los límites recomendados en la guía publicada por la FDA en 2000, particularmente los mostrados por la variedad Lucero 807, ya que la recomendación es de: 2 mg/Kg para humanos, 5 mg/Kg para equinos

y conejos, en no más del 20% de la dieta y para cerdos de 10 mg/Kg en no más del 50% de la dieta (20).

La contaminación observada por ocratoxina A mostró niveles bajos excepto en la variedad Alsa036W, la cual presentó niveles promedio de 9.68 ug/Kg, que pueden ser de riesgo para humanos y para gallinas de postura, siendo los límites tolerables de 5 y 10 ug/Kg de ocratoxina A respectivamente (17).

La ocratoxina A puede ser encontrada en productos de cereales particularmente en las harinas, sin embargo también se ha encontrado en queso y en productos cárnicos de animales que consumen cereales como el principal componente de la dieta. La mayor concentración fue reportada en el maíz colectado en 1997 en Croacia (57 ug/kg), superando lo niveles previamente detectados en 1996 (38 ug/kg) (46).

Los niveles de ocratoxina pueden variar considerablemente con las estaciones de cultivo, encontrándose en algunos estudios los mayores niveles de ocratoxina A en junio y los menores en diciembre. Además el periodo del tiempo entre cosechas y el consumo de los cereales puede contribuir a las variaciones de su exposición (24).

Los riesgos a la salud han sido evaluados por el Comité de Expertos en Alimentos y Aditivos (JECFA) de la FAO y por el Comité de Científicos en Alimentos de la Comisión Europea (SCF), quienes han establecido un consumo tolerable para ocratoxina A en alimentos entre 1.2 – 14 ng/kg de peso vivo en humanos (46).

Es importante destacar que las determinaciones de micotoxinas se realizaron mediante la técnica de cromatografía de inmunoafinidad (Vicam®) la cual puede sobreestimar los niveles de micotoxinas. Esta técnica se considera apropiada para el análisis de tamizaje de granos y alimentos balanceados y es una herramienta útil para el análisis de micotoxinas, sin embargo es de menor precisión y exactitud que la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Diferentes estudios han demostrado contaminaciones importante de micotoxinas tanto en países desarrollados y en vías de desarrollo. En revisiones recientes se ha concluido que cerca del 25% de las cosechas de granos en el mundo se encuentran contaminados con micotoxinas (21).

En estudios recientes de ocurrencia natural de micotoxinas en granos y materias primas empleadas en la producción pecuaria en México en los años 1999-2001 se observa que el 65% de las muestras analizadas presentaron cantidades detectables de micotoxinas, de las cuales el 13.17% contenían niveles por arriba de los límites recomendables para cada micotoxina. En general las aflatoxinas, ocratoxinas y citrinina mostraron menor incidencia que las fusariotoxinas (toxina T-2, deoxinivalenol y zearalenona) con 63.38% y 67.5% respectivamente (22).

De acuerdo a los reportes que se tienen de los niveles de contaminación por micotoxinas en las materias primas y en alimentos balanceados a nivel nacional y mundial, se puede decir que la contaminación de micotoxinas encontrada en la presente investigación es similar a la reportada en otros estudios, lo que implica que los animales constantemente están expuestos a dichas toxinas, las cuales se encuentran con frecuencia asociadas lo que en la mayoría de los casos pueden ocasionar sinergismo, incrementando los trastornos a la salud y la reducción de los parámetros productivos (34).

3. Condiciones climáticas registradas

Las temperaturas registradas durante el periodo de estudio, se consideran de clima templado, en virtud de que las temperaturas máximas tanto extremas como promedio, se encontraron por debajo de la normal y las temperaturas mínimas promedio y extremas se registraron por encima de la normal, con excepción del mes de diciembre, que presentó temperaturas menores a la normal.

Se observó que en el periodo de estudio, la precipitación pluvial se mantuvo por arriba de la normal, por lo que se puede considerar al año 2003 como lluvioso, mientras que la humedad relativa presentó valores por encima de los registrados como el promedio de los encontrados durante 40 años previos, a excepción de los meses de mayo y diciembre que fueron ligeramente menores a lo registrado como normal.

Las condiciones climáticas prevalentes durante el cultivo primavera-verano de 2003, pudieron considerarse propicias para el desarrollo de las especies del género *Fusarium*, lo cual pudo ser confirmado al análisis de las diferentes variedades del maíz en el laboratorio, además de apreciarse que dichas especies de hongos aisladas encontraron las condiciones apropiadas en campo para la producción de micotoxinas, por lo que es importante resaltar que el maíz cosechado en estas parcelas pueden ser de riesgo a la salud humana, y en todo caso de utilizarse para consumo animal deben de recomendarse medidas preventivas para disminuir problemas de micotoxicosis.

CONCLUSIONES

1. Se encontró contaminación por especies de *Fusarium* en todas las variedades de maíz , mostrando un porcentaje de infección entre 17% (variedad Alsa 038 W) y 100% (variedad P30G40).
2. *Fusarium verticillioides* fue la especie predominante en las diferentes variedades de maíz, seguida por *Fusarium subglutinans* y *Fusarium proliferatum*, correspondiendo un porcentaje de frecuencia de 68%, 19% y 9% respectivamente.
3. Se encontró contaminación por deoxinivalenol, fumonisinas y ocratoxinas en las variedades de maíz analizadas, los niveles detectados en algunas variedades pueden ser consideradas de riesgo.
4. No se detectó la presencia de zearalenona y aflatoxinas en ninguna de las variedades de maíz analizadas.
5. Las condiciones de temperatura, precipitación pluvial y humedad relativa fueron propicias para el desarrollo de las especies de *Fusarium* y la producción de micotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ademoyero A.A., and Hamilton P.B. (1989). Influence of degree of acetylation of scirpenol mycotoxins on feed refusal by chickens. *Poult. Sci.*, 68:854-856.
2. Agro. (2000). Conversión de cultivos, investigación aplicada. Una revolución agrícola. Año 1, No. 1, Febrero-abril; México.
3. Boutrif E., and Canet C. (1998). Mycotoxins prevention and control FAO programmes. *Revue. Med Vet.*, 149: 681-684.
4. Bullerman, L.B.; Tsai, W.Y. (1994). Incidence and levels of *Fusarium monilliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn-based foods and feeds. *J. Food Prof.* 57: 541-548.
5. CAST, (1989) Mycotoxins Economic and health risks. Task Force Rep. 116. council for Agricultural Science and technology, Ames, I.A.
6. Castegnaro M., and McGregor D. (1998). Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue med. Vet.*, 149:671-678.
7. Centro de estadística agropecuaria. (2000) Anuario estadístico de producción y comercialización de maíz. SAGAR, SECOFI, CONAPO, CANAMAIZ.
8. Centro de estadística agropecuaria, (2003) Situación actual y perspectiva de la producción de maíz en México 2003, SAGAR.
9. Chulze, S.; Ramírez, M.L.; Farnochi, M.C.; Pascale, M.; Visconti, A.; March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. *J. Agric F. Chem* 44:2797-2801.
10. Colvin B.M., and Harrison L.R. (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathology*, 117: 79-82.
11. Coppock R.W., Mostrom M.S., Sparling C.G., Jacobsen B., and Ross J.C. (1990). Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Vet. Human. Toxicol.*, 32:246-248.
12. Council for Agricultural Science and Technology. (1989). Mycotoxins economic and health risks. Report 116 November. United States of America. Pag. 7, 21, 24 y 25.
13. Desjardins A.E., Hohn T.M., and McCormick S.P. (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol. Rev.*, 57:595-604.

14. Doko, M. B.; Canet, C.; Brown, N; Sydenham, E. W.; Mpuchame, S.; Siame, B.A. (1996). Natural co-occurrence of fumonisins and zeralenone in cereals and cereal-based foods from eastern and southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3240-3243.
15. Espada Y., Ruiz de Gopegui R., Cuadras C., and Cabañes F.J. (1994). Fumonisin mycotoxicosis in broilers: weights and serum chemistry modifications. *Avian Dis.*, 38: 454-460.
16. Fandohan P., Hell K., Marasas W.F.O., Wingfield M.J. (2003) Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 570-579.
17. FAO, (2002). FAOSTAT Database, Food and Agriculture Organisation, Roma, Italy. URL: <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>.
18. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for micotoxins in 1995.
19. FAO/OMS, (1999). Micotoxinas de interés creciente. Tricotecenas. Tercera Conferencia Internacional Mixta. Túnez, Túnez, 3-6 de Marzo de 1999.
20. FDA (2000) Guidance for Industry: Fumonisin levels in human food and animal feed. Draft Guidance. USA Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition, Centre for Veterinary Medicine. URL: <http://vm.cfsan.fda.gov/dms/fumongui.html>.
21. Fink-Gremmeles, J. 1999. Micotoxins: their implications for human and animal health. *Vet Q.* 21:115-120.
22. Flores O.C.M., Hernández P.L.B. and Peñalosa, I. 2002. Natural occurrence of micotoxins in grains, raw materials and feedstuffs used in animal production in México during years 1999-2001. *Mycopathologia.* 151:229-234.
23. Franceschi S., Bidoli E., Baron A.E., and La Vecchia C. (1990). Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy, *JNCI.* 82: 1407-1411.
24. Frisvad J.C., and Samson R.A. (1991). Micotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. En: *Cereal Grain, micotoxins, fungi and quality in drying and storage.* Chelkowski J. (ed.) Developments in food Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 441-476
25. Gelderblom W.C.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P. G., Horak R.M., Vlegaar R., and N.P.J (1988). Fumonisin- novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ. Microbiol.*, 54:1806-1811.

26. Gelderblom W.C.A., Kriek N.P.J., Marasas W.F.O., and Thiel P.G. (1991). Toxicity fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis*, 12: 1247-1251.
27. Gelderblom W.C.A., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Vlegaar R., and Cawood M.E., (1992). Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, 117: 11-16.
28. Gonzalez, A.V. (1995). El maíz y su conservación edit. Trillas, México. 214-252.
29. Gourama H. y Bullerman. L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: areview. *J. Food Prot.* 58: 1395-1404.
30. Gremmels J.F., Jhan A., and Blom M.J. (1995). Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Nat. Toxins*, 3:214-220.
31. Harrison L.R., Colvin B.M., Greence J.T., Newman L.E., and Cole J.R., (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium verticillioides*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2: 217-221.
32. Haschek, W.M., Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L. and Beasley, W.J. (1992). Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117:83-96.
33. Hopmans, E. C. y Murphy P.A. (1993). Detection of fumonisins B₁, B₂, B₃ and hidrolized fumonisin B₁ in corn containing foods. *J. Agric. Food Chem*, 41:1655-1658.
34. Huff, W.E., Harvey, L. F., Kubena, L . F., and Rottinghaus, G. E. (1988). Toxic synergism between aflatoxins and T-2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* 67:1418-1423.
35. Hussein H.S., and Brasel L.M.(2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology.*, 167: 101-134.
36. International Agency for Research on Cancer (IARC).(1986). Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposure. En: Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol 41, pp22. ,World Health Organization. Lyon, France.
37. International Agency for Research on Cancer. (IARC), (1993a). Ochratoxin A: En: monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56, IARC pp. 489-521. Lyon, France.
38. International Agency for Research on Cancer. (IARC), (1993b). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and

mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 56:IARC, Lyon, France.

39. Jaramillo, M. (1999). Interacciones micotoxinas – nutrientes. Hallazgos relevantes, Universidad de Georgia, Estados Unidos Universidad Central de Venezuela. Pág.1-4.

40. Krogh P. (1992). Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 213-224.

41. Kubena L.F., Edrington T.S., Harvey R.B., Buckley S.A., Philips T.D., Rottinghaus G.E., and Casper H.H. (1997). Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 77:1502-1509.

42. Leeson S., Summers J.D., y Diaz G.J. (2000). Nutrición aviar comercial. Santa Fe, Bogota, Colombia. pp. 93-95.

43. Lew, H.; Adler, A.; Edinger, W.; (1990). Monilliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Mycotoxin Res* 74: 71-76.

44. Linsell C.A., and Peers F.G. (1977). Aflatoxins and liver cell cancer. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 471-473.

45. Logriego, A.; Moretti, A.; Altomare, C.; Bottalico, A.; Carbonell Torres, E (1993). Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia* 122: 185-190.

46. Magan N. and Olsen M. (2004) *Mycotoxins in food. Detection and control.* Woodhead Publishing Limited.

47. Marasas W.F.O., Jaskiewicz K., Venter F.S., and Van Schalkwyk D.J. (1988). *Fusarium verticillioides* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. Med. J/S.A. Med.*, 74: 110-114.

48. Miller M.A., Honstead J.P., and Lovell R.A. (1996). Regulatory aspects of fumonisins with respect to animal feeds. Animal derived residues in foods. En: *Fumonisin in foods.* Jackson L.S., De Vries J.W., Bullerman L.B. (eds.), Plenum Press, New York and London, pp.363-368.

49. Munkvold, G. P.; Desjardins, A. E. (1997). Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence. *Plant. Dis.* 81:556-565.

50. Nelson, P.E., Toussoun, T. A. , Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species An Illustrated Manual for Identification.* The Pennsylvania State. University Press. University Park.

51. Norred W.P., and Voss K.A. (1994). Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J Food Prot.*, 57:52-57.
52. Orsi RB, Correa, B.; Possi C.R.; Schammass E.A.; Nogueira J.R.; Dias S.M.C.; Malozzi M.A.B. (2000). Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J. Stor. Prod. Res.* 36: 75-87.
53. Oswald I.P., and Coméra C.(1998). Immunotoxicity of mycotoxins. *Revue. Med. Vet.*, 149: 585-590.
54. Osweiler G.D. (2000). Mycotoxins contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 16:511-530.
55. Osweiler G.D., Ross P.F., Wilson T.M., Nelson witte S.T., Carson T.L., Rice L.G., and Nelson H.A. (1992) Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swinw associated with fumonisin in corn screenings. *J. Vet. Diagn Invest.*, 4:53-59.
56. Overnes G., Matre T., siversten T., larsen H.J., Langseth W., Reitan L.J., jansen J.H. (1997). Effects of diets with graded levels of naturally deoxynivalenol-contaminate oats on immune response in growing pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 44:539-550.
57. Peraica M., Radic B., Lucic A., and Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.*, 77:754-766.
58. Peers F.G., Gilman G.A., and Linsell C.A. (1976). Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland. *Int. J. Cancer*, 17:167-176.
59. Pittet A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an updated review. *Revue. Med. Vet.*, (149) 6: 479-492.
60. Plattner R.D., Weisleder D., Shackelford D.D., Peterson R., and Powell R.G. (1992). A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia.*, 117: 23-28.
61. Pont G., Jordana J., Campanera P., y Arroyo R. (1989). El problema de la contaminación fúngica en la industria de los piensos. LUCTA. (2ª Edición) Barcelona, España. Pag. 21-72.
62. Prelusky D.B., Rotter B.A., and Rotter R.G. (1994). Toxicology of micotoxins. En: *Mycotoxins in Grains. Compound other than aflatoxin*. Miller J.D., and Trenholm H.L. (eds.) Eagan Press St. Paul, Minnesota, USA. pp. 359-404.
63. Ramos A.J., and Hernández E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilication addition to feedstuffs. A review. *Anim. Feed Sci Technol.*, 65: 197-206.

64. Reyes, C.P. 1990. El maíz y su cultivo. Ed. A.G.T. México D.F.
65. Rheeder J.P., Marasa W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., and Van Schalkwyk D.J. (1992). *Fusarium verticillioides* and fumonisin in corn in relation to human esophageal cancer in Traskei. *Phytopathology.*, 82: 353-357.
66. Riley R.T., Norred W.P., and Bacon C.W. (1993). Fungal toxins in foods recent concerns. *Anu. Rev. Nutr.*, 13: 167-189.
67. Ross P.F., Nelson P.E., Richard J.L., Osweiler G.D., Rice L.G., Plattner R.D., and Wilson T.M. (1990). Production of fumonisins by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 : 3225-3226.
68. Rotter B.A., Prelusky D.B., and pestka J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health.*, 48:1-34.
69. Saubois, A.; Piontelli, L.E. (1995). Incidencia, identificación y distribución de cepas de *Fusarium* en maíz. VII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, 8-11 de mayo.
70. Scott P.M. (1994). *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. En: Micotoxin in grain. Compounds other than aflatoxin. Miller J.D., and trenholm H.L. (eds.). Eagan Press USA, pp. 261-286.
71. Seo J.A., and Lee Y.W. (1999). Natural occurrence of the series of fumonisins in moldy corn. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1331-1334.
72. Shier W.T. (1998). Estrogenic mycotoxins. *Revue Med. Vet.*, 149:599-604.
73. Sydenham E.W. Thiel P.G., Marasas W.F.O., Shephard G.S., Van Schalkwyk D.J., and Koch K.R. (1990). Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. Agrc. Food Chem.*, 38: 1900-1903.
74. Steyn P.S. (1998). The biosynthesis of mycotoxins. *Revue. Med. Vet.*, 149: 469-478.
75. Torres, A.; Reynoso, M.M.; Rojo, F.; Ramírez, M.L.; Chulze, S. (2001). Fungal and mycotoxin contamination in home grown maize harvested in the north area of Argentina. *Food. Addit. Contam.* 18: 836-843.
76. Turner W.B., and Aldridge D.C. (1983). Fungal metabolites II. Academic Press, London U.K.

77. Van Rensburg S.J., Cook-Mozuffari P., Van Der Watt J.J., Vicent T.J., and Purchase I.F. (1985). Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and transkei. *Br. J. Cancer.*, 51: 713-726.
78. Varga J., Kevei E., Rinyu E., Teren J., and Kozakiewicz Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4461-4464.
79. Ware, G.M., Umrigar, P.P. and Carman, S.S. Jr., (1994). Evaluation of fumonitest immunoaffinity columns. *Analytical Letters*, 27 (4): 693-715.
80. Weaver G.A., Kurtz H.J., Behrens J.C., Robison T.S., Seguin B.E., Bates F.Y., and Mirocha C.J. (1989). Effect of zearalenone on dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 47:1826-1828.

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO.

Nash-Snyder: Peptona 15 g; KH_2PO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; Agar 20 g; Pentacloronitrobenzeno, 1 g; Agua destilada, 1000 mL.

Se ajusta el pH a 5.5-6.5 y se esteriliza en autoclave, se deja enfriar al medio a 50° C y se agregan 20 ml de sulfato de estreptomicina (Solución stock) y 12 ml de sulfato de neomicina (Solución stock) por litro.

Solución stock: 5 g de sulfato de estreptomicina en 1000 mL de agua destilada; 1 g de sulfato de neomicina en 1000 mL de agua destilada.

Agar hojas de Clavel (AHC): 15 g de agar ultra puro por cada 1000 mL de agua destilada. Esterilizar el medio durante 15 minutos a 121° C en autoclave. Se fracciona en placas de Petri de 6 cm por 15 mm; y se colocan las hojas de clavel estériles (3-4 hojas por placa).

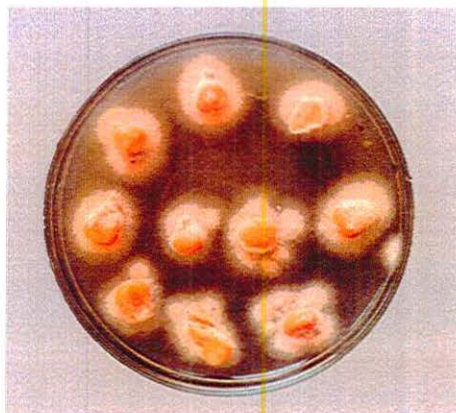
Agar Agua (AA): Agar 15 g; Agua destilada, 1000 mL. Se esteriliza durante 15 minutos a 121° C en autoclave.

Agar papa glucosado (APG): Papas 250 g; Agar 20 g; Glucosa 20 g; Agua destilada 1000 mL.

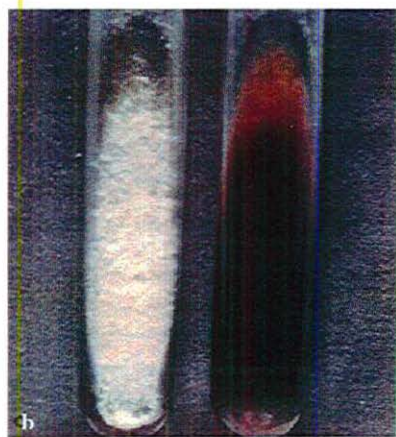
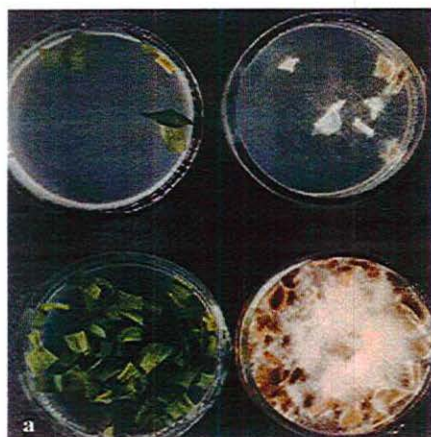
Las papas con cáscara se lavan, se cortan en trozos, y se hidratan con 500 mL de agua destilada, se hierven en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Por otro lado se esteriliza el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtra el caldo con las papas a través de gasa y se adiciona el agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneiza para obtener un puré y la mitad de éste se adiciona al agar junto con la glucosa, luego se lleva a volumen con agua destilada (1000 ml). Se distribuye el medio en tubos de ensayos y se esteriliza por autoclave a $\frac{3}{4}$ de atmósfera durante 20 minutos.

ANEXO 2

Contaminación de granos de maíz con especies de *Fusarium* en el medio Nash – Snyder

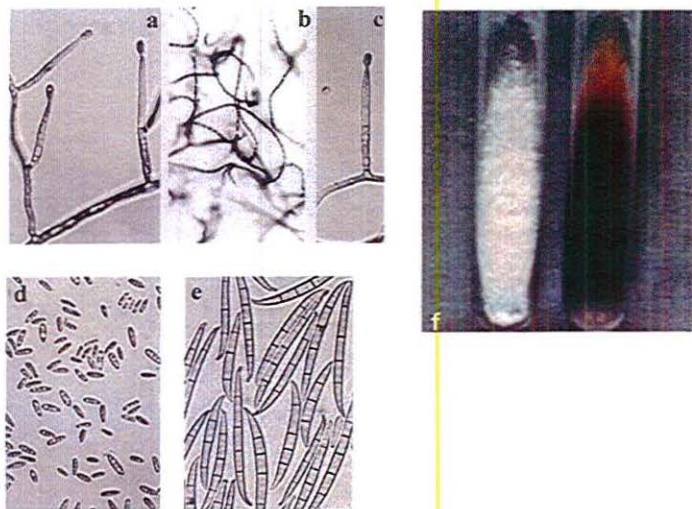
**ANEXO 3**

Crecimiento de especies de *Fusarium* en el medio a) Agar Hojas de Clavel (AHC) y b) Agar Papa Glucosado (APG).



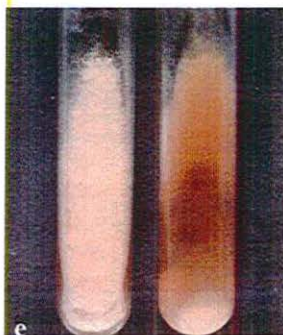
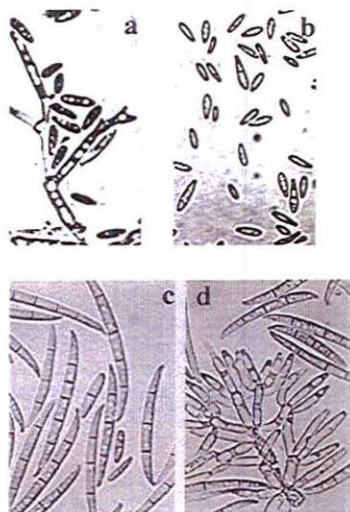
ANEXO 4

Fusarium verticillioides. (a-e) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a y c, Microconidióforos: monofálides; b, cadenas de microconidios; d, microconidios; e, macroconidios (f) Características macroscópicas en APG.



ANEXO 5

Fusarium proliferatum. (a-d) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Microconidióforos: polifialides; b, microconidios; c, macroconidios; d, microconidióforos: monofialides. (e) Características macroscópicas en APG.



ANEXO 6

Fusarium subglutinans. (a-c) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Falsas cabezas de microconidios; b y c, Microconidióforos: polifialides. (d) Características macroscópicas en APG.

