

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



CARACTERIZACIÓN MICOTOXICOLÓGICA DE ESPECIES DE *Fusarium* SECCIÓN
Liseola AISLADAS DE DOS VARIEDADES DE MAÍZ

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA

CÉSAR ENRIQUE CASTRO ZAMBRANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ

ASESORA:

DRA. MARIA MARTA REYNOSO

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO

MAYO 2006

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
1. Género <i>Fusarium</i>	3
1.1. Descripción taxonómica del género <i>Fusarium</i>	4
2. Principales micotoxinas producidas por los hongos del género <i>Fusarium</i> sección <i>Liseola</i>	7
2.1. Fumonisinias	7
2.1.1. Especies productoras de fumonisinias	9
2.1.2. Efectos biológicos de las fumonisinias	10
2.1.3. Mecanismo de acción de las fumonisinias	11
2.2. Fusaproliferina	12
2.2.1. Especies productoras de fusaproliferina	12
2.2.2. Mecanismo de acción de la fusaproliferina	13
2.3. Incidencia de fumonisinias y fusaproliferina en alimentos	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
1. Muestreo	21
2. Aislamiento especies de <i>Fusarium</i>	21
3. Identificación de especies de <i>Fusarium</i>	22
4. Caracterización micotoxigénica	23

4.1. Producción de fumonisinas	23
4.1.1. Detección y cuantificación de fumonisina	23
4.2. Producción de fusaproliferina	24
4.2.1. Detección y cuantificación de fusaproliferina	24
5. Análisis estadístico	25
6. Análisis de las condiciones climatológicas	25
RESULTADOS	26
1. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> sección <i>Liseola</i> aisladas de dos variedades de maíz cosechadas en una localidad del estado de Jalisco	26
2. Evaluación de la producción de fumonisinas y fusaproliferina por las cepas de <i>Fusarium</i> sección <i>Liseola</i> aisladas	31
3. Condiciones climáticas	35
3.1 Temperaturas registradas durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003	35
3.2 Precipitación pluvial registrada durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003	37
3.3 Humedad relativa (HR) registrada durante el periodo comprendido de mayo a diciembre de 2003	37
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXO 1 Medios de cultivo	63

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias:

- A Dios, por darme cada día la fuerza, la paciencia, la sabiduría y la tenacidad para llegar hasta donde ahora he llegado.
- A mis padres, por ser los pilares en los que he construido cada una de mis metas, gracias papás por todo.
- A mis hermanos; por apoyarme siempre y estar en esos momentos importantes de mi vida.
- A mis tíos, tías, abuelos; porque sin importar la distancia siempre han estado cerca alentándome a seguir siempre adelante; especialmente a mi tía Midia.
- Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (especialmente al Depto. de Salud Pública y al Depto. de Producción Animal) y a la Universidad Nacional de Río Cuarto; Argentina, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.
- A los miembros del jurado revisor: Dr. Mario Noa Pérez, M.C. Cristina Morán Salas, y al Dr. Manuel Rosales Cortéz, por sus valiosas sugerencias en la realización de este trabajo.
- A la Dra. Waldina Patricia Reyes Velásquez, por contribuir en mi formación académica, profesional y personal, así como por todo el apoyo recibido de su parte. Dios la bendiga siempre.
- A la Dra. Maria Marta Reynoso, por haber hecho ese gran esfuerzo de venir desde tan lejos y por su valiosa guía durante la elaboración de este trabajo.
- A la Mtra. Marina Figueroa Gómez; por los consejos y las agradables charlas, que hacían más ameno y divertido este bello arte de hacer ciencia.
- Al Mic. Federico Rojo, por todos aquellos conocimientos transmitidos durante su estancia en Guadalajara que fueron de gran utilidad para la realización de este trabajo; muchísimas gracias por todo hermano, y éxito en lo que hagas siempre.

- A todos aquellos amigos que han estado conmigo siempre en los buenos y malos momentos, especialmente a Gaby, Alejandro, Yessica, a Janet, a las dos Adrianas y a Chacho; mi fiel amigo de cuatro patas.
- A Lilith, por darme en esta etapa de mi vida el apoyo y el deseo de realizar este y otros sueños que espero en el futuro se hagan realidad.
- A todas aquellas personas que han llegado recientemente a mi vida y que seguramente estarán presentes en la realización de mis metas futuras; gracias Benjamín por lo que hasta hoy haz hecho por mí.
- A todos aquellos animales que durante mi formación académica dieron su vida para mi aprendizaje y para mi realización profesional.

INDICE DE ABREVIATURAS

- µg: Microgramo.
µl: Microlitro.
µm: Micrómetro.
ACH: Agar hojas de clavel.
APG: Agar papa glucosado.
BEA: Beauvericina.
DAS: Diacetoxisciprenol.
DON: Deoxinivalenol.
ELEM: Leucoencefalomalacia equina.
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
FB₁: Fumonisina B₁.
FB₂: Fumonisina B₂.
FBs: Fumonisinas.
FUS: Fusaproliferina.
FUSA: Fusarenona X.
g: Gramo.
GC – SM: Espectrometría de Masa.
GC: Cromatografía gaseosa.
HPLC: Cromatografía de gases de alta precisión.
HR: Humedad relativa
ml: Mililitro.
mm: Milímetro.
MON: Moliniformina.
NDA: Dicarboxialdehído – naftaleno.
NIV: Nivalenol.
nm: Nanómetro.
OPA: O-phthadialdehído.
PPE: Edema pulmonar porcino.
SA/SO: Esfingosina – Esfinganina.
TLC: Cromatografía de capa fina.
ZEN. Zearalenona.

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Especies biológicas del complejo <i>Gibberella fujikuroi</i> y su correspondiente anamorfo y teleomorfo.	5
2	Niveles de fumonisinas ($\mu\text{g/g}$) en alimentos asociados con ELEM y PPE.	14
3	Niveles de fumonisinas en alimentos para animales.	15
4	Incidencia de <i>Fusarium</i> (Sección <i>Liseola</i>) en muestras de diferentes variedades cosechadas en una localidad del estado de Jalisco.	27
5	Caracterización morfológica y cultural de las cepas de <i>Fusarium</i> aisladas de diferentes variedades de maíz.	30
6	Producción de fumonisinas por las cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> aisladas de la variedad de maíz Alsa 036W.	33
7	Producción de fumonisinas por las cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> aisladas de la variedad de maíz Lince.	34
8	Producción de fumonisinas y fusaproliferina por las cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> y <i>F. subglutinans</i> aisladas de las variedades de maíz Alsa 036W y Lince.	35
9	Temperaturas máximas, promedio y mínimas registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003.	36
10	Precipitación pluvial registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003.	37
11	Humedad relativa registrada en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003.	38

LISTA DE FIGURAS

Tabla		Página
1	Estructura química de las fumonisinas.	8
2	Estructura química de la fusaproliferina.	12
3	Contaminación de granos de maíz con especies de <i>Fusarium</i> en el medio Nash – Snyder.	27
4	<i>Fusarium verticillioides</i> . (a-e) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a y c, Microconidióforos: monofiálides; b, cadenas de microconidios; d, microconidios; e, macroconidios; (f) Características macroscópicas en APG.	28
5	<i>Fusarium proliferatum</i> . (a-d) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Microconidióforos: polifiálides; b, microconidios; c, macroconidios; d, microconidióforos: monofiálides. (e) Características macroscópicas en APG.	28
6	<i>Fusarium subglutinans</i> . (a-c) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Falsas cabezas de microconidios; b y c, Microconidióforos: polifiálides. (d) Características macroscópicas en APG.	29
7	Granos de maíz autoclavados para la producción de fumonisinas y fusaproliferina. a) sin inocular b) inoculado con cepas de <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> ó <i>F. subglutinans</i> después de 28 días de incubación.	31

RESUMEN

El maíz se considera como el cultivo de mayor importancia en México y es la base de la alimentación de humanos y animales. Las especies de *Fusarium* (Sección *Liseola*) pueden causar diversas enfermedades en dicho cereal y producir micotoxinas, tales como fumonisinas y fusaproliferina. En este estudio se analizaron dos híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco durante la cosecha agrícola 2003. Se determinó la incidencia con especies de *Fusarium* y se evaluó la capacidad de producir fumonisinas y fusaproliferina por las especies aisladas. *Fusarium verticillioides* fue la especie aislada con mayor frecuencia en ambos híbridos evaluados, seguida por *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Las cepas de *F. verticillioides* (media= 1 377.2 $\mu\text{g g}^{-1}$) y *F. proliferatum* (media= 2 978.4 $\mu\text{g g}^{-1}$) produjeron altos niveles de fumonisinas (FBs), mientras que las cepas de *F. subglutinans* produjeron los niveles menores (media= 273.4 $\mu\text{g g}^{-1}$). Además, las cepas de *F. proliferatum* y *F. subglutinans* produjeron fusaproliferina (FUS) en niveles que variaron entre 32 y 49.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 37.5 y 52.5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, mientras que sólo 4 de 11 cepas de *F. verticillioides* produjeron FUS (media= 34.3 $\mu\text{g g}^{-1}$). Los resultados del presente estudio indican que las cepas de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* aisladas del estado de Jalisco (México) son capaces de producir fumonisinas y fusaproliferina en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, sería de interés determinar la incidencia natural de dichas micotoxina en maíz, considerando los efectos toxicogénicos de las mismas y los efectos combinados con otras micotoxinas. Los resultados obtenidos aportan los primeros datos sobre la capacidad de producción de FUS por cepas de *Fusarium* pertenecientes a la sección *Liseola*, aisladas de maíz en México.

INTRODUCCIÓN

El maíz se considera como el cultivo de mayor importancia en México; el 72% del total de producción de maíz se destina para el consumo humano y se considera una de los principales ingredientes considerados como fuente de energía en la formulación de dietas para los animales domésticos. Representa el 43 % de la superficie cultivada y es el alimento básico para la población (SAGARPA, 2003), siendo el estado de Jalisco el primer lugar en producción de este cereal; en el año 2004 se obtuvieron 3 340 000 toneladas (SEDER, 2005).

La contaminación de los alimentos destinados tanto para consumo humano y animal ha cobrado gran importancia a nivel mundial debido principalmente a la gama de padecimientos que dichos contaminantes puedan ocasionar una vez que se han ingerido; entre los contaminantes naturales destacan las micotoxinas, las cuales producen pérdidas económicas directas que resultan de la disminución en la producción y en la calidad de los granos, disminución de la producción animal (baja conversión alimenticia); todo esto aunado al costo que representa el diseño de programas de monitoreo y el establecimiento de parámetros que determinen los niveles máximos permitidos con el objeto de reducir al mínimo los riesgos para la salud humana y animal. Es necesario destacar las pérdidas de los productores afectados, ya que se ocasionan graves pérdidas por rechazo de sus productos en los mercados internos y externos (Mannon y Johnson, 1985).

Las micotoxinas se definen como compuestos orgánicos, biológicamente activos y de amplio espectro que pueden causar intoxicaciones agudas y crónicas, mostrando efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos, entre otros (Hesseltine, 1985). Estos compuestos son considerados metabolitos secundarios porque no cumplen un papel en la fisiología del organismo que los producen y se sintetizan después de la fase exponencial del crecimiento del hongo.

Las micotoxinas presentan estructuras químicas muy diversas y pueden ser clasificadas según su ruta biosintética. Esto se debe a que tanto el metabolismo primario como el secundario están relacionados por un reducido número de intermediarios metabólicos simples, como la acetil-CoA, ácido mevalónico, aminoácidos y ácido shikímico. Se han identificado más de 300 compuestos micotóxicos diferentes, producidas por aproximadamente 350 especies de hongos (Betina, 1989).

Las principales especies implicadas en la producción de micotoxinas en el maíz pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. El género *Fusarium* es considerado como el hongo micotoxicogénico más frecuentemente asociado al maíz recién cosechado. Aunque las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* han sido consideradas como hongos de almacenamiento, ambas también han sido aisladas en el estado de cosecha (Moss, 1996).

Muchas especies de *Fusarium* producen numerosos metabolitos secundarios que causan diferentes respuestas fisiológicas y farmacológicas en plantas y animales. Las especies del género *Fusarium* son las más conocidas por la producción de tricotecenos, pero también pueden producir otras micotoxinas, así como una gran variedad de otros compuestos tales como pigmentos, antibióticos y fitotoxinas (Nelson *et al.*, 1993).

Los principales grupos de micotoxinas del género *Fusarium* aisladas de granos de cereales son: tricotecenos, incluyendo a toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS), deoxinivalenol (DON), fusarenona X (FUSA), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEN) y fumonisinas (FBs). Además, también se han detectado otras micotoxinas como moniliformina (MON), beauvericina (BEA) y fusaproliferina (FUS) (Bottalico, 1998).

Las micotoxicosis se caracterizan por ser padecimientos no contagiosos, no infecciosos, y generalmente la signología que suelen presentar los organismos

afectados desaparece descartando el alimento contaminado. Todas las toxinas que afectan al hombre y a los animales por lo regular se encuentran en cultivos post cosecha, ya que muchas especies de hongos saprófitos producen dichas toxinas durante el almacenamiento o durante el crecimiento de la planta, como lo hacen las especies endofitas (Hussein y Brasel, 2001).

La presencia de micotoxinas en los alimentos se da por la presencia de factores en el medio ambiente; principalmente condiciones de humedad y temperatura óptimas para el crecimiento y desarrollo de los hongos que producen este tipo de sustancias, aunado a las condiciones de almacenaje y manejo de las materias primas con la que dichos alimentos se elaboran, por lo que hay que tener cuidado con el manejo que se les da a los alimentos; en cuanto almacenaje, controles de temperatura, y manejo de híbridos resistentes a la contaminación con hongos productores de micotoxinas (Hussein y Brasel, 2001).

1. Género *Fusarium*

Las especies del género *Fusarium* están distribuidas mundialmente y es común encontrarlas en regiones tropicales y templadas, aunque también es posible aislarlas en el desierto, en regiones alpinas y áreas árticas (Nelson, 1992). Esta amplia distribución se debe gracias a su capacidad para colonizar una amplia gama de sustratos y a un mecanismo muy eficiente para disgregarse en los mismos. Estas características hacen que estas especies se adapten rápidamente a nuevos nichos ecológicos creados por el hombre. Se encuentran como saprófitos en el suelo y en vegetales en descomposición de toda clase. Además juegan un papel importante en la biodegradación de los materiales orgánicos como de los productos farmacéuticos (Thomas, 1984).

1.1. Descripción taxonómica del género *Fusarium*

Pertenece a los Hyphomycetes y se considera como anamorfo relacionado con el orden Hypocreales (Ascomycetes). Las etapas sexuales (teleomorfos) de muchas de las especies más importantes pertenecen al género *Gibberella*, mientras que un número de especies también tienen sus estados teleomorfos en el género *Haematonectria*.

Algunos hongos del género *Fusarium* son patógenos de insectos (Claydon y Grove, 1984) y otros son agentes de enfermedades en humanos y animales vertebrados, causando micosis y posiblemente alergias (Austwick, 1984). La mayoría son parásitos de plantas nativas y cultivadas, causando podredumbre de frutos y marchitamiento (Bottalico *et al.*, 1983, 1987; Logrieco y Bottalico, 1988).

Gibberella fujikuroi (Sawada) es el estado sexual (teleomorfo) de varias especies de *Fusarium* de la sección *Liseola*, que incluyen *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg y *F. subglutinans* (Wollenweber and Reinking) Nelson, Tousson & Marasas. Los taxónomos aún discuten en cuanto al número de especies dentro de ésta sección y sobre los criterios morfológicos usados para distinguirlos.

El uso del concepto de especies con carácter diagnóstico es una forma de evitar las dificultades en la identificación cuando los organismos son morfológicamente similares (Leslie y Mansuetus, 1995; Leslie, 1996). El apareamiento por lo tanto, es una herramienta útil para definir las especies biológicas en el complejo *G. fujikuroi*. Se han descrito 8 poblaciones de apareamiento para este complejo, denominadas A, B, C, D, E, F, G y H (Tabla 1).

La identificación de las poblaciones de apareamiento a la cual pertenecen las cepas aisladas en el campo es de importancia desde el punto de vista micotoxicológico y fitopatológico (Leslie, 1991).

Tabla 1. Especies biológicas del complejo *Gibberella fujikuroi* y su correspondiente anamorfo y teleomorfo.

Anamorfo	Especie biológica	Teleomorfo
<i>F. verticillioides</i>	A	<i>G. moniliformis</i>
<i>F. sacchari</i>	B	No descrito
<i>F. fujikuroi</i>	C	<i>G. fujikuroi</i>
<i>F. proliferatum</i>	D	<i>G. intermedia</i>
<i>F. subglutinans</i>	E	<i>G. subglutinans</i>
<i>F. thapsinum</i>	F	<i>G. thapsina</i>
<i>F. nygamai</i>	G	<i>G. nygamai</i>
<i>F. circinatum</i>	H	<i>G. circinata</i>

Leslie, 1996

Las especies biológicas pueden diferenciarse considerando otros criterios, como la producción diferencial de metabolitos secundarios (Leslie *et al.*, 1992a). Los miembros de la población de apareamiento A, anamorfo *F. verticillioides*, son capaces de sintetizar niveles altos de fumonisinas, mientras que los miembros de la población F anamorfo *F. thapsinum*, no son productores de dicha micotoxina. Los miembros de las poblaciones D y G son capaces de sintetizar cantidades significantes de fumonisinas, mientras que los miembros de las poblaciones B y E son productores de bajos niveles o no productores de la misma (Leslie *et al.*, 1992b).

Los miembros de las poblaciones B, C, D, E y F son productores de altos niveles de moniliformina, mientras que los miembros de las poblaciones A no son productores de dicha toxina. En cuanto a la producción de beauvericina, las poblaciones A, B, C, D, E son altos productores y los miembros de la población F no la producen. Los miembros de la población D y E son buenos productores de fusaproliferina, mientras que los miembros de las poblaciones A, B, C y F no son buenos productores (Logrieco *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 1996).

Los estudios taxonómicos del género *Fusarium* tienen dos inconvenientes: la falta de estabilidad de las especies en los medios comunes de laboratorio y el uso de distintos sistemas empleados para su clasificación en diferentes países.

Los sistemas taxonómicos usados hasta el presente por varios autores están basados sobre variantes de dos escuelas micológicas, la de Wollenweber y Reinking (1935) en la cual se reconocían 65 taxones y la de Snyder y Hansen (1940, 1941, 1945) que aceptaban solamente 9 especies.

Todas las especies de *Fusarium* tienen una característica taxonómica en común: la producción de macroconidios de diversas formas, generalmente con una sola célula basal en forma de pie, cuando los mismos se producen en esporodoquios. Este criterio combinado con otras características primarias o secundarias, constituyeron la base para la taxonomía clásica del género.

Para la separación de especies del género *Fusarium*, Nelson *et al.* (1983) también se basaron en características primarias y secundarias. Las primeras contemplan la forma del macroconidio, la presencia o ausencia de microconidios, forma del microconidio, si crecen o no en cadenas y el tipo de microconidióforo. Las características secundarias se basan en la presencia o ausencia de clamidosporas, la configuración y posición de las mismas, la presencia o ausencia de esclerocios y esporodoquios. La morfología de la colonia, la pigmentación y la velocidad de crecimiento son de utilidad si se usan procedimientos estandarizados. Basándose en dichas características dividieron al género en 12 secciones: *Eupionnotes*, *Spicarioides*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans* y *Martiella – Ventricosum*.

Las especies del género *Fusarium* pueden mostrar mucha variación debido a su constitución genética y por la influencia de factores ambientales. Dichas variaciones pueden causar problemas para una correcta identificación en caso de no seguir procedimientos estandarizados para el cultivo y la conservación. En caso

contrario se producen cultivos mutantes que son difíciles de identificar porque éstos generalmente pierden sus características culturales típicas (Marasas *et al.*, 1987).

Las especies de *Fusarium* que taxonómicamente se ubican en la Sección *Liseola* son importantes como patógenas de distintas plantas de interés económico como arroz (Sun y Snyder, 1981), maíz (Leslie *et al.*, 1990), sorgo (Jardine y Leslie, 1992), espárragos (Elmer y Ferrandino, 1992), piña (Rohrback y Pfeiffer, 1976), plátanos (Shaw *et al.*, 1993). Las toxinas y metabolitos secundarios producidos por estas especies son química y biosintéticamente diversos e incluyen compuestos tales como fumonisinas (Gelderblom *et al.*, 1988a), moniliformina (Marasas *et al.*, 1986), fusaproliferina (Logrieco *et al.*, 1996), beauvericina (Logrieco *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 1996) y otras toxinas que aún permanecen sin identificarse (Leslie *et al.*, 1996).

2. Principales micotoxinas producidas por los hongos del género *Fusarium* sección *Liseola*

2.1. Fumonisinias

Las fumonisinas (FBs) son un grupo de toxinas aisladas por primera vez a partir de cultivos de *F. verticillioides* MRC 826 en maíz (Gelderblom *et al.*, 1988a). El aislamiento y caracterización de dicha micotoxina se inició por la muerte de numerosos caballos de leucoencefalomalacia principalmente en Nueva Caledonia y una elevada incidencia de cáncer esofágico en Sudáfrica. El alimento ingerido por los caballos estaba contaminado con *F. verticillioides*. Dos grupos independientes, uno en Sudáfrica y otro en Nueva Caledonia, aislaron fumonisina B₁ (FB₁), la más abundante de las fumonisinas, a partir de dicho alimento (Bezuidenhout *et al.*, 1988).

Químicamente, las fumonisinas son una serie de aminopoliolios de cadena larga (20 carbonos) esterificados en los carbonos 14 y 15 con dos grupos de ácidos tricarbóxicos (Figura 1). Se han identificado hasta la fecha diez fumonisinas: FA₁,

no polares (Murphy *et al.*, 1993). FB₁ es estable al calor, por ejemplo el calentamiento a temperatura de ebullición por 30 minutos seguido de un secado a 60°C por 24 horas no produce cambios en la concentración (Alberts *et al.*, 1990). Es posible recuperar cerca de un 40% de FB₁ y FB₂ al calentar harina de maíz a 190 °C; a temperaturas superiores la pérdida es total (Scott y Lawrence, 1992). La nixtamalización y la amoniación reducen el contenido de FBs mientras que incrementan la concentración de FBs hidrolizadas (Kuiper-Goodman *et al.*, 1996; Voss *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1997; Norred *et al.*, 1998, Reyes *et al.*, 2002).

Las FBs son similares estructuralmente a la esfingosina. Se propone que estas toxinas tendrían un camino biosintético similar (Abbas y Shier, 1992; Plattner y Shackelford, 1992); sin embargo, los datos experimentales sugieren una vía similar a la de los policétidos (Miller, 1992).

Una gran variedad de métodos analíticos se han desarrollado para la detección y cuantificación de las FBs en diferentes sustratos que incluyen: cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (Sydenham *et al.*, 1990), cromatografía de capa fina (TLC) (Rottinghaus *et al.*, 1992), métodos inmunológicos como ELISA (Azcona-Olivera *et al.*, 1992), cromatografía gaseosa (GC) (Sydenham *et al.*, 1990), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-SM) (Voss *et al.*, 1989). Debido a que las fumonisinas no poseen un grupo cromóforo, la mayoría de los métodos analíticos dependen de una derivatización previa con fluorocromos como: o-phthaldialdehído (OPA) (Shephard *et al.*, 1992), dicarboxaldehído naftaleno (NDA) (Bennet y Richard, 1994), fluorescamina (Sydenham *et al.*, 1990; Rottinghaus *et al.*, 1992), 4-fluoro-7- nitrobenzofurazan (Scott y Lawrence, 1992), isotiocianato de fluoresceína (Maragos, 1995).

2.1.1. Especies productoras de fumonisinas

Muchas cepas de *F. verticillioides*, aisladas no sólo a partir de maíz y alimentos balanceados a base de maíz, sino de otros sustratos como sorgo y arroz, son

capaces de producir FBs (Gelderblom *et al.*, 1988a, b; Reynoso *et al.* 2004). Algunas especies de *Fusarium* Sección *Liseola* (*F. proliferatum*, *F. anthophilum* y *F. globosum*) son capaces también de producir FBs (Nelson *et al.*, 1992; Chulze *et al.*, 1996, 1998a; Sydenham *et al.*, 1997, Reynoso *et al.* 2004). Sin embargo, *F. subglutinans* es productor de bajos niveles o no productor de la toxina (Leslie *et al.*, 1992 b; Nelson *et al.*, 1992; Chulze *et al.*, 1996, 1998a; Torres *et al.*, 2001). Especies relacionadas a la Sección *Liseola*, recientemente descritas son productoras de FBs, ellas son: *F. dlamini*, *F. napiforme* y *F. nygamai* (Nelson *et al.*, 1992).

2.1.2. Efectos biológicos de las fumonisinas

De las toxinas descritas, solamente FB₁ y FB₂ parecen tener importancia toxicológica ya que, tanto FB₃ y FB₄, FA₁ y FA₂ cuando se encuentran en condiciones naturales se presentan en bajas concentraciones.

Se ha demostrado que FB₁ es causante de:

- ❖ Leucoencefalomalacia (ELEM) en equinos (Weibking *et al.*, 1993).
- ❖ Edema pulmonar (PPE) en cerdos (Harrinson *et al.*, 1990).
- ❖ Hepatotóxicidad y hepatocarcinogenicidad en ratas (Gelderblom *et al.*, 1991; Voss *et al.* 1993).
- ❖ Inmunosupresión (Qureshi y Hagler, 1992).

En humanos se ha relacionado estrechamente con el incremento de la incidencia de cáncer esofágico en poblaciones de Sudáfrica (Rheeder *et al.*, 1992; Chu y Lee, 1994; Marasas, 1995), en China (Yang, 1980; Chu y Lee, 1994; Yoshizawa *et al.*, 1994), Irán (Kmet y Mahboubi, 1972) y Carolina del Sur (Fraumeni y Blot, 1977).

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, estableció que: a) hay *evidencia insuficiente* de la carcinogenicidad en humanos de las toxinas derivadas de *F. verticillioides*, b) hay *evidencia suficiente* de la carcinogenicidad en animales de experimentación de material de cultivo de *F. verticillioides*, c) hay *evidencia limitada* de la carcinogenicidad de FB₁ en animales de experimentación. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, las toxinas derivadas de *F. verticillioides* son consideradas como 2B, "posibles carcinógenos para humanos" (IARC, 1993).

2.1.3. Mecanismo de acción de las fumonisinas.

Hasta el momento el mecanismo por el cual las fumonisinas inducen ELEM, PPE y hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y carcinoma hepatocelular en ratas de laboratorio es desconocido, pero podría relacionarse con la alteración del metabolismo de los esfingolípidos.

Estudios *in vitro* han revelado que la FB₁ es un potente inhibidor de la biosíntesis de los esfingolípidos, lo cual se refleja en cambios de las proporciones de esfinganina/esfingosina (SA/SO) (Merrill *et al.*, 1993; 1995; 1996; 1997). La biosíntesis de los esfingolípidos comprende los pasos enzimáticos que ocurren en el retículo endoplásmico y que comienzan con la condensación de la serina y palmitoil - CoA para formar 3 - cetoesfinganina y que terminan con la formación de ceramida (N - acilesfingosina) la cual es formada por la reducción de la dihidroceramida (N - acilesfinganina) por la N - aciltransferasa (Merrill, 1991). FB₁ inhibe la N - aciltransferasa (ceramida sintetasa), una enzima crítica en la biosíntesis de los esfingolípidos. La relación SA/SO en sueros y tejidos obtenidos a partir de cerdos, caballos y ratas ha sido relacionado con la ingestión de alimentos que contenían FB₁ (Riley *et al.*, 1994).

2.2. Fusaproliferina

La fusaproliferina (FUS) fue aislada y purificada por primera vez a partir de un cultivo de *Fusarium proliferatum* ITEM - 1494 aislado de maíz en el norte de Italia (Ritieni *et al.*, 1995). Químicamente es un sesterterpeno bicíclico tóxico con 5 unidades isoprénicas, 4 unidades C = C y 4 átomos quirales (Figura 3) (Randazzo *et al.*, 1993; Ritieni *et al.*, 1995, Munkvold *et al.*, 1998). El peso molecular es muy compatible con su fórmula molecular $C_{27}H_{44}O_5$. La estereoquímica de FUS se determinó por análisis de rayos X y es consistente con la vía biosintética del ácido retigeránico (Santini *et al.*, 1996).

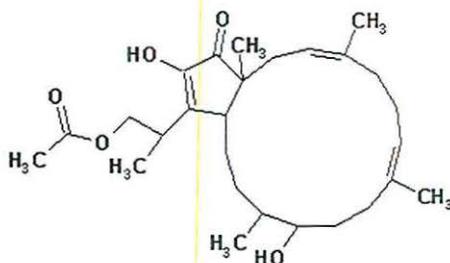


Figura 2. Estructura química de la fusaproliferina (Logrieco *et al.*, 1996)

2.2.1. Especies productoras de fusaproliferina

Entre las especies de *Fusarium* productoras de FUS se encuentran *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, aisladas de maíz de Austria, Canadá, Italia, Polonia, Perú y Estados Unidos (Logrieco *et al.*, 1996; Reynoso *et al.*, 2004). Otras especies del género *Fusarium*, tales como, *F. globosum*, *F. guttiforme*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai* y *F. verticillioides* también son productoras de dicha micotoxina (Moretti *et al.*, 1998; Castellá *et al.*, 1999b; Shephard *et al.*, 1999; Fotso *et al.*, 2002; Srobarova *et al.*, 2002). En el complejo *G. fujikuroi*, FUS es producida en altas concentraciones por cepas pertenecientes a las poblaciones de apareamiento D y E,

mientras que los miembros de las poblaciones A, B, C y F la producen en muy bajos niveles o no producen dicha toxina (Moretti *et al.*, 1996, Reynoso *et al.* 2004).

2.2.2. Mecanismo de acción de la fusaproliferina

Fusaproliferina es biológicamente activa sobre el modelo *Artemia salina* L., líneas celulares de insectos (SF-9), líneas celulares de linfocitos B humanos (IARC/LCL 171) (Logrieco *et al.*, 1996) así como teratogénica para embriones de pollo (Ritieni *et al.*, 1997, Munkvold *et al.*, 1998).

2.3 Incidencia de fumonisinas y fusaproliferina en alimentos

Teniendo en cuenta la actividad tóxica atribuida a las FBs y la presencia de hongos del género *Fusarium* en maíz y sus derivados, se han realizado diversos estudios para determinar el riesgo a la salud humana y animal, así como también para determinar el grado de exposición de la población a dichas toxinas. A partir del año de 1989 se realizaron en varios países evaluaciones para determinar la incidencia natural de las FBs en maíz y alimentos base de maíz destinados a consumo humano y animal.

En la mayoría de los estudios realizados sólo se ha analizado FB₁, ya sea de forma individual o de manera conjunta con FB₂. Poca significancia ha tenido la FB₃; en aquellas muestras donde esta toxina ha sido detectada, generalmente los niveles encontrados son menores a los de FB₂ y considerablemente inferiores a FB₁, la cual representa el 70 % de las FBs encontradas en el maíz (Shephard *et al.*, 1990).

Los niveles de fumonisinas encontrados en alimentos para animales, asociados con brotes de ELEM en caballos fueron en algunos casos muy altos con un máximo de 130 µg/g de FB₁, así como las concentraciones de fumonisinas encontradas en algunas muestras de alimento asociado con PPE no, teniendo un máximo de 330 µg/g de FB₁ (Tabla 2). La contaminación de maíz por fumonisinas en

distintos países refleja los niveles de infección fúngica de los cultivos durante su desarrollo, la cual depende de factores como región geográfica, clima y daño por insectos; se han encontrado niveles altos de fumonisinas en maíz cosechado en varios países como Estados Unidos, Italia y Argentina; aunque *F. verticillioides* está distribuido mundialmente en casi todas las áreas de producción de maíz, este hongo predomina en regiones cálidas y secas donde la podredumbre del grano de maíz es alta y es menor en climas fríos, tales como los del norte de Europa y Canadá (Miller, 1992).

Tabla 2. Niveles de fumonisinas ($\mu\text{g/g}$) en alimentos asociados con ELEM y PPE.

Muestra	Origen	Total (positivas)	FB ₁ ($\mu\text{g/g}$)		FB ₂ ($\mu\text{g/g}$)		Referencia
			Media ^a	Rango	Media ^a	Rango	
Leucoencefalomalacia Alimento a base de maíz	Brasil	14 (14)	10.3	0.2- 38.5	3.8	0.05- 12	Sydenham <i>et al.</i> , 1993a
Maíz	Italia	1 (1)	60		15		Doko y Visconti, 1994
Alimento balanceado	Sudáfrica	1 (1)	8.85		3		Shephard <i>et al.</i> , 1990
Maíz, alimentos a base de maíz	Estados Unidos	197 (173)	40.5	1-300	19.6 ^b	0.1-17	Wilson <i>et al.</i> , 1990, Park <i>et al.</i> , 1992, Plattner <i>et al.</i> , 1990, Thiel <i>et al.</i> , 1991b, Sydenham <i>et al.</i> , 1992a, Ross <i>et al.</i> , 1991b
Edema Pulmonar Alimento a base de maíz	Brasil	3 (3)	10.0	8.5- 11.1	2.8	1.9-3.2	Sydenham <i>et al.</i> , 1992 ^a
Maíz molido	Estados Unidos	114 (101)	90.3	3-300	NA		Harrison <i>et al.</i> , 1999, Colvin y Harrison 1992 Osweiler <i>et al.</i> , 1992, Ross <i>et al.</i> , 1991a

^a media de todas las muestras positivas; ^b analizadas 20 muestras; NA: no analizado (Ramírez, 2000)

Para exponer la información disponible a nivel mundial sobre la contaminación natural con fumonisinas en alimentos a base de maíz para animales, los datos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Niveles de fumonisinas en alimentos para animales.

Muestra	Origen	Total (positivas)	FB ₁ (µg/g)		FB ₂ (µg/g)		Referencia
			Media ^a	Rango	Media ^a	Rango	
Africa							
Maíz	Burundi	6 (6)		12.2-72.5	NA		Munimbazi y Bulleman, 1996
Salvado de maíz, harina de germen de maíz, alimento balanceado con maíz, maíz molido. Maíz almacenado	Sudáfrica	429 (422)	1.61	0.05-44.7	0.62	0-26.9	Vijoen <i>et al.</i> , 1993, Rava, 1996
	Zambia	16		0.03-1.68	NA		Sundheim <i>et al.</i> , 1995
Asia							
Granos de maíz	Corea	83 (46)	11.90	<0.03-25.33	4.30	<0.05-7.68	Ung-Soo <i>et al.</i> , 1994, Sohn <i>et al.</i> , 1999
Alimento balanceado para pollos, granos de maíz, maíz mohoso	India	168 (50)	0.62	0.01-64.7	NA		Shetty y Bhat, 1997
Alimento a base de glúten.	Japón	6 (6)	1.1	0.3-2.4	3.7	<0.1-8.5	Ueno <i>et al.</i> , 1993
Granos de maíz	Tailandia	35 (17)	0.73	<0.05-1.59	0.17	0.05-0.35	Wang <i>et al.</i> , 1993, Yoshisawa <i>et al.</i> , 1996
Maíz	Filipinas	98 (54)		0.05-18.8		0.05-1.4	Yoshisawa y Yamashita, 1995
Granos de maíz, maíz molido	Indonesia Vietnam	32 (23)	0.94	0.26-3.44	0.28	0.15-0.56	Wang <i>et al.</i> , 1995a
Europa							
Granos de maíz, sémola de maíz	Italia	124 (124)		<0.1-3.0			Pietri <i>et al.</i> , 1995
Glúten de maíz importado, alimento para mascotas, maíz	Reino Unido	1116 (94)	1.04	0.02-27	0.05 ^b	<0.05-0.07	Scudamore y Chang 1993, Scudamore <i>et al.</i> , 1997 y 1998
Alimento para aves	Suiza	22 (6)	0.24	0-0.48	0.09	0-0.12	Pittet <i>et al.</i> , 1992
América del Norte							
Alimento para cerdos	Estados Unidos	9 (8)		FB ₁ + FB ₂ : media 15; rango 0-33 µg/g			Bane <i>et al.</i> , 1992
Maíz molido	Estados Unidos	85 (85)		Media: 12.1; rango 2.6-32 µg/g			Price <i>et al.</i> , 1993
Maíz molido	Estados Unidos	319(286)	11.7	0.1-239	5.11 ^c	0.10-42.8	Stack y Eppley, 1992, Hopman y Murphy, 1993, Ross <i>et al.</i> , 1991 ^a

^a media de todas las muestras analizadas; ^b 49 muestras analizadas; ^c 10 muestras analizadas; NA: no analizado (Ramírez, 2000)

En el estado de Nuevo León, México, se realizó un estudio donde se recolectaron muestras de maíz blanco destinado para consumo humano, los resultados demostraron la presencia de *F. verticillioides* en el 61% de las muestras de maíz analizado y el aislamiento de cepas con alta capacidad productora de fumonisinas (10 – 9 000 µg/g), por lo que se concluyó que puede existir alto potencial de contaminación en el maíz mexicano (Desjardins *et al.*, 1994).

Estudios realizados en el estado de Jalisco, México permitieron observar la presencia de *F. verticillioides* en el 80 % de las muestras de maíz analizadas, de las cepas aisladas 93% fueron productoras de fumonisinas en un rango de 750 – 2 280 µg/g (Reyes *et al.*, 2000).

Poco es lo que se sabe referente a la incidencia natural de FUS. Debido a la actividad tóxica que tiene FUS, se ha sugerido que la presencia de estas micotoxinas junto con FBs pueden representar un gran riesgo para la salud animal, ya que se ha propuesto la posibilidad de haber una acción sinérgica de micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium*, especialmente en el caso de la FB₁ (Munkvold *et al.*, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El maíz es uno de los principales cultivos en nuestro país y la base de la alimentación de la sociedad mexicana. La contaminación del maíz por hongos del género *Fusarium* sección *Liseola* resulta en grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario, ya que estas especies producen una serie de micotoxinas que afectan al ganado que consume este producto, debido a que el maíz es utilizado como ingrediente en la elaboración de alimentos balanceados destinados al consumo animal.

Los diversos estudios actualmente elaborados muestran que las micotoxinas producidas por los hongos del género *Fusarium* son causantes de muchas enfermedades en animales, como la leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino, efectos carcinogénicos y hepatotóxicos en ratas; y se han asociado también como promotoras de cáncer en humanos.

En México, se ha investigado poco referente a la proliferación de las especies fúngicas que comprende el género *Fusarium* sección *Liseola*, y a la evaluación de las características micotoxicológicas de las cepas de dichos hongos aisladas del maíz que se cultiva actualmente, particularmente sobre la producción de fusaproliferina, micotoxinas que pueden presentarse de manera conjunta con las fumonisinas y tener efecto sinérgico incrementando los efectos tóxicos en animales.

JUSTIFICACIÓN

El presente estudio tiene el propósito de identificar las especies fúngicas productoras de las micotoxinas FB y FUS, ya que representa una herramienta importante para tomar medidas de control y prevención de la contaminación en precosecha, cosecha y post cosecha.

La valoración de la capacidad micotoxicogénica de las cepas de *Fusarium* de la sección *Liseola* puede ser un indicativo del impacto de la contaminación natural del maíz con micotoxinas, haciendo especial énfasis en las fumonisinas y fusaproliferina, causantes de diversos padecimientos en animales y en el humano.

HIPÓTESIS

Las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* son contaminantes frecuentes del maíz, con una elevada capacidad productora de fumonisinas y fusaproliferina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la incidencia de especies de *Fusarium* sección *Liseola* y la capacidad micotoxicogénica de las cepas aisladas de dos variedades de maíz cosechadas en una localidad del estado de Jalisco.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Evaluar el porcentaje de infección de especies del género *Fusarium* aisladas de los híbridos de maíz Alsa 036W (maíz blanco) y Lince (maíz amarillo), cosechadas de las parcelas experimentales del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
2. Identificar las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* aisladas de las variedades Alsa 036W y Lince.
3. Determinar los niveles de producción de fumonisinas y fusaproliferina de las cepas de *Fusarium* aisladas del maíz.
4. Analizar las condiciones climáticas que prevalecieron durante el cultivo primavera-verano 2003.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente estudio se desarrollará en el Laboratorio de Residuos Tóxicos II del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; con la colaboración del Laboratorio de semillas, del Departamento de Producción Agrícola.

1. Muestreo.

Las muestras se obtuvieron a partir de parcelas experimentales del CUCBA (Departamento de Producción Agrícola) ubicadas en el Km 15 de la carretera a Nogales, recolectadas a partir de la cosecha agrícola 2003. Cada parcela constó de aproximadamente 10 surcos de 100 m (5 plantas por metro) con una separación entre surcos de 70 cm. Las muestras se obtuvieron con un diseño completamente al azar con una intensidad de muestreo del 10%. Las mazorcas de cada variedad de maíz se desgranaron y se formó una muestra compuesta, a partir de la cual se obtuvieron 3 submuestras de cada variedad.

2. Aislamiento especies de *Fusarium*

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. Se lavaron los granos tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en el medio de Nash – Snyder, selectivo para el aislamiento de especies de *Fusarium* (Nelson *et al.*, 1983). Las muestras se incubaron a 24 °C durante 7 - 10 días bajo ciclos de 12 horas de luz blanca y 12 horas luz negra, respectivamente.

Se observaron macroscópicamente las colonias desarrolladas y se determinó el porcentaje de infección con especies de *Fusarium*. Las colonias que pertenecieron al género *Fusarium* fueron transferidas al medio agar hojas de clavel (AHC) e

incubadas durante 7 días a 24 °C bajo ciclos de 12 horas luz blanca y 12 horas luz negra; respectivamente, para su posterior identificación.

3. Identificación de especies de *Fusarium*

A partir del medio agar hojas de clavel (AHC) se realizaron aislamientos monospóricos, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de material fúngico y se realizó una suspensión en 10 ml de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión, se transfirió a una placa de Petri con agar agua, se dispersó 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 al microscopio (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 12 h luz blanca y 12 h luz negra a 24 °C. La identificación de las cepas se realizó en base a la metodología propuesta por Nelson *et al.* (1983).

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. 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 especies de *Fusarium* una vez aisladas e identificadas fueron mantenidas en medio Agar Jugo V8 (Nelson *et al.*, 1983), con el fin de evitar posteriores mutaciones de las cepas.

4. Caracterización micotoxigénica

4.1 Producción de fumonisinas

Para evaluar la capacidad de las cepas para producir fumonisinas (FBs) se colocaron 50 g de maíz amarillo partido en frascos Erlenmeyer de 250 ml, se hidrataron con 17.5 ml de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos (dos días consecutivos). Posteriormente se inoculó el maíz con 1 ml de una suspensión de conidios en agua destilada estéril de las cepas en estudio, desarrollada previamente durante 7 días en el medio de cultivo AHC. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 28 días en oscuridad. Luego del período de incubación las muestras se secaron a 60 °C, se molieron y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis.

A partir de 15 g de cada muestra previamente molida, se extrajeron las toxinas con 50 ml de acetonitrilo – agua (1:1). Se agitó el extracto 30 minutos en un agitador rotatorio y posteriormente se filtró a través de papel de filtro Whatman N °4. Los extractos se almacenaron a 4 °C hasta el momento del análisis por HPLC.

4.1.1. Detección y cuantificación de fumonisinas

Para la detección y cuantificación de las FBs se siguió la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) modificada por Doko *et al.* (1995). Una alícuota de 50 µl del extracto se derivatizó adicionándole 200 µl de una solución de O-phthaldialdehído (OPA). La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 ml de metanol, 5 ml de tetraborato desodio a 0.1M y 50 µl de 2-mercaptoetanol. Las fumonisinas derivatizadas (20 µl de la solución) fueron analizadas empleando un sistema de detección de fluorescencia/HPLC fase reversa. El sistema HPLC consiste de una bomba Hewlett Packard 1110, conectado a un detector de fluorescencia Hewlett Packard 1100 y a una computadora Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de

fase reversa de C18 (150 x 4.6 mm, 5µm de tamaño de partícula; Supelcosil LC-ABZ, Supelco) conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20x4.6 mm, 5µm de tamaño de partícula, Supelco). Como fase móvil se utilizó metanol - fosfato de sodio dihidrogenado 0.1M (75:25), el pH de la solución se ajustó a 3.35 con ácido ortofosfórico. El flujo de la fase móvil fue de 1.5 ml/minuto. El rango de excitación y emisión usados fueron 335 y 440 nm, respectivamente.

Las soluciones testigos se prepararon disolviendo FB₁ y FB₂ puras obtenidas de SIGMA, en acetonitrilo - agua (1:1, v/v) en concentraciones de 5 y 10 µg/ml, respectivamente. La cuantificación de las fumonisinas se basó en las alturas de los picos comparados con la altura de los picos de una solución testigo de referencia de FB₁ y FB₂.

4.2. Producción de fusaproliferina

Para evaluar la capacidad de las cepas de producir FUS se procedió de la misma forma que para la producción de fumonisinas, sólo que se empleó 22.5 ml de agua destilada para hidratar los granos de maíz.

4.2.1. Detección y cuantificación de fusaproliferina

Para la extracción de FUS se siguió la metodología propuesta por Munkvold *et al.* (1998). A partir de 10 g de cada muestra previamente molida, las toxinas se extrajeron con 15 ml de metanol. Se agitó el extracto 30 minutos en agitador rotatorio, luego se filtró a través de papel de filtro Whatman N °4. El metanol se evaporó a sequedad a 40 °C. Los extractos se almacenaron a 4 °C hasta el momento del análisis por HPLC.

Para la detección y cuantificación de FUS se siguió la metodología propuesta por Munkvold *et al.* (1998). Los residuos se redisolieron en 1.5 ml de metanol y una alícuota de 500 µl del extracto metanólico se filtró a través de filtros de 0.22 µm. Las

micotoxinas fueron analizadas usando un sistema de detección de UV/HPLC fase reversa. El sistema HPLC consistió de una bomba Shimadzu SCL – 10A VP conectado a un detector de UV de la misma marca y a una computadora HP Compaq 1220 MT. Las separaciones cromatográficas de las micotoxinas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa de C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula; Supelcosil LC - ABZ, Supelco) conectada a una precolumna Supelguard LC-ABZ (20x4.6 mm, 5 μ m de tamaño de partícula, Supelco).

La fase móvil fue acetonitrilo:agua (85:15). Las soluciones testigos se preparon disolviendo FUS pura en acetonitrilo:agua (1:1, v/v) en concentraciones de 120, 60 y 30 μ g/ml.

La cuantificación de FUS se realizó por el integrador de la estación de trabajo HP, con un software programado para calcular la concentración de la toxina a partir de la altura del pico en comparación con una curva de calibración establecida para el método utilizado, con soluciones testigos de concentración conocida.

5. Análisis estadístico

Los resultados fueron contrastados mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para comparación de medias, a un nivel de significancia del 95%, se utilizó el paquete estadístico de Sigma Stat versión 2.03 para Windows 95 y NT (2005).

6. 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 de mayo a diciembre de 2003.

RESULTADOS

1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* sección *Liseola* aisladas de dos variedades de maíz cosechadas en una localidad del estado de Jalisco

La evaluación del grado de contaminación con especies de *Fusarium*, de las muestras de las dos híbridos de maíz cosechados en las parcelas experimentales del CUCBA, ubicadas en el predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan, mostró un porcentaje de infección promedio en el medio Nash-Snyder del 68% para la variedad Alsa 036W (rango 40 - 96%) y de 61% para la variedad Lince (rango 22 - 100%); considerando granos dañados y asintomáticos (Tabla 4, Figura 3).

La observación microscópica (10x) de las colonias demostró que un 91% (58 cepas) de las mismas presentaban microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas, que correspondieron a *F. verticillioides* (figura 4) y *F. proliferatum* (figura 5), la primera especie mostró microconidios en monofialides, en tanto la segunda presentó monofialides y polifialides, característica distintiva entre ambas especies; mientras que el 8% de los cultivos presentaron sólo falsas cabezas de microconidios y presencia de monofialides y polifialides, cepas correspondientes a *F. subglutinans* (figura 6). Las características microscópicas (40X) se observaron en preparados en fresco y revelaron la presencia de un micelio hialino y septado, microconidios unicelulares de forma ovoide con base truncada, macroconidios cóncavos a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas y de paredes finas, y múltiples conidióforos ramificados y no ramificados.

La tabla 5 resume las características morfológicas y culturales de las cepas de *Fusarium* aisladas de los 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.

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

Variedad	Infección con		Distribución de las especies ^a		
	<i>Fusarium spp</i> % ^a (número) ^b	<i>F. verticilliooides</i> %(número) ^b	<i>F. subglutinans</i> % (número) ^b	<i>F. proliferatum</i> % (número) ^b	Otros ^b %(número) b
Alsa 036W	68 (35)	72 (25)	8 (3)	17 (6)	3 (1) ^c
Lince	61 (29)	93 (27)	7 (2)	0	0
Total de cepas	(64)	81 (52)	8 (5)	9 (6)	2 (1) ^c

^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* (*F. graminearum*).

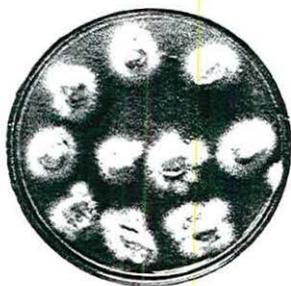


Figura 3. Contaminación de granos de maíz con especies de *Fusarium* en el medio Nash – Snyder.

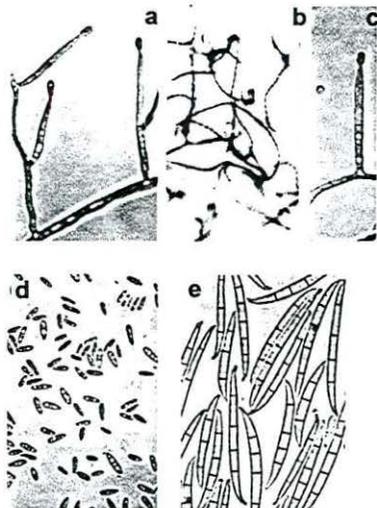


Figura 4. *Fusarium verticillioides*. (a-e) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a y c, Microconidióforos: monofiálides; b, cadenas de microconidios; d, microconidios; e, macroconidios; (f) Características macroscópicas en APG.

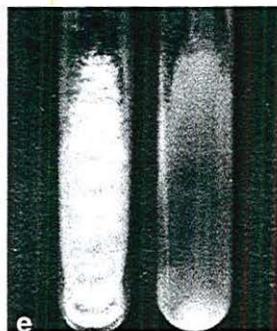
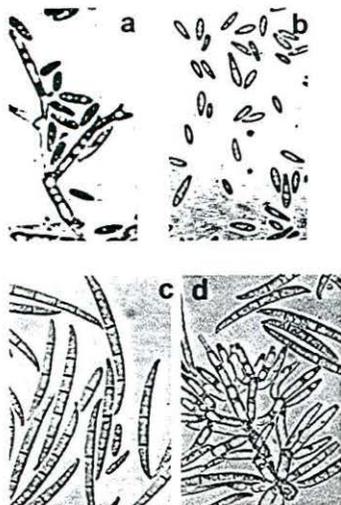


Figura 5. *Fusarium proliferatum*. (a-d) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Microconidióforos: polifiálides; b, microconidios; c, macroconidios; d, microconidióforos: monofiálides. (e) Características macroscópicas en APG.

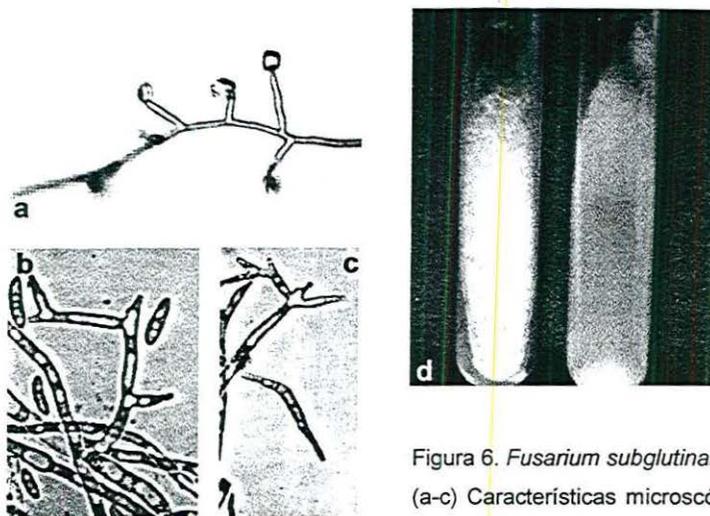


Figura 6. *Fusarium subglutinans*.

(a-c) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Falsas cabezas de microconidios; b y c, Microconidióforos: polifálides.

(d) Características macroscópicas en APG.

F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg, fue la especie predominante en ambos híbridos evaluados con un porcentaje promedio del 81%, seguida por *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (9%) y *F. subglutinans* (Wollenweber and Reinking) Nelson, Tousson and Marasas (8%).

Cabe señalar que también se aislaron otras especies de *Fusarium* no pertenecientes a la sección *Liseola* (2%), que por sus características morfológicas se las clasificó como *F. graminearum*.

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

2. Evaluación de la producción de fumonisinas y fusaproliferina por las cepas de *Fusarium* sección *Liseola* aisladas

Las cepas aisladas de hongos del género *Fusarium* sección *Liseola* de ambas variedades de maíz fueron evaluadas para determinar su capacidad de producir fumonisinas y fusaproliferina (Figura 7).

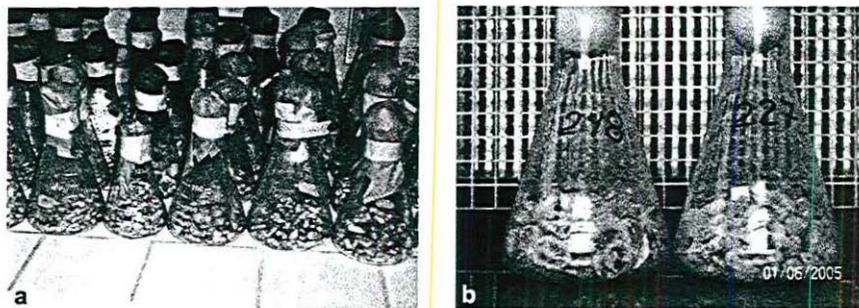


Figura 7. Granos de maíz autoclavados para la producción de fumonisinas y fusaproliferina. a) sin inocular b) inoculado con cepas de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* ó *F. subglutinans* después de 28 días de incubación.

Las 52 cepas de *F. verticillioides* previamente caracterizadas de acuerdo a sus características morfológicas, fueron evaluadas para determinarles su capacidad de producir fumonisinas (Tablas 6 y 7) y fueron seleccionadas al azar 10 cepas (cinco de cada híbrido) para evaluar su capacidad productora de fusaproliferina.

Las 25 cepas de *F. verticillioides* aisladas de la variedad *Alsa 036W* fueron capaces de producir FBs en niveles que variaron entre 107.5 y 4 955.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media= 1 852.8 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Fumonisina B₁ representó el 78% de las FBs totales. Los niveles de FB₁, variaron entre 59.3 y 3 997 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 1 442.5 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que los de FB₂ variaron entre 26.5 y 1 090.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 446 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Tabla 6).

Las 27 cepas de *F. verticillioides* aisladas del híbrido Lince fueron capaces de producir FBs en niveles que variaron entre 16.8 a 5 305 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media= 936.9 $\mu\text{g g}^{-1}$). Fumonisina B₁ representó el 80% de las FBs totales. Los niveles de FB₁, variaron entre 13.8 a 3 771 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 745.2 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que los de FB₂ variaron entre 3 a 1 534 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 258.8 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Tabla 7).

Las cepas de *F. verticillioides* que produjeron los más altos niveles de FBs fueron las cepas 271 (4 955.5 $\mu\text{g g}^{-1}$) y 379 (5 305 $\mu\text{g g}^{-1}$) aisladas de los híbridos Alsa 036W y Lince respectivamente.

Cuatro cepas de *F. verticillioides* seleccionadas al azar en ambos híbridos produjeron fusaproliferina, los niveles detectados variaron de 25.5 a 44.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media= 34.3 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Pudo apreciarse diferencia estadística ($P < 0.001$) entre los niveles de producción de fumonisinas entre los dos híbridos, además se observó diferencia significativa entre la producción de fumonisinas entre las especies de *Fusarium* evaluadas.

Las cepas de *F. verticillioides* productoras de FBs ensayadas se distribuyeron en 3 grupos: productoras de niveles bajos (<500 $\mu\text{g g}^{-1}$) donde se ubicaron el 27% de las cepas; productoras de niveles intermedios (500-2 000 $\mu\text{g g}^{-1}$) y productoras de niveles altos (>2 000 $\mu\text{g g}^{-1}$) donde se ubicaron el 48% y el 25% de las cepas, respectivamente.

Respecto a la producción de fumonisinas por *F. proliferatum*, se observó un rango de producción de 786.5 a 6 048 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media= 2 978.4 $\mu\text{g g}^{-1}$), correspondiendo todas las cepas al híbrido Alsa 036W (Tabla 8).

Dos cepas de *F. subglutinans* aisladas del híbrido Lince produjeron fumonisinas, los niveles promedio fueron de $244.3 \mu\text{g g}^{-1}$; mientras que la producción promedio de las cepas aisladas del híbrido Alsa 036W fue de $302.6 \mu\text{g g}^{-1}$.

Todas las cepas de *F. proliferatum* y *F. subglutinans* evaluadas produjeron fusaproliferina, los niveles variaron de 32 a $52.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (media= $42.7 \mu\text{g g}^{-1}$). Con respecto a la producción de FUS por cepas de *F. verticillioides*, de las 11 cepas analizadas, sólo 4 fueron productoras de dicha micotoxina, los niveles producidos variaron entre 25.5 y $44.7 \mu\text{g g}^{-1}$ (media= $34.3 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tabla 6. Producción de fumonisinas por las cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas de la variedad de maíz Alsa 036W.

Variedad	Cepa	Especie de <i>Fusarium</i>	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
			FB ₁	FB ₂	FB Totales
Alsa 036W	250	<i>F. verticillioides</i>	966.5	290.5	1257
	251	<i>F. verticillioides</i>	538	26.5	564.5
	252	<i>F. verticillioides</i>	675	280	955
	253	<i>F. verticillioides</i>	576	ND	576
	254	<i>F. verticillioides</i>	480	110	590
	256	<i>F. verticillioides</i>	349	49	398
	257	<i>F. verticillioides</i>	1327	460	1787
	258	<i>F. verticillioides</i>	1476	49.5	1525.5
	260	<i>F. verticillioides</i>	786.9	116.7	903.6
	261	<i>F. verticillioides</i>	2878	1145	4023
	262	<i>F. verticillioides</i>	955	112	1067
	263	<i>F. verticillioides</i>	2275.5	815.5	3091
	267	<i>F. verticillioides</i>	3679	1089	4768
	271	<i>F. verticillioides</i>	3997	958.5	4955.5
	278	<i>F. verticillioides</i>	2661.5	1090.5	3752
	279	<i>F. verticillioides</i>	436	41.5	477.5
	280	<i>F. verticillioides</i>	561.8	ND	561.8
	281	<i>F. verticillioides</i>	2645.5	987.5	3633
	282	<i>F. verticillioides</i>	2175	1062	3237
	283	<i>F. verticillioides</i>	760.5	156	916.5
	284	<i>F. verticillioides</i>	1214	116	1330
	285	<i>F. verticillioides</i>	542.3	135.3	677.6
	286	<i>F. verticillioides</i>	2431.3	692.3	3123.6
	287	<i>F. verticillioides</i>	59.3	48.2	107.5
	288	<i>F. verticillioides</i>	1616.2	426.7	2042.9

ND: no detectado. FB₁: Fumonisin B₁, FB₂: Fumonisin B₂. Límite de detección: $< 1 \mu\text{g g}^{-1}$

Tabla 7. Producción de fumonisinas por las cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas de la variedad de maíz Lince.

Variedad	Cepa	Especie de <i>Fusarium</i>	Concentración $\mu\text{g g}^{-1}$		
			FB ₁	FB ₂	FB Totales
Lince	370	<i>F. verticillioides</i>	957	319	1276
	371	<i>F. verticillioides</i>	1672.5	415.5	2088
	372	<i>F. verticillioides</i>	79.2	ND	79.2
	373	<i>F. verticillioides</i>	1256	176.7	1432.7
	377	<i>F. verticillioides</i>	180.5	ND	180.5
	378	<i>F. verticillioides</i>	397	ND	397
	379	<i>F. verticillioides</i>	3771	1534	5305
	390	<i>F. verticillioides</i>	2583.5	916.5	3500
	391	<i>F. verticillioides</i>	328	34.4	362.4
	392	<i>F. verticillioides</i>	325.3	88.5	413.8
	393	<i>F. verticillioides</i>	729.7	ND	729.7
	394	<i>F. verticillioides</i>	658.5	196	854.5
	395	<i>F. verticillioides</i>	428	96.5	524.5
	396	<i>F. verticillioides</i>	13.8	3	16.8
	397	<i>F. verticillioides</i>	219.2	42.2	261.4
	398	<i>F. verticillioides</i>	494.3	ND	494.3
	399	<i>F. verticillioides</i>	276.4	ND	276.4
	400	<i>F. verticillioides</i>	276.7	22.1	298.8
	401	<i>F. verticillioides</i>	489.8	118.7	608.5
	402	<i>F. verticillioides</i>	322	70	392
403	<i>F. verticillioides</i>	620	215	835	
404	<i>F. verticillioides</i>	620.3	ND	620.3	
405	<i>F. verticillioides</i>	509.8	188.9	698.7	
406	<i>F. verticillioides</i>	1261.4	288.8	1550.2	
407	<i>F. verticillioides</i>	618.4	164.3	782.7	
408	<i>F. verticillioides</i>	844	240.5	1084.5	
409	<i>F. verticillioides</i>	187.7	45.3	233	

ND: no detectado. FB₁: Fumonisina B₁, FB₂: Fumonisina B₂. Límite de detección: < 1 $\mu\text{g g}^{-1}$

Tabla 8. Producción de fumonisinas y fusaproliferina por las cepas de *Fusarium proliferatum* y *F. subglutinans* aisladas de las variedades de maíz Alsa 036W y Lince.

Variedad	Cepa	Especie de <i>Fusarium</i>	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
			FUS	FB ₁	FB ₂	FB Totales
Alsa 036W	255	<i>F. subglutinans</i>	45.6	ND	ND	ND
	259	<i>F. proliferatum</i>	32	2959	1756	4715
	264	<i>F. proliferatum</i>	40.2	2537.3	1463.3	4000.6
	265	<i>F. proliferatum</i>	45.5	691	95.5	786.5
	266	<i>F. subglutinans</i>	52.5	161.1	4.3	165.4
	272	<i>F. proliferatum</i>	47.4	4175.2	1872.8	6048
	275	<i>F. proliferatum</i>	39.2	2634	935.5	3569.5
	276	<i>F. subglutinans</i>	37.5	439.7	ND	439.7
Lince	277	<i>F. proliferatum</i>	49.3	1698.9	651.6	2350.5
	374	<i>F. subglutinans</i>	39	195	ND	195
	375	<i>F. subglutinans</i>	41.5	291.2	2.3	293.5

ND: no detectado. FB₁: Fumonisinina B₁, FB₂: Fumonisinina B₂. FUS: Fusaproliferina. Límite de detección: $< 1 \mu\text{g g}^{-1}$.

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 más 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

México es una región en la cual no se ha investigado ampliamente la incidencia de las especies de *Fusarium* en maíz a pesar de la gran importancia de dicho cereal en este país. Los resultados del presente estudio muestran que los diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco presentaron un alto porcentaje de infección con especies de *Fusarium*. *F. verticillioides* fue la especie predominante en ambas muestras evaluadas, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. La incidencia y prevalencia de las especies de *Fusarium* aisladas de maíz en diferentes regiones geográficas y años de siembra depende principalmente de las condiciones ambientales (Bottalico, 1998). La alta incidencia de *F. verticillioides*, coincide con los escasos estudios realizados en México. Desjardins *et al.* (1994) analizaron cuatro muestras de maíz a cosecha del estado de Nuevo León (noreste de México) y aislaron a *F. verticillioides* como especie predominante, no encontrando ninguna otra especie perteneciente al género. Reyes (2001) analizó muestras de 3 híbridos de maíz cosechadas en el estado de Jalisco (Huejotitán y Ameca) y también encontró que la incidencia de *F. verticillioides* (porcentaje de aislamiento promedio: 90%) fue elevada en ambas localidades independientemente de la variedad de maíz y del daño visual de las mazorcas.

Por otro lado, Cortez-Rocha *et al.* (2003) reportaron que *Fusarium* es el género más frecuentemente aislado de maíz (67 – 70%) en el estado de Sonora (norte de México), siendo *F. verticillioides* la especie de mayor prevalencia. Más recientemente, Sánchez-Rangel *et al.* (2005) demostraron también que *F. verticillioides* fue la especie más frecuente en muestras de maíz del Noroeste y Centro de México (80%).

Existen diversos estudios realizados en el mundo donde se demuestra que la especie predominante en maíz es *F. verticillioides*. Chulze *et al.* (1996) analizaron muestras de maíz cosechado en Córdoba, Argentina (cosecha 1993/1994) y se aisló a *F. verticillioides* como especie prevalente (porcentaje de aislamiento promedio: 70

%). Sydenham *et al.* (1993) analizaron 17 muestras de maíz de dos diferentes distritos de Buenos Aires (Argentina) e identificaron a *F. verticillioides* como principal contaminante (14 muestras) y en segundo lugar a *F. proliferatum* (3 muestras). González *et al.* (1995) a partir de maíz a cosecha aislaron a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* con porcentajes medios de 80% y 20%, respectivamente.

En muestras de maíz recién cosechadas en el norte de Argentina (provincia de Jujuy) se aisló con mayor frecuencia *F. subglutinans* (30 – 95%), seguida por *F. verticillioides* (12 – 50%) y *F. proliferatum* (10 – 12%) (Torres *et al.*, 2001). Reynoso *et al.* (2004) analizaron 11 muestras de maíz provenientes de la zona núcleo maicera de Argentina y aislaron a *F. verticillioides* como especie predominante, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*.

Es importante señalar que en distintas regiones geográficas, con condiciones climáticas y tipos de cultivares diferentes, la distribución de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* puede variar. Se ha demostrado además 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, India, Jamaica, Japón, Nueva Zelanda, Australia, Canadá, Italia, Brasil, Estados Unidos, Argentina, entre otros. En cambio, sólo se ha detectado en baja frecuencia en regiones con temperaturas frías, excepcionalmente se ha aislado en Rusia e Islandia (Bacon y Nelson, 1994).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, son indicativos de la posible presencia de micotoxinas; principalmente fumonisinas, ya que la especie predominante en los dos híbridos de maíz analizados fue *F. verticillioides*. Rosiles *et al.* (1998) reportaron un brote de leucoencefalomalacia equina en el estado de Oaxaca, detectando niveles de FB₁ que varían de 0.6 a 28.5 µg g⁻¹ en 12 de las 14 muestras analizadas.

El nivel de la producción de FBs por cepas de *F. verticillioides*, es variable y depende de la constitución genética de las cepas, del ambiente y del sustrato sobre el cual se desarrolla el hongo (Bacon y Nelson, 1994). Se consideran cepas altamente productoras de FBs a aquellas que producen $>2000 \mu\text{g g}^{-1}$, productoras intermedias a las que producen $500\text{-}2000 \mu\text{g g}^{-1}$, y como bajas productoras de FBs $<500 \mu\text{g g}^{-1}$ (Nelson *et al.*, 1991). Debido al efecto del sustrato, es importante elegir el adecuado al evaluar la capacidad toxicogénica de una determinada especie fúngica. Holcomb *et al.* (1993) evaluaron la producción de FBs por *F. verticillioides* NRRL-13616 sobre maíz, arroz entero, cacahuate y soya y determinaron que la producción de FBs por dicha cepa era máxima sobre maíz; por lo tanto, es importante determinar el potencial toxicogénico de las cepas sobre el sustrato a partir del cual se aislaron las mismas.

Leslie *et al.* (1992a) han determinado que las diferentes cepas de *Fusarium* (sección *Liseola*) difieren en su capacidad de producir FBs. En el presente estudio, todas las cepas de *F. verticillioides*, fueron capaces de producir FBs independientemente del híbrido a partir del cual se aislaron las mismas, aunque se encontraron diferencias en cuanto a los niveles producidos. En general, las cepas aisladas del híbrido Alsa 036W produjeron los más altos niveles de FBs en comparación al híbrido Lince. Aunque son numerosos los factores que podrían influir en el comportamiento diferente de las cepas *in vitro* para producir mayores niveles de toxinas, se puede estimar que parámetros tales como la región geográfica, el tipo de suelo, el inóculo, las prácticas culturales, la humedad ambiente, juegan un papel importante sobre las características fisiológicas de las cepas. No existen estudios fehacientes que expliquen las diferencias en la capacidad de producción de FBs, solamente se han registrado datos de incidencia natural en diferentes regiones geográficas.

Los resultados del presente trabajo son comparables a los reportados por Desjardins *et al.* (1994) quienes evaluaron la capacidad de producir FBs por cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz cosechado en el noreste de México, donde el

97% de las cepas produjeron FBs en niveles que variaron entre 10 y 9 000 $\mu\text{g g}^{-1}$. Reyes (2001) encontró que cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz en el estado de Jalisco (Huejotitán y Ameca) produjeron FBs en niveles que variaron entre 700 y 2,280 $\mu\text{g g}^{-1}$. En otro estudio realizado por Sánchez-Rangel *et al.* (2005) el 44% de las cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz cultivado en el noroeste y centro del país produjeron FB₁ en niveles que variaron entre 0.1 y 4 047 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Por otro lado, Chulze *et al.* (1996) evaluaron la capacidad toxicogénica de especies de *F. verticillioides* (4 cepas) y *F. proliferatum* (7 cepas), aisladas de maíz de Argentina y encontraron que todas fueron productoras de altos niveles de FBs (1000- 4 000 $\mu\text{g g}^{-1}$). Synderman *et al.* (1993) encontraron cepas de *F. verticillioides* aisladas de Argentina que producían niveles de FB₁ que oscilaban entre 50- 8 160 $\mu\text{g g}^{-1}$), mientras que, Visconti y Doko (1994) analizaron la capacidad de producir FBs en cepas pertenecientes a la población de apareamiento A aisladas de maíz en Europa, los niveles de dicha micotoxina oscilaron entre 5 y 4 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₁ (media= 1 331 $\mu\text{g g}^{-1}$) y entre 1 y 885 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media= 296 $\mu\text{g g}^{-1}$) para FB₂. Srovarova *et al.* (2002) encontraron cepas de *F. verticillioides* aisladas de mazorcas de maíz de Eslovaquia producían niveles de FBs que variaban de 0.1 a 5 645 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Además, la producción de FBs por cepas de *F. verticillioides* en este estudio fue superior a la reportada por Ross *et al.* (1990) en Estados Unidos, los niveles oscilaron entre 960 y 2 350 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₁ y de 120 y 230 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₂.

Por otro lado, los resultados del presente trabajo son inferiores a los encontrados por Reynoso *et al.* (2004) quienes evaluaron la capacidad de producir FBs de cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz en Argentina. En dicho estudio entre las 203 cepas evaluadas, 193 (95%) fueron capaces de producir la micotoxina en niveles que variaban entre 42 y 20 805 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Una variabilidad similar en la producción de FB₁ ha sido observada por otros autores (Castellá *et al.*, 1999; Fadl Allah, 1998; Leslie *et al.*, 1992a, b; Nelson *et al.*,

1991; Ross *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991) entre cepas aisladas de varios sustratos de diferentes regiones (Asia, África, Australia, Egipto, España y Estados Unidos).

Los resultados del presente trabajo aportan los primeros datos sobre la producción de FBs de cepas de *F. proliferatum* y *F. subglutinans* aisladas de maíz en México. Los niveles de fumonisinas producidos por las cepas de *F. proliferatum* evaluadas en el presente estudio fueron superiores a los producidos por cepas aisladas de maíz en Sudáfrica por Thiel *et al.* (1991a), donde los niveles oscilaban entre 20 y 870 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₁ (media = 460 $\mu\text{g g}^{-1}$) y entre 65 y 450 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 219 $\mu\text{g g}^{-1}$) para FB₂; en Italia por Logrieco *et al.* (1995) quienes detectaron niveles entre 7 y 2 250 $\mu\text{g g}^{-1}$; en Argentina por Chulze *et al.* (1998a) cuyos niveles variaban entre 20 y 1 990 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₁ y entre 10 y 2 060 $\mu\text{g g}^{-1}$ para FB₂, y en España por Castellá *et al.* (1999a).

Los bajos niveles de FBs producidos por cultivos de *F. subglutinans* concordaron con los datos obtenidos por cepas aisladas en los Estados Unidos, Sudáfrica, Europa, Nepal, Argentina y España (Thiel *et al.*, 1991a; Nelson *et al.*, 1992; Leslie *et al.*, 1992a; Visconti y Doko, 1994; Moretti *et al.*, 1995a; Chulze *et al.*, 1998; Castellá *et al.*, 1999a). Sin embargo, la presencia de *F. subglutinans* en las muestras de maíz no debería ser desestimada, considerando la potencialidad de dicha especie de producir otras toxinas como moniliformina (MON), beauvericina (BEA) y fusaproliferina (FUS) (Logrieco *et al.* 1993b; 1998; Reynoso *et al.* 2004).

La información que actualmente se ha generado a nivel mundial sobre la producción de FUS por cepas de *Fusarium* (sección *Liseola*) es escasa. Los resultados obtenidos aportan los primeros datos sobre la capacidad de producción de FUS por cepas de *Fusarium* pertenecientes a la sección *Liseola*, aisladas de maíz en México.

Cepas de *Fusarium* altamente productoras de FUS dentro de la sección *Liseola* fueron observadas por Munkvold *et al.* (1999). *F. proliferatum* produjo 1 725 $\mu\text{g g}^{-1}$ de

la toxina, mientras que *F. subglutinans*, produjo 2 630 $\mu\text{g g}^{-1}$. En el presente estudio se evaluó la producción de FUS en 6 cepas de *F. proliferatum* y 5 cepas de *F. subglutinans*, los niveles de toxina producidos por ambas especies fueron $< 500 \mu\text{g g}^{-1}$.

Logrieco *et al.*, (1996) analizaron la producción de la toxina por 67 cepas de *F. subglutinans* aisladas de maíz de diferentes áreas geográficas. Todas las cepas excepto la cepa ITEM-1435 fueron capaces de producir FUS en niveles que variaban entre 30 y 1 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, independientemente de la región geográfica.

Moretti *et al.* (1995b) ensayaron la capacidad de producir FUS por especies de *F. subglutinans* y *F. proliferatum* aisladas de diferentes huéspedes y regiones geográficas y encontraron que de las 23 cepas aisladas de maíz de Polonia, 22 (85%) producían FUS en niveles que variaron entre 100 y 1 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 546 $\mu\text{g g}^{-1}$). Mientras que 16 de las 17 cepas de *F. subglutinans* aisladas de maíz de USA, Polonia y Austria producían la toxina en niveles que oscilaban entre 80 y 1 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ (media = 687 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Shepard *et al.* (1999) evaluaron 10 muestras de maíz claramente contaminado con *Fusarium* procedentes de una región de Sudáfrica (Transkei), de las cuales aislaron una cepa altamente productora de FUS (2 630 $\mu\text{g g}^{-1}$). Reynoso *et al.* (2004) obtuvieron cepas de *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, las cuales produjeron niveles que van de 13 a 668 $\mu\text{g g}^{-1}$ y de 14 a 1 600 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

Srovarova *et al.* (2002) analizaron muestras de maíz contaminado obtenidas de once de las regiones productoras de Eslovaquia, detectando la producción de FUS por *F. proliferatum* (220 – 370 $\mu\text{g g}^{-1}$) y por *F. subglutinans* (20 – 335 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Por otro lado, Srovarova *et al.* (2002) reportaron la producción de FUS por cepas de *F. verticillioides*, los niveles de producción de dicha micotoxina oscilaron entre 10 y 35 $\mu\text{g g}^{-1}$, dato que no se había reportado en estudios anteriores. En el

presente estudio se analizó la producción de FUS de 11 cepas de *F. verticillioides*, de las cuales sólo 4 fueron productoras de dicha micotoxina, en niveles comparables a los observados por Srovarova *et al.* (2002).

Los resultados del presente estudio indican que las cepas de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* aisladas del estado de Jalisco (México) son capaces de producir FUS en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, sería de interés determinar la incidencia natural de dicha micotoxina en maíz, considerando los efectos toxicogénicos de la misma y los efectos combinados con otras micotoxinas. 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

- Se encontró alta incidencia de especies de *Fusarium* en ambas variedades de maíz cosechadas en las parcelas experimentales del CUCBA durante el ciclo primavera – verano 2003.
- *Fusarium verticillioides* fue la especie aislada con mayor frecuencia en ambos híbridos de maíz estudiados, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*.
- Todas las cepas de *Fusarium verticillioides*, evaluadas fueron capaces de producir fumonisinas en niveles relativamente altos, mientras que el 36% de las cepas evaluadas produjeron además fusaproliferina.
- Las cepas de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium subglutinans* fueron capaces de producir fumonisinas y fusaproliferina. Los resultados obtenidos aportan los primeros datos sobre la capacidad de producción de FUS por dichas especies, aisladas de maíz en México.
- 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

- Abbas, H.K.; Shier, W.T. (1992). Evaluation of biosynthetic precursors for the production of radiolabeled fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* on rice medium. *106th Annu. Assoc. Off. Anal. Chem. Meet.*, Cincinnati, Ohio, p. 236 (Abstract).
- Alberts, J.F.; Gelderblom, W.C.A.; Thiel, P.G.; Marasas, W.F.O., van Scalkwyk, D.J.; Behrend, Y. (1990). Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1729 - 1733.
- Austwick, P.K.C. (1984), *Fusarium* infections in man and animals. En: The applied mycology of *Fusarium*. M. Moss and J. Smith (eds.). Cambridge University Press, England.
- Azcona - Olivera, J.I.; Abouzied, M.M.; Plattner, R.D.; Pestka, J.J. (1992). Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂ and B₃. *J. Agric. Food Chem.* 40: 531 - 534.
- Bane, D. P.; neuman, E. J.; Hall, W. F.; Harlin, K. S.; Slife, L. N. (1992). Relationship between fumonisin contamination of feed and mystery swine disease. *Mycopathologia* 117: 121-124.
- Bacon, C. W.; Nelson, P. E. (1994). Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.* 57: 514-521.
- Bennet, G. A.; Richard, J. L. (1994). Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisin. *J. AOAC Intl.* 77: 501 - 506.
- Betina, V. (1989). Mycotoxins as Secondary Metabolites. En: *Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam. pp 27 - 41.
- Bezuidenhout, G.C.; Gerderblom, W.C.A.; Gorst-Allman, C.P.; Horak, R.M.; Marasas, W.F.O.; Spiteller, G.; Vleggaar, R. (1988). Common structure

- elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc.* 11:743 - 745.
- Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80: 85 - 103.
 - Bottalico, A.; Lerario, P. and Visconti, A. (1983). Production of mycotoxins (Zearalenone, Trichotecenes and Moniliformin) by *Fusarium* species in Italy. *Microbiology, Aliments, Nutrition.* 1: 133 - 142.
 - Bottalico, A.; Logrieco, A.; Ritieni, A.; Moretti, A.; Randazzo, G.; Corda, P. (1995). Beauvericin and fumonisin B₁ in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Addit. Contam.* 12: 599 - 607.
 - Bottalico, A.; Logrieco, A.; Rivieccio, S. and Ricci, V. (1987). Seedborne *Fusarium moniliforme* Sheldon in relation to corn stalk rot incidence in Southern Italy. *Mycotoxin Research. European Seminar "Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity"*. Warsaw, 15 - 16.
 - Castellá G.; Bragulat, M.R., Cabañez, F.J. (1999a). Fumonisin production by *Fusarium* species isolated from cereals and feeds in Spain. *J. Food Prof.* 62: 811 - 813.
 - Castellá, G.; Munkvold, G.; Imerman, P.; Hyde, W. (1999b). Effects of temperature, incubation period and substrate on production of fusaproliferin by *Fusarium subglutinans* ITEM-2404. *Nat. Toxins* 7: 129 - 132.
 - Chu, F. S.; Lee, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 847 - 852.
 - 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.
 - Chulze, S.; Ramirez, M. L.; Pascale, M.; Visconti, A. (1998a). Fumonisin production by, and mating population of, *Fusarium* Section *Liseola* isolates from maize in Argentina. *Mycol Res* 102: 141 - 144.

- Claydon, N.; Grove, J. F. (1984). *Fusarium* as an insect pathogen. En: The applied mycology of *Fusarium*. M. Moss and J. Smith (eds.). Combridge University Press, England.
- Cortez-Rocha, M. O.; Ramírez-Asrudillo, W. R.; Sanchez-Mariñez, R. I.; Rosas-Burgos, E. C.; Wong-Corral, F. J.; Borboa-Flores, J.; Castellón-Campaña, L. G., Tequida-Meneses, M. (2003). Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 668-673.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Nelson, P.E. (1994). Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(5):1695-1697.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Leslie, J.F. and Nelson, P. E. (1992). Heritability of Fumonisin B1 production in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9): 2799-2805.
- Doko, B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Schjoth, J. (1995). Incidence and levels of fumonisins contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.* 43: 429-434.
- Elmer, W. H.; Ferrandino, F. J. (1992). Pathogenicity of *Fusarium* species (section *Liseola*) to asparagus. *Mycologia* 84: 253 - 257.
- Fadl Allah, E. M. (1998). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium moniliforme* from freshly harvested maize ears with special references to fumonisin production in Egypt. *Mycopathologia* 140: 99-103.
- Flynn, T.J.; Stack, M.E.; Troy, A.L.; Chirtel, S.J. (1997). Assessment of the embryotoxic potential of the total hydrolysis product of FB₁ using cultured organogenesis-staged rat embryos. *Food Chem. Toxicol.* 35: 1135 - 1141.
- Fotso, J.; Leslie, J.F.; Smith, J.S. (2002). Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin and fumonisins B₁, B₂ and B₃ by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* (En prensa).
- Fraumeni, J. F.; Blot, W. J. (1977). Geographical variation in esophageal cancer mortality in the United States. *J. Chron. Dis.* 30: 759 - 767.
- Gäumann, E.; Naef-Roth, S.; Kern, H. (1960). Phytotoxic activity of the enniatins. *Phytopathol.* 40: 45 - 51.

- Gelderblom, W. A. C.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Horak, R. M.; Vleggaar, R.; Kriek, N. P. J. (1988a). Fumonisin - nobel mycotoxins with cancer - promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806 - 1811.
- Gelderblom, W. A. C.; Marasas, W. F. O.; Jaskiewicz, K.; Combrinck, S.; Van Schalkwyk, D. J. (1988b). Cancer promoting potential of different strains of *Fusarium moniliforme* in a short - term cancer initiation/promotion assay. *Carcinogenesis* 9: 1405 - 1409.
- Gelderblom, W. A. C.; Snyman, S. D. (1991). Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Mycotoxin Res.* 7: 46-52
- Grove, J.F.; Pople, M. (1980). The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia* 72: 103 - 105.
- Gupta, S.; Krasnoff, S. B.; Underwood, N. L.; Renwick, J. A. A. and Roberts, D. W. (1991). Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* 115: 185 - 189.
- Gupta, S.; Montllor, C.; Hwang, Y. (1995). Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Nat. Prod.* 58: 733 - 738.
- Hamill, R.; Higgins, C.; Boaz, H.; Gorman, M. (1969). The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrat. Lett.* 49: 4255 - 4258.
- Harrison, L. R.; Colvin, B. M.; Greene, I. T.; Newman, L. E.; Cole, J.R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme* *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 217 - 221.
- Hesseltine, C. W. (1985). Global significance of mycotoxins. En: International IUPAC. Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
- Holocomb, M.; Thompson, H. C.; Hankkins, L. J. (1993). Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOX and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 41: 746-767.

- Hopman, E. C.; Murphy, P. A. (1993). Detection of fumonisin B1, B2 and B3 and hydrolyzed fumonisin B1 in corn containing food. *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1655-1658.
- Hussein, S. H.; Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. 101 – 134.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC Lyon, France. 56: 445 –466.
- Jardine, D. J.; Leslie, J. F. (1992). Aggressiveness of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) isolates to grain sorghum under greenhouse conditions. *Plant Dis.* **76**: 897 - 900.
- Kleinkauf, H. (1979). Antibiotics polypeptides - Biosynthesis on multifunctional protein templates. *Planta Med.* **35**: 1 - 18.
- Kmet, J.; Mahboubi, E. (1972). Esophageal cancer in the Caspian Littoral of Iran: Initial studies. *Science* **175**: 846 - 853.
- Kuiper-Goodman, T.; Scott, P.M.; McEwen, N.P.; Lambert, G.A.; Ng-W. (1996). Approaches to the assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **392**: 369 – 393.
- Leslie J.F. (1995) *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Ca. J. Bot.* **73**: S282-S291.
- Leslie, J. F. (1990). Genetic exchange within sexual and asexual populations of *Fusarium*. En: *Fusarium Witl of Banana*. Ploetz, R. C. (ed.). APS Press, St. Paul, Minnesota. pp 37 - 48.
- Leslie, J. F. (1996). Introductory biology of *Fusarium moniliforme* in *Food*. Jackson, L. S.; De Vries, J. W.; Bulleman, L. B., (eds.) Plenum Press, New York. pp. 345-353 En: *Fumonisin in Food*. Jackson, L. S.; De Vries, J. W. ; Bulleman, L. B., Eds. Plenum Press, New York. pp. 153 - 164.
- Leslie, J. F.; Doe, F. J.; Plattner, R. D.; Shackelford, D. D.; Jonz, J. (1992a). Fumonisin B₁ production and vegetative compatibility of strains from *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Mycopathologia* **117**: 27 - 45.

- Leslie, J. F.; Mansuetus, A. S. B. (1995). Biological species and vegetative compatibility group as population descriptors in *Fusarium*. En: *Disease Analysis through Genetics and Biotechnology: Interdisciplinary Bridges to Improved Sorghum and Millet Crops*. Leslie, J. F.; Frederiksen, R. A, Eds. Iowa State University Press. pp. 277 - 290.
- Leslie, J. F.; Pearson, C. A.; Nelson, P. E.; Toussoun, T. A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 88: 343 - 350.
- Leslie, J. F.; Plattner, R. D.; Desjardins, A. E.; Klittich, C. J. R. (1992b). Fumonisin B₁ production by strains from different mating population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 82: 341 - 345.
- Leslie, J.F. (1991). Mating population in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*) *Phytopathology* 81: 1058 - 1060.
- Leslie, J.F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:127 - 150.
- Leslie, J.F. (1999). Genetic status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Proceeding of 1999 Agricultural Biotechnology Symposium, Biology & Chemistry of Fungal Secondary Metabolites. 27th August 1999. College of Agriculture & Life Sciences Seoul National University, Seoul, Korea.
- Leslie, J.F.; Marasas, W.F.O.; Shephard, G.S.; Sydenham, E.W.; Stockenström, S.; Thiel, P.G. (1996). Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1182 - 1187.
- Logrieco, A., Moretti, A.; Altomare, C.; Bottalico, A.; Carbonell Torres, E. (1993a). Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia* 122: 185 - 190.
- Logrieco, A., Moretti, A.; Ritieni, A.; Bottalico, A.; Corda, P. (1995). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease* 79: 727 - 731.

- Logrieco, A., Moretti, A.; Ritieni, A.; Chelkowski, J.; Altomare, C.; Bottalico, A.; Randazzo, G. (1993b). Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infested corn ears in Poland. *J. Agric. F. Chem* 41: 2149 - 2152.
- Logrieco, A.; Bottalico, A. (1988). *Fusarium* species of the *Liseola* Section associated with stalk and ear rot of maize in Southern Italy and their ability to produce moniliformin. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90: 215 - 219.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; Kosteci, M.; Golinski, P.; Ritieni, A.; Chelkowski, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3084 - 3088.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Fornelli, V.; Ritieni, A.; Caiaffa, M.F.; Randazzo, G.; Bottalico, A.; Macchia, L. (1996). Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, EF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B lymphocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3378 - 3384.
- Macchia, L.; Di Paola, R.; Fornelli, F.; Nenna, S.; Moretti, A.; Napoletano, R.; Logrieco, A. Caiffa, M.; Tursi, A.; Bottalico, A. (1995). Cytotoxicity of beauvericin to mammalian cells. International Seminar on *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Martina Franca, Italy, May 9-13. pp 72-73 (Abstract).
- Mannon, J.; Johnson, E. (1985). Fungi down on the farm. *New Sci.* 105:12 - 16.
- Maragos, C. M. (1995). Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate labeled fumonisin B₁. *J. Agric. Food Chem.* 43: 390 - 394.
- Marasas, W. F. O. (1995). Fumonisins: their implications for human and animal health. *Nat. Toxins* 3: 193 - 198.
- Marasas, W. F. O.; Rabie, C. J., Lubben, A.; Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Van Wyk, P. S. (1987). *Fusarium napiforme*, a new species from millet and sorghum in southern Africa. *Mycologia* 79: 910 - 914.

- Marasas, W.; Kriek, N.; Wiggins, V.; Steyn, P.; Towers, D.; Hastie, T. (1979). Incidence, Geographic Distribution, and Toxicogenicity of *Fusarium* species in South African corn. *Phytopathology* 69: 1181 - 1185.
- Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Rabie, C.J.; Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. (1986). Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 78: 242 - 247.
- Merrill, A. H., Jr.; Van Echten, G.; Wang, E.; Sandhoff, K. (1993). Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipids biosynthesis in cultures neurons *in situ*. *J. Biol. Chem.* 268: 27299 - 27306.
- Merrill, A. H., Jr. (1991). Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J. Bioenergetics Biomembranes* 23: 83 - 104.
- Merrill, A.H. Jr.; Schmelz, E.M.; Dillehay, D.L.; Spiegel, S.; Shayman, J.A.; Schroeder, J.J.; Riley, R.T.; Voß, K.A.; Wang, E. (1997). Sphingolipids – The enigmatic lipid class: Biochemistry, Physiology and Pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142: 208 - 225.
- Merrill, A.H. Jr.; Schmelz, E.M.; Wang, E.; Schroeder, J.P.; Dillehay, D.L.; Riley, R.T. (1995). Role of dietary sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism in cancer and other disease. *Journal of nutrition* 125: 1677S – 1682S.
- Merrill, A.H. Jr.; Wang, E.; Vales, T.R.; Smith, E.R.; Schroeder, J.J.; Menaldino, D.S.; Alexander, C.; Crane, H.M.; Xia, J.; Liotta, D.C.; Meredith, F.I.; Riley, R.T. (1996). Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 392: 297 – 306.
- Miller, J. D. (1992). Production of fumonisins in liquid culture. *106th Annu. Assoc. Off. Anal. Chem. Meet.*, Cincinnati, Ohio, p. 106 (Abstract).
- Moretti, A.; Logrieco, A.; Bottalico, A.; Ritieni, A.; Fogliano, V.; Randazzo, G. (1995b). Beauvericin and fusaproliferin production by mating population of *Fusarium Liseola* Section. International Seminar on *Fusarium* Mycotoxins Taxonomy and Pathogenicity. Abstract book. pp.174.

- Moretti, A.; Logrieco, A.; Bottalico, A.; Ritieni, A.; Fogliano, V.; Randazzo, G. (1996). Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia* 48: 44 - 56.
- Moretti, A.; Logrieco, A.; Ritieni, A.; Randazzo, G.; Macchia, L. (1998). Beauvericin and fusaproliferin: emerging *Fusarium* toxins. *Bull. Inst. Compr. Agr. Sci. Kimki Univ.* 6: 13 - 21.
- Moss, M (1996). Mycotoxins. *Mycol. Res.* 100: 513 - 523.
- Munkvold, G. P.; Stahr, H.M.; Logrieco, A.; Moretti, A.; Ritieni, A. (1998). Occurrence of fusaproliferin and beauvericin in *Fusarium* contaminated livestock feed in Iowa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3923-3923.
- Munbazi, C.; Bulleman, L. B. (1996). Molds and mycotoxins in food from Burundi. *J. Food Prot.* 59 869 - 875.
- Murphy, P. A.; Rice, L. G.; Ross, P. F. (1993). Fumonisin B₁, B₂ and B₃ contain of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screening. *J. Agric. Food Chem.* 41:263-266.
- Musser S.T. and Plattner R.D. (1997). Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamai*. *J. Agric. Food Chem.* 45:1169-1173.
- Nelson, P. E.; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 233 - 252.
- Nelson, P. E.; Plattner, R. D.; Shackelford, D. D. and Desjardins, A. E. (1992). Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in Section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 984 - 989.
- Nelson, P. E.; Plattner, R. D.; Shackelford, D. D.; Desjardins, A. E. (1991). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2410 - 2412.
- Nelson, P.E. (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117: 29 - 36.

- 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.
- Norred, W.P.; Voss, K.A.; Riley, R.T.; Meredith, F.I.; Bacon, C.W.; Merrill, A.H. Jr. (1998). Mycotoxins and health hazards: toxicological aspects and mechanism of action of fumonisins. *Toxicological Sciences* 23: 160 – 164.
- Pietri, A.; Bertuzzi, T.; Peña, G. (1995). Fumonisin contamination of maize grown in Italy. En: International Seminar on *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity, Martina Franca. Italy. Abstract Book p. 18.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update review. *Revue. Med. Vet.* 6: 479 - 492.
- Pittet, A; Parisod, V.; Schellenberg, M. (1992) Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based products from the Swiss market. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1352-1354.
- Plattner, R. D.; Norred, W. P.; Bacon, C. W.; Voss, K. A.; Peterson, R.; Shackelford, D. D.; Weisleder, D. (1990). A method of detection of fumonisin in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia* 82: 698 - 702.
- Plattner, R. D.; Shackelford, D. D. (1992). Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117: 17 - 22.
- Price, W. D.; Lovell, R. A.; McChesney, D. J. (1993) Naturally occurring toxins in feedstuff: Center for Veterinary Medicine perspective. *J. Anim. Sci.* 71: 2556-2562.
- Qureshi, M. A.; Hagler, W. M. (1992). Effect of fumonisin B₁ exposure on chicken macrophage functions in vitro. *Poult. Sci.* 71: 104 -112.
- Randazzo, G. Fogliano, V.; Ritieni, A.; Mannina, L.; Rossi, E.; Scarallo, A.; Segre, A. (1993). Proliferin, a new sesterterpene from *Fusarium proliferatum*. *Tetrahedron* 49: 10883 - 10896.
- Rava, E. (1996). Mycotoxins in maize products of the 1994/95 marketing season. *Mycot. Res.* 12: 25 – 30.
- Reyes V., W. P. (2001). Detección del hongo *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de sus

- hidrolizados. Tesis Doctoral, Universidad de Guadalajara. Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México.
- Reyes, W. P., Nuño, R.R., Ramírez, A.A. y González, A.A. (2000). Detección de *Fusarium moniliforme* y fumonisinas en tres híbridos del maíz en Ameca, Jalisco. *Scientia CUCBA*, 2(1): 27-33.
 - Reyes, W. P.; Landeros, P.; Ramírez, A, Carbajal, M. (2002). Efecto del proceso de nixtamalización sobre los niveles de Fumonisinas y la producción de hidrolizados en masa y tortillas. FALTA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
 - Reynoso, M. M.; Torres, A. M.; Chulze, S N. (2004). Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* complex isolated from maize. 154 – 160.
 - Rheeder, J. P.; Marasas, W. F. O., Thiel, P. G.; Sydenham, E. W.; Shephard, G. S.; Van Schalwyk, D. J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Tanskei. *Phytopathology* 82: 353 - 357.
 - Riley, R. T.; Hinton, D. M.; Chamberlain, W. J.; Bacon, C. W.; Wang, E.; Merrill, A. H.; Voss, K. A. (1994). Dietary fumonisin B₁ induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. *J. Food Prot.* 57: 638 - 645.
 - Ritieni, A.; Fogliano, V.; Randozzo, G.; Scarallo, A.; Logrieco, A.; Moretti, A.; Mannina, L. and Bottalico, A. (1995). Isolation and characterization of fusaproliferin, a new toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. *Nat. Tox.* 3: 17-20.
 - Ritieni, A.; Moretti, A.; Logrieco, A.; Bottalico, A.; Randozzo, G.; Monti, S.M.; Ferracane, R.; Fogliano, V. (1997). Occurrence of fusaproliferin, fumonisin B₁ and beauvericin in maize from Italy. *J Agric Food Chem* 45: 4011 - 4016.
 - Rohrbach, K. G. and Pfeiffer, J. B. (1976). Susceptibility of pineapple cultivars to fruit diseases incited by *Penicillium fusiculosum* and *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 66: 1386 - 1390.

- Rosiles, M. R.; Bautista, J.; Fuentes, V. O.; Ross, F. (1998). An outbreak of equineleukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico; associated with fumonisin B₁. *Journal of Veterinary Medicines Series*, **A 45**, 299-302.
- Ross P. F.; Rice, L. G.; Osweiler, G. D.; Nelson, H. A.; Richard, J. L.; Wilson, T. M. (1992). A review and up-date of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. *Mycopathologia* 117: 109 -114.
- Ross P. F.; Rice, L. G.; Plattner, R. D.; Osweiler, G. D.; Wilson, T. M.; Owens, D. L.; Nelson, H. A.; Richard, J. L. (1991a). Concentration of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia* 114: 129 - 135.
- Ross P. F.; Rice, L. G.; Reagor, J. C.; Osweiler, G. D.; Wilson, T. M.; Nelson, H. A.; Owens, D. L.; Plattner, R. D.; Harlin, K. A.; Richard, J. L.; Colvin, B. M.; Banton, M. I. (1991b). Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 328 - 329.
- Ross. P. F., Nelson, P. E., Richard, J. L., Osweiler, G. D., Rice, L. G., Plattner, R. D., Wilson, T. M. (1990). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3225 -3226.
- Rottinghaus, G. E.; Coatney, C. E.; Minor, H. C. (1992). A rapid, sensitive thin layer chromatographic procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 326 - 329.
- Sánchez-Rangel, D.; Sanjuán-Badillo, A.; Plasencia, J. (2005). Fumonisin production by *Fusarium verticillioies* strains isolated rom maize in Mexico and development of a Polymerase Chain Reaction to detected potencial toxicogenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8565-8571.
- Santini, A.; Ritieni, A; Fogliano, V; Randazzo, G; Logrieco, A.; Benedetti, E. (1996). Structure and absolute stereochemistry of fusaproliferin, a toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. *J. Nat Prot* 59: 109 - 112.
- Scott, P. M.; Lawrence, G. A. (1992). Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. AOAC Intl.* 75: 829 - 834.

- Scott, P.; Trenholm, H.; Sutton, M. (1985). Mycotoxins: a Canadian perspective. Ottawa. *Nat. Res. Council*.
- Scudamore, K. A.; Chan, H. K. (1993). Occurrence of fumonisin mycotoxins in maize and millet imported into United Kingdom. En: *Occurrence and Significance of Mycotoxins*; Scudamore, K. A. Ed. Central Sci. Lab.: Slough, UK. Pp.186-189.
- Scudamore, K. A.; Hetmanski, M. T.; Nawaz, S.; Naylor, J.; Rainbird, S. (1997): Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC: *Food Addit. Contam.* **14**: 175-186.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2003), <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/>
- Secretaría de Desarrollo Rural Jalisco (2005), <http://facej.jalisco.gob.mx>
- Shaw, S. F.; Elliott, V.; Leslie, J. F. (1993). Genetic diversity in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*) from bananas. *Fung. Genet. Newsl.* **40A**, 25.
- Shephard, G. S.; Thiel, P.G.; Sydenham, E. W. (1992). Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* **574**: 299 - 304.
- Shephard, G.S.; Sewram, V.; Nieuwoudt, T.W.; Marasas, W.F.O.; Ritieni, A. (1999) Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* Section *Liseola*. *J Agric Food Chem* **47**: 5111 - 5115.
- Shephard, G.S.; Sydenham, E.W.; Thiel, P.G.; Gelderblom, W.C.A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr* **13**: 2077 - 2080. Shetty, P. H.; Bhat, R. V. (1997). Natural co-occurrence of fumonisin B₁ and its co-occurrence with aflatoxin B₁ in Indian sorghum, maize and poultry feeds. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2170-2173.
- Snyder, W. C. and Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.* **27**: 64 - 67.

- Snyder, W. C. and Hansen, H. N. (1941). The species concept in *Fusarium* with reference to Section *Martiella*. *Amer. J. Bot.* 28: 738 - 742.
- Snyder, W. C. and Hansen, H. N. (1945). The species concept in *Fusarium* with reference to Section *Discolor* and other sections. *Amer. J. Bot.* 32: 657 - 666.
- Sohn, H. B.; Seo, J. A.; Lee, Y. W. (1999). Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Addit. Contam.* 16: 153-158.
- Srobarova, A.; Moretti, A.; Ferracane, R.; Ritieni, A.; Logrieco, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in pre-harvest maize ear rot, and associated mycotoxins in Slovakia. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 299 - 306.
- Stack, M. E.; Eppley, R. M. (1992). Liquid chromatographic determination of fumonisin B1 and B2 in corn and corn products. *J. AOAC Int.* 75: 834-837.
- Sun, S. K.; Snyder, W. C. (1981). The bakane disease of the rice plant. En: *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*, Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Cook, R. J.; Eds.; Pennsylvania State University Press: University Park, P. A. pp 104 - 113.
- Sundheim, L., Schjoth, J.; Kosiak, B.; Forthum, E.; Visconti, A. (1995). Fumonisin in stores maize in Zambia. International Seminar on Mycotoxin Taxonomy and Pathogenicity. Abstract Book. P. 15.
- Sydenham, E. W.; Gelderblom, W. A. C.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O. (1990). Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem* 38: 285 - 290.
- Sydenham, E.W.; Shephard, G.S.; Stockenström, S.; Rheeder, J. P ; Marasas, W.F.O.; van der Merwe, M. J. (1997). Production of fumonisin B analogues and related compounds by *Fusarium globosum*, a newly described species from corn. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 4004 - 4010.
- Sydenham, E. W.; Shepard, G. S.; Marasas, W. F. O.; Rheeder, J. P.; Peralta-Sanhueza, C. E.; González, H. H. L.; Resnik, S. (1993). Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *J. Agric. Food Chem.* 41: 891-895.

- Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W.; Shepard, G. S., Gelderblom, W.C. A.; Nieuwenhuis, J. J. (1991). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1089:1093.
- Thomas, J. L. (1984). *Fusarium* as a biodeteriogen: a case history. In: The applied biology of *Fusarium*. M.O. Moss and J.E. Smith (eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- Ueno, Y.; Aoyama, S.; Sugiura, Y.; Wang, D. S.; Lee, U. S.; Hirooka, E. Y.; Hara, S.; Karki, T.; Chen G. and Yu, S-Z. (1993). A limited survey of fumonisins in corn based products in Asian countries. *Mycot. Res.* 9: 27-34.
- Ung-Soo L.; Myong-Yur, L.; Kwang-Sop, S.; Yun-Sik, M.; Chae-Min, C.; Ueno, Y. (1994). Production of fumonisin B1 and B2 by *Fusarium molliniforme* isolated from Korean corn kernels for feed. *Mycot. Res.* 10: 67-72.
- Viljoen, J. H.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G. (1993). Fungal infection and mycotoxin contamination of commercial maize. En: *Cereal Science and Technology: Impact on a Changing Africa*. Taylor, J. R. N., Randall, P. G., Viljoen, J. H., Eds. CSIR: Pretoria, SA. Pp. 837 – 853.
- Visconti, A.; Doko; M. B. (1994). Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC. Int.* 77: 546-550.
- Voss, K. A.; Chamberlain, W. J.; Bacon, C. W.; Norred, W. P. (1993). A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B₁. *Nat. Tox.* 1: 222 - 228.
- Voss, K. A.; Plattner, R. D.; Bacon, C. W.; Norred, W. P. (1989). Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MCR 826 culture material. *Mycopathologia* 112: 81 - 92.
- Voss, K.A.; Bacon, C.W.; Meredith, F.I.; Norred, W.P. (1996). Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalised and water extracted *Fusarium moniliforme* culture material. *Food and Chemical Toxicology* 34: 623 – 632.

- Wang, D. S.; Sugiura, Y.; Ueno, Y.; Buddhanont, P.; Suttajit, M. (1993). A limited survey of fumonisins in corn from Thailand. *Thai. J. Toxicol.* **9**: 42-46.
- Wang, D. S.; Liang, Y. X.; Chau, N. T.; Dien, L. D.; Tanaka, T.; Uneno, Y. (1995a). Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in North Vietnam. *Nat. Toxins* **3**: 445-449.
- Weibking, T. S.; Ledoux, D. R.; Bermudez, A. J.; Turk, J. R. and Rottinghaus, G. E. (1993). Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. *Poultry Sci.* **72**: 456-466.
- Wollenweber, H. W.; Reinking, O. A. (1935). Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schädigung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin. pp 355.
- Yang, C. S. (1980). Research and esophageal cancer in China: A review. *Cancer Res.* **40**: 2633 - 2644.
- Yoshizawa, T.; Yamashita, A.; Luo, Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high- and low - risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1626-1629.
- Yoshizawa, T.; Yamashita, A. (1995). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Southeast Asia. International Seminar on *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Martina Franca. Italy. Abstract Book p. 10.
- Yoshizawa, T.; Yamashita, A. (1996). Occurrence of fumonisin and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit. Contam.* **13**: 163-168.

ANEXO 1

Medios de cultivo

NASH Y SNYDER:

Peptona, 15 g, KH_2PO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; Agar, 20 g; Pentacloronitrobenzeno, 1 g; Agua destilada, 1000 ml.

Se ajustó el pH a 5,5 - 6,5 y se esterilizó en autoclave, se dejó enfriar el medio a 50°C y se agregó 20 ml de sulfato de estreptomicina y 12 ml de sulfato de neomicina por litro.

Solución: 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):

Se pesaron 15 g de agar ultra puro por cada 1.000 ml de agua destilada y luego se procedió a esterilizar el medio durante 15 minutos a 121 °C en autoclave. Se fraccionó en placas de Petri de 6 cm por 15 mm y se colocaron las hojas de clavel estériles (3 a 4 hojas por placa).

AGAR AGUA (AA):

Agar, 15 g; Agua destilada, 1 000 ml. Se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C en autoclave.

AGAR PAPA GLUCOSADO (APG):

Papas 250 g; Agar 20 g; Glucosa 20 g; Agua estilada 1.000 ml

Las papas con cáscara se lavaron, se cortaron en trozos, y se hidrataron con 500 ml de agua, se hirvieron en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Por otro lado se esterilizó el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtró el caldo con las papas a través de gasa y se adicionó el agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneizó para obtener un puré y la mitad de éste se adicionó al agar junto con la glucosa, luego se llevó a volumen con agua destilada (1.000 ml). Se distribuyó el medio en tubos de ensayos y se esterilizó por autoclave a $\frac{3}{4}$ de atmósfera durante 20 minutos.

AGAR JUGO DE TOMATE (V8):

Jugo V8 200 ml, agar 20 g, CO_3Ca 2 g, agua destilada 800 ml. Se distribuyó el medio en tubos de ensayos y se esterilizó por autoclave a $\frac{3}{4}$ de atmósfera durante 20 minutos.