

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



DISTRIBUCION DE CEPAS DE *Fusarium moniliforme*
PRODUCTORAS DE FUMONISINA B1 EN MAIZ
CULTIVADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEON

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR:

Q.B.P. JUANA MARIA CANTU RODRIGUEZ

CD. UNIVERSITARIA

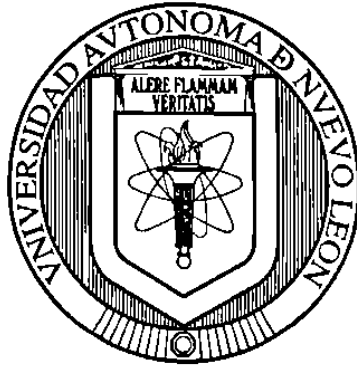
NOVIEMBRE DE 1998

TM
SB191
.M2
C35
c.1



1080087046

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DISTRIBUCION DE CEPAS DE *Fusarium moniliforme* PRODUCTORAS
DE FUMONISINA B1 EN MAIZ CULTIVADO EN EL ESTADO DE
NUEVO LEON

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

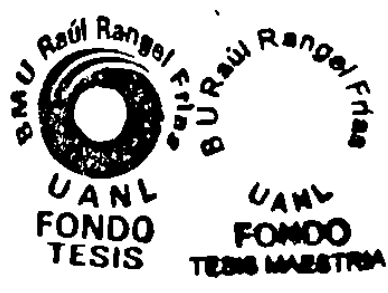
POR

Q.B.P. JUANA MARIA CANTU RODRIGUEZ

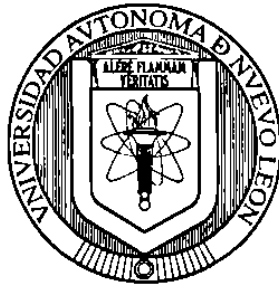
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 1998

T
SB
91



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



DISTRIBUCION DE CEPAS DE *Fusarium moniliforme* PRODUCTORAS DE FUMONISINA B1 EN MAIZ CULTIVADO EN EL ESTADO DE NUEVO LEON

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR

Q.B.P. JUANA MARIA CANTU RODRIGUEZ

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:


M.C. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA
(DIRECTOR DE TESIS)

SECRETARIO:


M.S.P. GRACIELA GARCIA DIAZ

VOCAL:


DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH POURNAVAB

CO-DIRECTOR:


DRA. ADRIANA ELIZONDO HERRERA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 1998

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo “Dr. Howard T. Dulmage” del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Q.B.P. M.C. Hugo Alberto Luna Olvera.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por la gracia de haberme concedido la vida y estar siempre conmigo, en especial los momentos más difíciles.

CONACYT

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo institucional y económico proporcionado para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al M.C. Hugo Alberto Luna Olvera.

Por la asesoría proporcionada en el presente trabajo, además de su confianza, amistad y el ejemplo de superación profesional y seguridad en sí mismo, fueron herramientas valiosas para el desarrollo de esta tesis, así como lo será para mi vida profesional y personal. ¡Gracias!

A la M.S.P. Graciela García Díaz.

Por su apoyo en los aspectos analíticos de esta investigación, así como también su sincera amistad. Su experiencia y conocimientos fueron muy importantes para mi formación profesional.

Al Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab.

Por la revisión excelente de este trabajo, disponibilidad de tiempo y su paciencia, su enseñanza será de gran utilidad para realizar trabajos posteriores.

A la Dra. Adriana Elizondo Herrera.

Por las sugerencias y su colaboración en la revisión de este trabajo, así como su ejemplo de dedicación y empeño, está su apoyo incondicional.

De manera especial agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, así como también a los que forman parte del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Microorganismos.

A la M.C. María Guadalupe Maldonado Blanco y al M. C. Carlos Francisco Sandoval Coronado, por su amistad y el apoyo proporcionado durante la estancia en el laboratorio.

A la Sra. Norma González Cantú, por la revisión de ortografía y las atenciones que me brindó durante la estancia en esta Facultad, además de ser para mí un ejemplo de honestidad y trabajo profesional.

A la Dra María del Refugio González Rendón, por todas sus atenciones, sugerencias y el apoyo, que me brindó para la realización de esta investigación.

Al Biól. Francisco Guillén, por el apoyo proporcionado en este trabajo; fue muy importante la información que me proporcionó para realizar un muestreo en campo. "se necesita siempre un guía para alcanzar el éxito".

A los compañeros de trabajo del Laboratorio Estatal de Salud y Laboratorio del Hospital Metropolitano, que de alguna manera ayudaron a mi formación profesional.

A mi amiga Fabiola Aracely Iracheta Nuñez, por su amistad y el apoyo que me brindó cuando más lo necesité. Sinceramente se lo agradezco.

A todas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Sr. Juan José Cantú Cantú.

Sra. Flora Elisa Rodríguez de Cantú.

Con todo mi amor y respeto: Por el apoyo, cariño y comprensión, esperando que la culminación de este trabajo sea un orgullo para ellos.

A MI ESPOSO:

Prof. y Lic. Miguel Angel Duarte Arellano.

Con todo mi amor y admiración, por darme siempre su apoyo, confianza, comprensión y principalmente su amor y compañía.

A MI HIJA:

Yesica Nallely.

Mi más grande orgullo y estímulo para seguir adelante, esperando que pueda superar los logros de sus padres.

A MIS HERMANOS:

Beatríz.

Denis Alejandro.

Juan José.

Erika Guadalupe.

Eduardo.

Por haber estado siempre conmigo y demostrarme su apoyo y cariño en todo momento.

A MIS ABUELITOS:

(Q.E.P.D)

De quien tengo muy bellos recuerdos y si vivieran, estuvieran conmigo compartiendo este momento tan especial.

A MI ABUELITA:

Sra. Rosa Francisca.

Por sus consejos y apoyo; " quien tal vez sin saberlo me da día con día una lección de vida".

A TODOS MIS FAMILIARES:

Con mucho respeto y cariño.

A LA FAMILIA DUARTE ARELLANO:

Por el apoyo moral y las atenciones que me han brindado, especialmente a Emma.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
Microbiología de <i>Fusarium moniliforme</i>	4
Micotoxinas producidas por <i>Fusarium moniliforme</i>	5
Métodos de detección de las fumonisinas	9
Toxicidad de las fumonisinas	11
Ocurrencia de las fumonisinas	13
Producción de fumonisinas por <i>Fusarium moniliforme</i>	15
OBJETIVO GENERAL	17
MATERIAL Y METODOS	18
Diseño de muestreo	18
Reactivos	18
Medios de cultivo	20
Aislamiento de <i>Fusarium spp</i>	20
Identificación de <i>Fusarium moniliforme</i>	21
Producción <i>in vitro</i> de las fumonisinas	22
Extracción de las fumonisina B1	24
Determinación de la fumonisinas	25
Diseño estadístico	26

RESULTADOS Y DISCUSION	27
Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp	27
Identificación de <i>Fusarium moniliforme</i>	34
Producción <i>in vitro</i> de fumonisinas	43
CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA	61

ABREVIATURAS

%	Por ciento
µg/g	Microgramo por gramo
µl	Microlitro
15-ADON	15-acetil desoxinivalenol
3-ADON	3-acetil desoxinivalenol
ACN	Acetonitrilo
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada al espectro de masas
cm	Centímetro (s)
DON	Desoxinivalenol
E.U.A.	Estados Unidos de América
FA1	Fumonisina A1
FA2	Fumonisina A2
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
FB3	Fumonisina B3
FB4	Fumonisina B4
FBs	Fumonisinias
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
g	Gramo (s)
H ₂ O	Agua
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
hr	Hora
hrs	Horas
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo (s)
KH ₂ PO ₄	Fosfato ácido de potasio

LEM	Leucoencefalomalacia
MC	Material de cultivo
mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitros
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
NaClO	Hipoclorito de sodio
ng	Nanogramos
NIV	Nivalenol
° C	Grados centígrados
OPA	Ortoftaldialdehído
PCNB	Pentacloro-nitrobenceno
PDA	Agar papa dextrosa
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
Rf	Relación de la distancia del movimiento de la mancha/distancia del movimiento del solvente
SAX	Columnas de intercambio iónico
SNA	Agar sintético nährtoffärmer
ZEA	Zeralenona

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Distribución de las muestras de maíz colectadas en primavera/verano 1997 en localidades del estado de Nuevo León	19
2	Concentración de los estándares de fumonisina B1	24
3	Aislamiento en PCNB de cepas fúngicas en maíz cultivados en diversas localidades del estado de Nuevo León	29
4	Características de las cepas fúngicas aisladas en diversas localidades del estado de Nuevo León	37
5	Distribución de cepas de <i>Fusarium</i> spp en muestras de maíz cultivado en diversos distritos del estado de Nuevo León	39
6	Detección de cepas de <i>Fusarium</i> spp en muestras de maíz cultivadas en diversas localidades del estado de Nuevo León	41
7	Producción de fumonisinas por cepas de <i>Fusarium</i> spp cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León	46
8	Distribución del potencial toxigénico de cepas de <i>Fusarium moniliforme</i> en los distritos de cultivo del estado de Nuevo León	47
9	Clasificación del potencial toxigénico de cepas de <i>Fusarium</i> spp productoras de fumonisina B1	49
10	Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en los distritos de Nuevo León	51

11	Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en los municipios de Nuevo León	52
12	Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en las localidades de Nuevo León	53
13	Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en las variedades de maíz de Nuevo León	54

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura química de las fumonisinas	8
2	Porcentaje del aislamiento de <i>Fusarium</i> spp en granos de maíz cultivado en los distritos de cultivo del estado de Nuevo León	30
3	Colonias aisladas de <i>Fusarium</i> spp a partir de semillas de maíz desinfectadas superficialmente	31
4	Colonias aisladas de <i>Fusarium</i> spp a partir de semillas de maíz desinfectadas superficialmente	32
5	Colonias de <i>Fusarium moniliforme</i> Mex-34 utilizada como control en este estudio	33
6	Características morfológicas de <i>Fusarium moniliforme</i> : A) Microconidias en cadena 10 X, B) Microconidias en cadena 40 X, C) Monofialide 40 X, D) Microconicias 40 X	38
7	Porcentaje del aislamiento de cepas de <i>Fusarium</i> spp en maíz cultivado en los distritos del estado de Nuevo León	40
8	Porcentaje del aislamiento de <i>Fusarium</i> spp en muestras de maíz cultivado en diversas localidades del estado de nuevo León	42
9	Comparación del potencial toxigénico de cepas de <i>Fusarium moniliforme</i> aisladas de maíz cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León	48

10	Comparación del potencial toxigénico entre cepas de <i>Fusarium</i> spp aisladas de maíz cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León	50
----	---	----

RESUMEN

Fusarium moniliforme es un hongo que se presenta principalmente en maíz y posee la capacidad de producir toxinas caracterizadas como fumonisinas (FA1, FA2, FB1, FB2, FB3 y FB4) de las cuales solo la FB1 se ha demostrado que es toxigénica, motivo por el cual el presente trabajo se enfoca a estudiar la distribución de cepas de *F. moniliforme* productoras de fumonisina B1 en maíz cultivado en el estado de Nuevo León. Se realizó un muestreo en 21 campos agrícolas, distribuidos en los distritos de Montemorelos, Galeana y Apodaca (4, 14 y 3 respectivamente). En el 95 % de las muestras, se logró aislar cepas de la Sección Liseola, en el medio selectivo PCNB modificado (eliminación en su fórmula del sulfato de neomicina y sustitución de 1.0 g/l del reactivo PCNB Terraclor por 0.8 g/l de PCNB grado técnico al 95 %), en el aislamiento fueron seleccionadas un total de 24 cepas de esta Sección, se identificaron 20 *F. moniliforme* y 4 *F. proliferatum* mediante la observación de características coloniales en el medio PDA y morfológicas en el medio SNA (Nelson, *et al.*, 1983; Booth, 1971), se procedió a determinar la capacidad de producir FB1 de las cepas aisladas; el potencial toxigénico de tales aislados se realizó mediante producción *in vitro* en medio de cultivo a base de maíz, inoculados con 1×10^7 conidias/ml. Para la separación y la identificación de las fumonisinas se estandarizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), obteniéndose un Rf para la FB1 de 74 y un color púrpura con un límite de detección menor de 50 ppm y comparado con un extracto crudo positivo proporcionado por el Dr. Plattner.

Se analizaron 20 cepas de *F. moniliforme* y 4 de *F. proliferatum*, detectándose por estimación visual concentraciones de FB1 expresadas en ppm ($\mu\text{g/g}$ de MC): 7 cepas menores de 50, 10 cepas entre 50 –500 y 7 cepas mayores de 500. Finalmente, se concluye que en maíz cultivado en el estado de Nuevo León, prevalece *F. moniliforme* con potencial toxigénico en el 25 % de las localidades que fueron evaluadas ($P < 0.05$) y están distribuidas en los 3 distritos de cultivo; particularmente en las variedades híbridas fueron las que albergaron la flora fúngica más toxigénica.

INTRODUCCION

Fusarium moniliforme (Sheldon, 1904) es un habitante común de la espermosfera de cereales, incluyendo al maíz como uno de los más importantes hospederos (Foley, 1979). Desde su descripción inicial, *F. moniliforme* ha sido relacionado con enfermedades en animales como leucoencefalomalacia en equinos (LEM) (Marasas, *et al.*, 1976), edema pulmonar en porcinos (Kriek, *et al.*, 1981) y últimamente en humanos se ha asociado con cáncer esofágico (Chu y Li, 1994), mediante la ingestión de maíz contaminado con sus toxinas.

Entre las diversas especies del género *Fusarium*, algunos producen pigmentos, ácido fusárico o giberelinas, que causan determinadas respuestas en animales y plantas; mientras que otras, se caracterizan por la producción de toxinas del tipo tricotecenos (Yoshizawa, *et al.*, 1990). Sin embargo, *F. moniliforme* es capaz de sintetizar fusarinas, moniliforminas y fumonisinas (Nelson, *et al.*, 1992; Cole, *et al.*, 1973), estas últimas son un grupo de moléculas de naturaleza alcaloide, que han demostrado alterar el metabolismo de esfingolípidos y una fuerte evidencia ha sugerido su relación con la alta incidencia de cáncer esofágico en algunas regiones de Africa (Bezuidenhout, *et al.*, 1988; Gelderblom, *et al.*, 1988; Wang, *et al.*, 1991).

En su ciclo de vida *F. moniliforme* desarrolla un estado saprofítico en suelo, mientras que en su fase parasítica, puede mostrar una condición asintomática o resultar sintomático con muerte de las plantas hospederas por acumulación de altas concentraciones de fumonisinas en sus tejidos. No obstante lo anterior, es factible encontrar con frecuencia bajas concentraciones de fumonisinas

en maíz usado para alimentación humana y animal (sp55@cornell.edu). Entre las distintas poblaciones de *F. moniliforme* el tipo A predomina ampliamente en cultivos de maíz, en E.U.A. y Africa ha demostrado producir cantidades significativas de fumonisinas. Sin embargo, tales datos son escasos para otros países, especialmente en Centro y Sudamérica, donde este alimento constituye la principal dieta diaria. Actualmente la única información al respecto, disponible para México, surge del aislamiento y caracterización de cepas realizado por Desjardins *et al.*, (1994) en 4 campos de una localidad en el municipio de Escobedo, N. L. Ante esta perspectiva, el presente trabajo aborda una estrategia para medir en una base más real, el potencial toxigénico de cepas de *F. moniliforme*, obtenidas de maíz para consumo humano en campos de cultivo de los distritos agrícolas del estado de Nuevo León.

ANTECEDENTES

Microbiología de *Fusarium moniliforme*

F. moniliforme (estado perfecto: *Giberella fujikuroi*) es un patógeno no obligado, que no tiene un hospedero específico y se puede encontrar en sorgo, trigo, algodón, frijol, tomate, cacahuate, plátano, soya, pimiento verde o algunos forrajes. Sin embargo, su hospedero más importante es el maíz. El ciclo de vida de este hongo está compuesto de un estado saprofítico y otro parasítico. Durante el estado saprofítico *F. moniliforme* obtiene los nutrientes de los tejidos muertos produciendo estructuras infectivas para establecer una enfermedad. Por otro lado, durante el estado parasítico, el hongo obtiene sus nutrientes de las células del hospedero después de una colonización intracelular. Usualmente muchos patógenos no obligados destruyen las células de su hospedero, avanza la infección y obtiene sus nutrientes del tejido muerto. Las enfermedades sintomáticas y la muerte de las plantas de maíz no son muy comunes, pero el estado parasítico es responsable de la pérdida económica del maíz. Existen diversas enfermedades atribuidas a este hongo que causan daño al maíz, son el marchitamiento de la planta de maíz, así como pudriciones en el tallo, mazorca, raíz y en la semilla. En los tejidos enfermos se encuentran altas concentraciones de fumonisinas (FBs) y en la fase asintomática con frecuencia contiene bajas concentraciones; esto es importante para la salud del ser humano, ya que el maíz asintomático es utilizado para su alimentación (sp55@cornell.edu).

Existen mínimo 7 diferentes tipos de poblaciones de *G. fujikuroi*, designadas de la A a la G, la población A, D y E son las más comunes en el maíz, algunas de estas poblaciones

corresponden en particular a especies anamórficas de la Sección Liseola, las poblaciones A y F son consideradas *F. moniliforme* en base a su morfología. Esta distinción es importante porque la población A contiene cepas productoras de FBs y la población F no las produce o lo realiza en concentraciones muy bajas. Muchas cepas encontradas en maíz son de la población A y las encontradas en sorgo son consideradas F (Leslie, *et al.*, 1992). La población D (*F. proliferatum*) solo contiene algunas cepas que producen abundantes FBs, pero las poblaciones B y E (*F. subglutinans*) no producen o solo en cantidades muy bajas (Leslie, *et al.*, 1992); por lo tanto el crecimiento de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* en maíz cultivado en regiones templadas presentan un gran riesgo de producir fumonisinas (Desjardins, *et al.*, 1997).

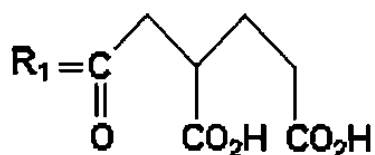
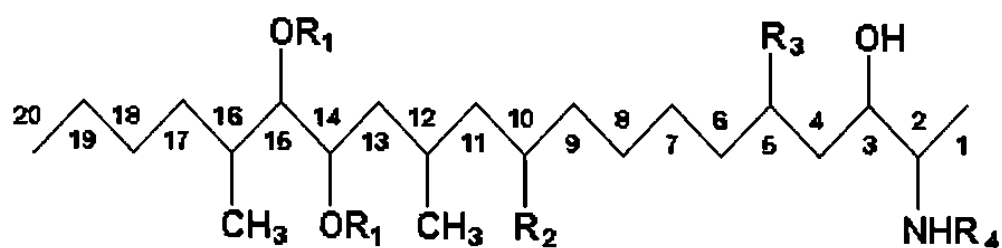
Micotoxinas producidas por *Fusarium moniliforme*

Las especies de *Fusarium* producen metabolitos secundarios que son tóxicos para animales y plantas. Los tricotecenos (desoxinivalenol "DON", nivalenol "NIV", 15-acetil desoxinivalenol "15-ADON", 3-acetildesoxinivalenol "3-ADON", zeralenona "ZEA", toxina T-2 y toxina HT-2 (Yoshizawa, *et al.*, 1990), forman una familia de compuestos sesquiterpenos, son potentes inhibidores de la peptidil transferasa y metabólicamente tóxicos para las células. *F. moniliforme* y especies muy relacionadas de la Sección Liseola, no producen tricotecenos, pero sintetizan diversos metabolitos secundarios, de las cuales las fumonisinas se consideran tóxicos; también se encuentran micotoxinas como el ácido fusárico, las fusarinas, moniliforminas, beauvericina, giberelinas y sus precursores diterpenos; además produce una serie de pigmentos naptoquinonas y azantraquinonas que son fitotóxicos, las cuales no se ha determinado la toxicidad en células de mamíferos (Powell y Plattner, 1995).

En 1970 por primera vez se reportó que cepas de *F. moniliforme* aisladas de maíz de E.U.A. producían moniliforminas (Cole, *et al.*, 1973). Las cepas de *F. moniliforme* aisladas de las semillas de mijo perla en Nigeria, fueron caracterizadas como altas productoras de moniliforminas (Springer, *et al.*, 1974). Posteriormente esta cepa fue identificada como *F. nygamai*, debido a la producción de clamidosporas (Marasas, *et al.*, 1988). Un estudio realizado en Africa sobre la producción de moniliformina por *Fusarium* de la Sección Liseola muestra 58 cepas de *F. moniliforme* tóxicas para patos de una semana de edad, solamente 13 cepas producían moniliformina en cultivos *in vitro*; otras 45 cepas aisladas de maíz de Kenya y de Transkei también fueron tóxicas para este tipo de patos, pero no se detectó la producción de esta toxina. En particular, solo 6 cepas de *F. moniliforme* aisladas de maíz producen moniliformina, pero en cantidades pequeñas. Otros estudios realizados con cepas de *Fusarium* que inducen LEM no producen moniliforminas (Marasas, *et al.*, 1986). Así mismo, se descubrió la fusarina C como un componente natural de maíz contaminado con este hongo (Gelderblom, *et al.*, 1984). Este compuesto mostró ser un potente mutagénico *in vitro* y un inhibidor de macrófagos (Faber y Scott, 1989; Gelderblom, *et al.*, 1986). Debido a que la fusarina C es un metabolito mutagénico de *F. moniliforme*, se realizaron experimentos para determinar su actividad como iniciador del cáncer, pero los resultados obtenidos no apoyan la teoría de que esta toxina obtenida de la cepa MRC 826 sea considerada como hepatocarcinogénica.

Las fumonisinas son derivados hidrocarbonados, altamente funcionalizados, relativamente solubles en solventes polares (agua, metanol, etanol, etc.) e insolubles en solventes no polares (cloroformo, hexano) como mencionan Powell y Plattner, (1995). Se han identificado 6 diferentes

FBs tales como: FA1, FA2, FB1, FB2, FB3 y FB4 (Figura 1); de las cuales solo la FB1 y FB2 son consideradas cuantitativamente en maíz contaminado (Sydenham, *et al.*, 1992; Thiel, *et al.*, 1992), ya que el resto de ellas se presentan en muy bajas concentraciones o en cultivos *in vitro*. La FB1 fue el compuesto más activo extraído de cultivos de maíz con *F. moniliforme* MRC 826, mostró ser un diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico y un 2-amino-12,16-dimetil, 3,5,10,14,15 penta-hidroxicosano con grupos hidroxil-esterificados en el grupo carboxi terminal del ácido en ambos C-14 y C-15. Se han reportado diversas FBs relacionadas a la FB1, son la FB2 (Bezuidenhout, *et al.*, 1988) y FB3 (Cawood, *et al.*, 1991; Plattner, *et al.*, 1992) las cuales son homólogas, la FB2 carece del grupo hidroxilo en C-10 y la FB3 en C-5. Las FBs son resistentes al calor y por eso no pueden destruirse con la cocción, sin embargo, a temperaturas mayores de 150 °C por 1 hr se pueden reducir en un 80 % (Park, *et al.*, 1992; Dutton, 1996). Estas toxinas pueden resistir fermentaciones alcohólicas y procesos de producción. Se han realizado diferentes estudios para la destoxificación, con la finalidad de disminuir los niveles de FBs en los alimentos, la amonización ha mostrado que degrada las aflatoxinas y este método se ha utilizado con las FBs en maíz, pero con poco éxito, también se han realizado tratamientos con hipoclorito de sodio y bases fuertes. Estos estudios indican una reducción de la concentración de FBs, pero falta la determinación de los derivados formados y su actividad biológica (Powell y Plattner, 1995; Dutton, 1996), ya que en la nixtamalización, la cual es un proceso tradicional para la elaboración de las tortillas de maíz, se reducen los niveles de las FBs por hidrólisis y los derivados formados son casi igual de tóxicas que las FBs no modificadas (sp55@cornell.edu).



	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	<u>R₄</u>
Fumonisina B1	OH	OH	H
Fumonisina B2	H	OH	H
Fumonisina B3	OH	H	H
Fumonisina B4	H	H	H
Fumonisina A1	OH	OH	CH ₃ CO
Fumonisina A2	H	OH	CH ₃ CO

Figura 1. Estructura química de las fumonisinas.

Métodos de detección de las fumonisinas

Existen dos métodos de extracción para el análisis de FBs en alimentos y forrajes, ambos involucran extracción con solventes polares (metanol/agua o acetonitrilo/agua), seguido por una limpieza, el primero utiliza columnas de intercambio iónico (SAX) y el segundo mediante columnas de fase reversa C18 Sep-Pak. El uso del método con C18 es más rápido que el método SAX; sin embargo, el método SAX permite la detección de bajos niveles de toxinas. El porcentaje de recuperación de la fumonisina es bueno (>80 %), por lo tanto éste es el método de extracción que se utiliza para las FBs a partir de matrices naturales sin limpieza. Otros problemas que pueden ocurrir son la disponibilidad de los estándares de referencia certificados (Riley, *et al.*, 1993).

La técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es altamente sensible, ya que puede detectar niveles de fumonisinas menores a $\mu\text{g/g}$, esto se logra mediante una derivatización de los grupos amino libres, que son transformados a compuestos capaces de absorber en longitudes de onda de ultravioleta o fluorescentes (Powell, *et al.*, 1995). El método más frecuentemente utilizado para la cuantificación en alimentos y forrajes es la de cromatografía de líquidos, la cual emplea ortoftaldialdehído (OPA) como agente derivatizante (Sydenham, *et al.*, 1992 a; Desjardins, *et al.*, 1994). La cuantificación en HPLC se realiza con mediciones de fluorescencia directamente a la fumonisina derivatizada con OPA. El método de HPLC separa las FBs B1, B2 y B3 en 16 min usando un sistema de solvente isocrático metanol/agua y un procedimiento de extracción que es el intercambio iónico, lograron un límite de detección de 50 ppb (Sydenham, 1992 a). El problema con el derivado OPA-fumonisinina es que no es estable, al igual que el Naftaleno-2-3-dicarboxialdehído o 4 Fluoro-7-nitrobenzofurazano

(Scoot y Laurence, 1992). La detección por HPLC o cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), requiere derivatización, mientras que la cromatografía de gas-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) requiere de hidrólisis para remover el grupo del ácido tricarbóxico y derivatización del grupo amino para aumentar la volatilización. La ventaja del método GC-MS es la combinación de la cuantificación con la confirmación de la estructura (Nelson, *et al.*, 1991; Nelson, *et al.*, 1992). Desafortunadamente este método requiere considerable tiempo y equipo (Riley, *et al.*, 1993).

Los métodos desarrollados recientemente para la cuantificación de FBs son los de anticuerpos monoclonales y policlonales contra fumonisinas (Azcona-Olivera, *et al.*, 1992). Mediante métodos inmunocromatográficos se han usado anticuerpos, con la finalidad de investigar estas toxinas y además algunos metabolitos relacionados a los alimentos, forrajes y tejidos (Shelby, *et al.*, 1994; Usleber, *et al.*, 1994; Chu y Li, 1995). El método de anticuerpos es a base de columnas de afinidad disponibles comercialmente, estas columnas han sido usadas para aislar FBs de los extractos acuosos de maíz (Riley, *et al.*, 1993).

Las fumonisinas pueden ser fácilmente detectadas en niveles de microgramos mediante TLC sobre placas de sílica o en fase reversa C18, pueden ser detectadas por color o reacciones de fluorescencia con la amina primaria libre usando reactivos, tales como *p*-anisaldehído (Cawood, *et al.*, 1991; Desjardins, *et al.*, 1994), ninhidrina (Cawood, *et al.*, 1991) o fluorescamina (Rottinghaus, *et al.*, 1992). Los límites de detección reportados han sido bajos (de 50-100 ng), sin embargo, por la interferencia causada por otros componentes en los extractos de

granos, los niveles de detección se limitan a 1mg/Kg y es requerido que la muestra sea purificada antes del análisis por TLC (Powell y Plattner, 1995).

Toxicidad de las fumonisinas

Algunas de las enfermedades relacionadas con las fumonisinas son leucoencefalomalacia en equinos (LEM). Esta es una enfermedad neurotóxica, que se presenta en todo el mundo y es caracterizada por necrosis de material blanco en uno de los hemisferios del cerebro (Marasas, *et al.*, 1984). En algunos reportes se ha asociado a la LEM con la ingestión de maíz contaminado con *F. moniliforme*; en otros experimentos se alimentaron a caballos con cultivos de maíz que contenían cepas puras de este hongo y desarrollaron esta enfermedad (Kriek, *et al.*, 1981). Experimentos posteriores, muestran que mediante la administración oral de FB1 se induce también LEM y se presentaron lesiones características en el cerebro de los caballos (Kellerman, *et al.*, 1990). También el síndrome edema pulmonar en porcinos es causado por la propagación de *F. moniliforme* en el maíz que se utiliza para su alimentación. Durante 1989, se reportaron numerosos brotes de esta enfermedad generalmente en el centro de E.U.A., en todos los casos estaba implicado el consumo de maíz, lo cual se consideró como el agente causal porque este síndrome se provocaba con alimento contaminado con *F. moniliforme*, se aisló este hongo de todas las muestras que estaban relacionadas a esta enfermedad, mediante cultivos *in vitro* de maíz, los aislados producían FB1 en concentraciones de 900 a 2,350 µg/g y FB2 de 120 a 350 µg/g. Estos datos indican que la FB1 es probablemente la causa de edema pulmonar en porcinos (Nelson, *et al.*, 1993); además la FB1 es fitotóxica la cual produce varios síntomas incluyendo clorosis, necrosis, achaparramiento y defoliación (Abbas, *et al.*, 1993).

Los efectos toxicológicos de *F. moniliforme* en animales han sido estudiados extensivamente, debido a los antecedentes con maíz contaminado con la cepa MRC 826 causante de LEM y el síndrome hepatocarcinogénico en ratas (Jashiedwicz, *et al.*, 1987). Gelderblom y colaboradores (1988) detectaron que la cepa MRC 826 produce FB1 y FB2, la primera de las cuales posee actividad promotora del cáncer, además de hepatitis tóxica como el principal cambio patológico en ratas tratadas. Así mismo, Voss y colaboradores (1995), investigaron el efecto de la concentración de FB1 en ratas y encontraron que esta micotoxina es hepatotóxica en ambos sexos, con nefrosis en machos a dosis superior o igual a 15 mg/Kg y en hembras superior o igual a 50 mg/Kg ; observando alteración en el hígado, riñón, suero y orina de ratas tratadas del perfil esfingolípido, especialmente respecto a la concentración de esfingosina libre y el incremento de la proporción esfinganina. Estos descubrimientos apoyan la hipótesis propuesta por Wang y colaboradores (1991) acerca de que la toxicidad *in vivo* causada por fumonisinas resulta en la alteración del metabolismo de los esfingolípidos. La neurotoxicidad de las FBs en equinos se debe a que su estructura es similar a la esfingosina. Estudios realizados en cultivos de células de hepatocitos primarios de ratas y células epiteliales de riñón de cerdo presentaron que la FB1 inhibe la biosíntesis de esfingosina e incrementa los niveles de esfinganina que es el precursor de la esfingosina; los resultados de los experimentos con microsomas de hígado de rata sugieren que se inhibe específicamente la enzima esfingosina N-acetil transferasa (Norred, *et al.*, 1992 ; Wang, *et al.*, 1991). Aunque los esfingolípidos son abundantes principalmente en tejido neuronal, también son componentes celulares de otros tipos de células eucariotas y están involucrados en la regulación del crecimiento celular y su diferenciación (Merril, 1991); de esta manera la

fumonisina inhibe el metabolismo de los esfingolípidos y puede ser el centro de un amplio rango de efectos fisiológicos, incluyendo la inducción de tumores.

Ocurrencia de las fumonisinas

La ocurrencia natural de las fumonisinas en maíz requiere la necesidad de valorar las concentraciones de estas toxinas a la cual se expone el ser humano y los animales. Existen diversos métodos para cuantificar las FBs en niveles de *ng/g* y poder detectar la contaminación que ocurre naturalmente (Desjardins y Munkvold, 1997). En 1990 Yoshizawa *et al.*, realizaron un estudio comparativo sobre la ocurrencia natural de toxinas de *Fusarium* spp en 47 muestras de maíz y 30 de trigo coleccionadas en 1989 de los países de Linxian, Shangqiu, la provincia de Henan y áreas donde personas de la República de China presentaron cáncer esofágico, considerando zonas de alto y bajo riesgo respectivamente. En muestras de maíz detectaron: DON, 15-ADON, NIV y ZEA, en muestras de trigo: DON, NIV y ZEA. Cuatro años más tarde, los mismos investigadores (Yoshizawa, *et al.*, 1994) trabajaron con las mismas muestras y analizaron la contaminación de fumonisinas. La incidencia de la contaminación de estas toxinas en maíz de Lixian fue 48 % y de Sangqiu 25 % en las muestras contaminadas frecuentemente con tricotecenos.

En muestras asociadas a problemas de salud en humanos y animales la concentración de fumonisinas es generalmente alta, por ejemplo los casos de cáncer esofágico que se presentaron en las áreas rurales de Transkei, se encontraron concentraciones mayores a 140 $\mu\text{g/g}$ de FBs (Rheeder, *et al.*, 1992). El maíz y forrajes a base de este asociado con brotes de varias

enfermedades, se ha documentado que existen niveles de FBs con intervalos de 0.3 a 50 $\mu\text{g/g}$ en Brasil (Sydenham, *et al.*, 1992 b) y en E.U.A. variaron de 37 a 122 $\mu\text{g/g}$ (Wilson, *et al.*, 1990), 1 a 20 $\mu\text{g/g}$ (Thiel, *et al.*, 1991) y 20 a 330 $\mu\text{g/g}$ (Oswieler, *et al.*, 1992). En un examen preliminar de 124 muestras de varios productos comprados en 1990 y 1991 en E.U.A. y sur de Africa, detectaron un 74 % de muestras contaminadas con estas toxinas, pero solo las provenientes de E.U.A. presentaban concentraciones mayores de 1 $\mu\text{g/g}$, mientras que 96 muestras de productos comprados en Suiza en 1991, tuvieron valores menores de 1 $\mu\text{g/g}$ (Nelson, *et al.*, 1993). El análisis de 1,300 muestras de maíz colectado en E.U.A. de 1988 a 1995 indican que la FB1 está presente en un número considerable de muestras, pero los niveles son generalmente bajos, con una máxima de 5 a 38 $\mu\text{g/g}$ y una mínima de 1 a 3 $\mu\text{g/g}$. Las fumonisinas son comunmente detectadas en granos de maíz asintomático, sin embargo, los niveles de FBs en maíz de buena calidad es mucho menor que las muestras de maíz asociadas a problemas de salud. Aunque se han detectado fumonisinas en maíz y en alimentos a base de éste en concentraciones menores a 1 $\mu\text{g/g}$, estos estudios nos indican que existe el consumo de estas toxinas en los alimentos. Se ha reportado que en los países incluyendo Brasil, Italia, Kenya y los E.U.A. pueden estar contaminados ocasionalmente con niveles de FBs de 5 a 10 $\mu\text{g/g}$ o más, en la cual se consideran niveles importantes, debido a que la Asociación Americana del Laboratorio Diagnóstico de Veterinaria ha recomendado concentraciones máximas seguras para especies de ganado, de las cuales en equinos es 5 $\mu\text{g/g}$, porcinos 10 $\mu\text{g/g}$; ganado de engorda y pollos 50 $\mu\text{g/g}$ y en ganado lechero, aún no se especifica (Desjardins y Munkvold, 1997).

Producción de fumonisinas por *Fusarium moniliforme*

Se ha estudiado la producción de fumonisinas *in vitro* (Alberts, *et al.*, 1993) utilizando la cepa *F. moniliforme* MRC 826 a fin de determinar su cinética de síntesis. Los resultados muestran que la producción de FB1 y FB2 en maíz comienza al tercer día de la inoculación y se incrementa rápidamente entre los días 4 y 13, alcanzando su máximo rendimiento después del día 14 [11.2 g/Kg y 5.0 g/Kg] respectivamente. Sin embargo, estudios recientes muestran que cepas de *F. moniliforme* y otras especies de *Fusarium* producen estas micotoxinas. Thiel y colaboradores (1991), trabajaron con las cepas *F. decemcellulare*, *F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. tricinatum*, *F. avenaceum*, *F. semitectum*, *F. camptoceras*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. scirpi*, *F. longipes*, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. reticulatum*, *F. compactum*, *F. lateritium*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, *F. oxysporum*, *F. nygamai* y *F. napiforme*. De las especies analizadas, solamente *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. nygamai* producen fumonisinas. Posteriormente Nelson y colaboradores (1991), investigaron cepas de *F. moniliforme* aisladas de diferentes áreas geográficas y encontraron una considerable variación en las concentraciones de fumonisinas producidas por cepas de este hongo dependiendo de la fuente, pero en general, se observó poca variación entre cepas obtenidas de la misma área. En España (Sala, *et al.*, 1994), se realizó un estudio similar mediante el análisis de 147 cepas de *Fusarium spp* aisladas de cereales de Cataluña, la especie predominante en estos granos fue *F. moniliforme* (87 %), pero también se encontraron las especies de *F. sporotrichoides*, *F. heterosporum*, *F. tricinatum*, *F. poae*, *F. anthophilum* y *F. subglutinans*. Así mismo, se determinó la habilidad *in vitro* para producir fumonisinas en medios de cultivo a base de maíz a 133 cepas de *Fusarium* de la sección *Liseola*; los resultados indican que un 33.8 % producían FB1 y un 18 % FB2, se

encontró a *F. moniliforme* como la especie más prominente en la producción de fumonisinas. Además, Tseng y colaboradores (1995), trabajaron con cepas de *F. moniliforme* aisladas de Taiwan, encontraron que el 66 % de las cepas presentaba la capacidad de producir FBs.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de *F. moniliforme* en maíz cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León y establecer el potencial toxigénico de las cepas aisladas mediante la producción *in vitro* de fumonisinas.

Objetivos particulares

Implementar modificaciones adaptadas a las condiciones de trabajo de la institución en el interés de optimizar los recursos económicos:

1. Medio de cultivo PCNB selectivo para *Fusarium* spp.
2. Técnicas de producción *in vitro* y extracción de fumonisinas.
3. Técnica de cromatografía en capa fina para la detección y estimación de la concentración de fumonisina B1.

MATERIAL Y METODOS

Diseño de muestreo

Se realizó un muestreo al azar de mazorcas de maíz durante el ciclo primavera-verano/1997 en el estado de Nuevo León. Entre las 3 áreas de cultivo incluyeron para el distrito de Apodaca, 3 localidades en el municipio de Escobedo, en el distrito de Montemorelos se obtuvieron del municipio de Linares, muestras de 2 localidades y en el distrito de Galeana, fueron 7 localidades en Dr. Arroyo y 4 en Galeana las estudiadas para tal propósito. En todos los casos fueron colectadas de 2 a 10 unidades de muestra sin aparente contaminación fúngica (Tabla 1).

Reactivos

El estándar de fumonisina B1 (> 95 % puro), fue proporcionado por el Dr. Ronald D. Plattner del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en Peoria, Illinois, E.U.A. y la cepa *F. moniliforme* Mex-34 fue proporcionada por el departamento mencionado anteriormente. Se utilizaron placas de sílica gel 60 A 20 x 10 cm (Watman). Solventes: metanol, acetonitrilo, cloroformo y ácidos: acético y H₂SO₄ (grado analítico). *p*-anisaldehído (cat. A-0519 Sigma), papel filtro # 4 de 12.5 cm (Watman), cajas de Petri desechables 100 x 15 mm.

Tabla 1. Distribución de las muestras de maíz colectadas en primavera/verano/1997 en localidades del estado de Nuevo León

Distrito*	Municipio	Localidad	Variedad	No. Muestra		
1) Montemorelos	1) Linares	1) Cerro Prieto	1) Criollo	M1, M2, M3		
		2) Loma Alta	1) Criollo	M4		
2) Galeana	2) Dr Arroyo	3) Cerrito del Aire	1) Criollo	M5, M6		
		4) Puerto de Dolores	1) Criollo	M7, M8		
		5) Puerto de Aguilar	1) Criollo	M9		
		6) Ej. Guadalupe y Sn. Joaquín	1) Criollo	M10		
		7) Ej. Presita de Ruedas	1) Criollo	M11		
		8) Ej. San Juan del Palmar	1) Criollo	M12		
		9) El Charquillo	1) Criollo	M13		
		3) Galeana	10) Ej. El Cuije	1) Criollo	M14	
			11) Ej. Puerto México	1) Criollo	M15	
	11) Ej. Puerto México		2) Híbrido V550	M16		
	12) Rancho La Gloria		3) H791	M17		
	16) Ej. La Lagunita		1) Criollo	M21		
	3) Apodaca		4) Escobedo	13) Agua Fría	4) Pinto amarillo	M18
				14) Ej. San Nicolás	5) Blanco purísima	M19
		15) Santa Rosa		6) NLVS-2	M20	

M = Cada una de las muestras se obtuvo de diferente campo agrícola.

* = Distritos según la clasificación de la SAGAR.

Medios de cultivo

Agar pentacloro-nitrobenceno (PCNB)

Peptona, 15.0 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; pentacloro-nitrobenceno (95 % grado técnico), 0.8 g; agar, 20.0 g; agua destilada, 1000 ml. Realizar una homogenización, se ajusta el pH de 5.5 a 6.5. Se esteriliza en autoclave, después de enfriar, se adiciona 1.0 g de sulfato de estreptomicina.

Agar Jugo V-8

Jugo V-8 filtrado, 200 ml; agar, 20 g; agua destilada, 800 ml. Se ajusta el pH de 4.5 a 5.5 y se esteriliza en autoclave.

Agar sintético nährstoffärmer (SNA)

KH_2PO_4 , 1.0 g; KNO_3 , 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; KCl, 0.5 g; glucosa, 0.2 g; sacarosa, 0.2 g; agar, 20 g; agua destilada, 1000 ml. Se ajusta el pH de 4.5 a 5.5 y se esteriliza en autoclave.

Aislamiento de *Fusarium* spp

Las mazorcas colectadas en las distintas localidades muestreadas, fueron colocadas en bolsas de papel rotuladas y transportadas al laboratorio para su debido procesamiento o almacenamiento a temperatura ambiente; posteriormente, las muestras se homogenizaron y se seleccionaron 12 granos intactos, sin daño sobre la cutícula y/o el pedicelo. Estos granos se depositaron en cajas Petri, para luego adicionarles una solución desinfectante NaClO al 0.5 % que se dejó actuar por 1 min, asegurándose de que toda la superficie estuviera húmeda. Asépticamente con unas pinzas, se retiraron los granos y se pasaron a una segunda caja Petri donde se adicionó agua destilada estéril hasta cubrirlos; se agitó lentamente y se retiró el exceso de agua. Esta

operación (lavado) se efectuó 3 veces y al terminar se colocaron 4 granos sobre papel secante estéril, los que posteriormente fueron incluidos sobre la superficie de una placa conteniendo el medio de cultivo PCNB selectivo para *Fusarium* spp para luego incubar las cajas a 28 ± 2 °C por 7 días y realizar observaciones cada 24 hrs de las características coloniales de las cepas obtenidas a partir de los granos de maíz. Las cepas sospechosas se resembraron en los medios SNA y PDA para su identificación según Booth (1971), Nelson *et al.*, (1983) y Seifert (1996).

Identificación de *Fusarium moniliforme*

Entre las características utilizadas para llegar a identificar las cepas seleccionadas como *F. moniliforme*, se utilizaron las siguientes determinaciones:

Características macroscópicas sobre PDA

1. Diámetro de crecimiento
2. Micelio aéreo
3. Color del agar al reverso de la colonia

Características microscópicas sobre SNA

Al lado de un mechero Bunsen, se cubrió la caja Petri con un plástico adherible para evitar el riesgo de exposición a las conidias, después se procedió a realizar con el objetivo de 40 X directamente al microscopio a través de la caja Petri las siguientes observaciones:

1. Macroconidia del esporodoquio
2. Microconidia del micelio aéreo

3. Abundancia relativa de las microconidias en el micelio aéreo
4. Microconidias en cadenas
5. La forma de la microconidia
6. Conidioforos en el micelio aéreo
7. Clamidosporas

Producción *in vitro* de las fumonisinas

Se prepararon cultivos de las cepas aisladas en PCNB, mediante resiembras en cajas Petri con agar jugo V-8 (Desjardins, *et al.*,1994), se incubaron 2 semanas a 25 °C, sobre el cultivo se adicionaron 5 ml de agua destilada estéril, se dejó reposar 2 ó 3 min, después con una jeringa estéril se realizó la extracción del sobrenadante y se depositó en tubos de 13 x 100, esto con la finalidad de obtener una suspensión de 1×10^7 conidias/ml; posteriormente se procedió a realizar el ajuste del número de células en cada tubo mediante diluciones con la previa cuenta de conidias en la cámara de Neubauer, la suspensión de conidias se introduce a la cámara de recuento, después de que ha sedimentado, se observó en magnificación 10 X para asegurarse de una distribución homogénea; luego en 40 X se contaron las conidias que se encontraron en los cuatro cuadrantes grandes (Lynch, *et al.*,1985):

El cálculo de número de conidias se efectuó de la siguiente manera:

$$\text{Conidias/ mm}^3 = \frac{C \times 10}{4}$$

4

donde:

C = Número de conidias en 4 cuadrantes

10 = Factor que transforma la superficie del mm² en el volumen en mm³

4 = Número de cuadrantes que se contaron

La producción *in vitro* de fumonisinas se realizó en el medio de cultivo sólido a base de maíz, el cual se formuló con 50 g de maíz blanco quebrado (concentración de toxina FB1 no detectable) y 11 ml de agua destilada. Estos ingredientes se agregaron a frascos o matraces de Erlenmeyer (250 ml), luego se esterilizaron, al enfriarse se adicionaron 11 ml de agua estéril a cada matraz y se inocularon por triplicado con 1 ml de una suspensión de 10⁷ conidias. Todos los matraces se incubaron a 25 ± 2 °C por 28 días, después de transcurrido este tiempo se procedió a secar el material del cultivo (MC) a 60 °C por 3 días, luego se refrigeraron hasta su extracción (Desjardins, *et al.*, 1994; Ross, *et al.*, 1990), simultáneamente se procesó como control la cepa *F moniliforme* Mex-34 productora de fumonisinas.

Extracción de la fumonisina B1

Apartir de los 50 g del MC obtenidos en la producción *in vitro*, se pesaron 10 g de MC y se colocaron dentro de un frasco de 50 ml con 20 ml de metanol-agua (3:1), se dejó reposar de 18 a 24 hrs en refrigeración con agitación ocasional, después se procedió a filtrar con papel filtro Watman # 4 en viales de vidrio de 20 ml, los extractos se guardaron en refrigeración y se les realizó la detección de la fumonisina B1 antes de 24 hrs (AOAC, 1995).

Preparación del estandar de fumonisina B1

Los 11 mg/ml de FB1 que fueron proporcionados se reconstituyeron con 5 ml de ACN/H₂O (1:1), equivalente a 2.2 mg/ml, mediante aforación se obtuvo el estándar de 1 mg/ml. (450 µl del estándar y 550 µl de ACN/H₂O en proporción 1:1), posteriormente se realizaron 4 diluciones seriadas 1:1 (Tabla 2)

Tabla 2. Concentración de los estándares de fumonisina B1

Estándar	Diluciones	Concentración de FB1	
		mg/ml.	ppm
1	1:1	1.000	1000
2	1:2	0.500	500
3	1:4	0.250	250
4	1:8	0.125	125
5	1:16	0.0625	62.5

Determinación de las fumonisinas

Las fumonisinas pueden ser detectadas en niveles de microgramos (μg) por medio de TLC. Primeramente se realizó la activación de las placas de sílica gel 60 A 20 x 10 cm, a 115 °C/1 hr, se dejaron enfriar en un desecador, posteriormente se aplicaron sobre las placas 10 μl de cada extracto al igual que los estándares (62.5, 125, 250, 500, 1000 ppm). Las muestras se colocaron con micropipeta desechable Eppendorf, la placa se introdujo en el tanque de desarrollo con el eluente previamente preparado, cloroformo:metanol:ácido acético (6:4:1), después de la elución, se dejó evaporar el solvente bajo la campana de extracción, las placas se rociaron con una solución de *p*-anisaldehído 0.5 % en metanol:ácido sulfúrico:ácido acético (17:1:2), sin dejar evaporar, se procedió a calentar 130 °C por 5 a 10 min para su identificación y cuantificación por comparación visual con los estándares, en base a la intensidad de la mancha (Plattner, *et al.*, 1990).

El cálculo de ppm del extracto del material de cultivo con *F. moniliforme* se efectuó de la siguiente manera:

$$\text{ppm} = \frac{\text{ppm del estándar}}{\text{g de muestra}} \times \text{VE}$$

donde:

ppm del estándar = concentración del estándar a la cual corresponde la mancha de la muestra problema, (Tabla 2).

g de muestra = g de material de cultivo con *F. moniliforme*

VE = volumen del solvente de extracción

Diseño estadístico

Toda la información fue analizada bajo un paquete estadístico Statgraphics versión 4.0. Los datos cuantitativos sobre la producción *in vitro* de las fumonisinas se sometieron a un análisis de varianza simple de acuerdo con Zar, (1996). Los valores promedios de cada cepa de *Fusarium* spp fueron comparados bajo la aplicación de pruebas de rango múltiple de Tukey (Zar, 1996).

El diseño experimental consistió de bolques incompletos aleatorios de factores municipios, distritos, variedades y localidades con 3 repeticiones para cada uno.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de *Fusarium* spp

Se llevó a cabo el aislamiento de cepas de *Fusarium* spp en el medio selectivo PCNB, en cada caja Petri fueron colocados 4 granos de cada muestra de maíz, esto se realizó por triplicado, el número de colonias sospechosas se presentan en la tabla 3. Las cepas aisladas demuestran una gran variación desde 8 hasta 100 %. Esquemáticamente en la figura 2 se observa que en algunas muestras se logró el aislamiento en un 100 % (12 granos) de los granos analizados, mientras que en otras muestras solo se logró un 18 % (1 grano); de las cuales fueron seleccionadas mínimo 2 colonias de cada muestra para su respectiva identificación. En el caso de las muestras que contenían colonias fúngicas en el 100 % de los granos, solo se consideraron diferencias macroscópicas (aspecto y color de la colonia), se observaron 3 diferentes morfologías coloniales, las cuales fueron sospechosas para *Fusarium* spp y otros hongos como por ejemplo *Acremonium* spp y *Aspergillus* spp, este último se encontró solo en la muestra 19.

En la figura 3 se observa el desarrollo de colonias con coloración durazno y de aspecto pulverulento, el cual son sospechosas de *Fusarium* spp, a los 4 días de incubación en PCNB se logra observar el crecimiento que inicia a partir del pedicelo, ya que la cutícula del grano de maíz fue desinfectada y se obtiene el hongo que está presente en los granos asintomáticos. Según los resultados que se muestran en la tabla 3 y figuras 3, 4 y 5, podemos considerar que el medio selectivo permitió el aislamiento de *Fusarium* spp de manera satisfactoria, ya que se le realizaron modificaciones a la fórmula del medio PCNB, éstas consistieron en utilizar 0.8 g de PCNB grado

técnico al 95 % en lugar de 1.0 g PCNB (Terroclor, producto comercial al 75 %) y la eliminación del sulfato de neomicina de acuerdo con Nelson *et al.*, (1983).

La importancia de seleccionar los granos intactos se debe a que pueden presentar daño físico ocasionado en la cosecha, secado o transporte y presentarse crecimiento fúngico. Las concentraciones del NaClO pueden variar, pero hay que tomar en cuenta que se desea eliminar solamente los contaminantes superficiales y no el micelio que se encuentra invadiendo el pericarpio y que puede ser eliminado por un tratamiento de desinfección muy severa. Al considerar lo anterior, cabe mencionar que cuando no se logra aislar ningún hongo toxigénico no significa que el grano esté libre de micotoxinas, ya que los hongos pueden haber desaparecido, no así sus metabolitos como indica también Moreno (1988).

Tabla 3. Aislamiento en PCNB de cepas fúngicas en maíz cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León

Clave de Identificación	%	Colonias sospechosas						
		<i>Fusarium</i> spp				Otros ¹		
		I	II	III	Total	I	II	III
L1M1	25	1	-	2	3	-	-	-
L1M2	100	4	4	4	12	-	-	-
L1M3	33	1	2	1	4	-	1	-
L2M4	75	3	4	2	9	-	-	-
L3M5	8	-	1	-	1	1	-	1
L3M6	100	4	4	4	12	-	-	-
L4M7	92	4	4	3	11	-	-	1
L4M8	33	2	2	-	4	-	-	-
L5M9	75	4	4	1	9	-	-	1
L6M10	100	4	4	4	12	-	-	-
L7M11	25	1	-	2	3	1	4	1
L8M12	58	2	1	4	7	-	-	-
L9M13	17	2	-	-	2	1	3	2
L10M14	100	4	4	4	12	-	-	-
L11M15	92	4	3	4	11	1	-	1
L11M16	67	3	2	3	8	1	2	-
L12M17	67	4	2	2	8	-	1	-
L13M18	17	1	-	1	2	-	1	-
L14M19	42	1	3	1	5	2 ²	2 ²	2 ²
L15M20	58	3	3	1	7	-	1	3
L16M21	0	-	-	-	0	2	-	1

I, II y III = Repeticiones.

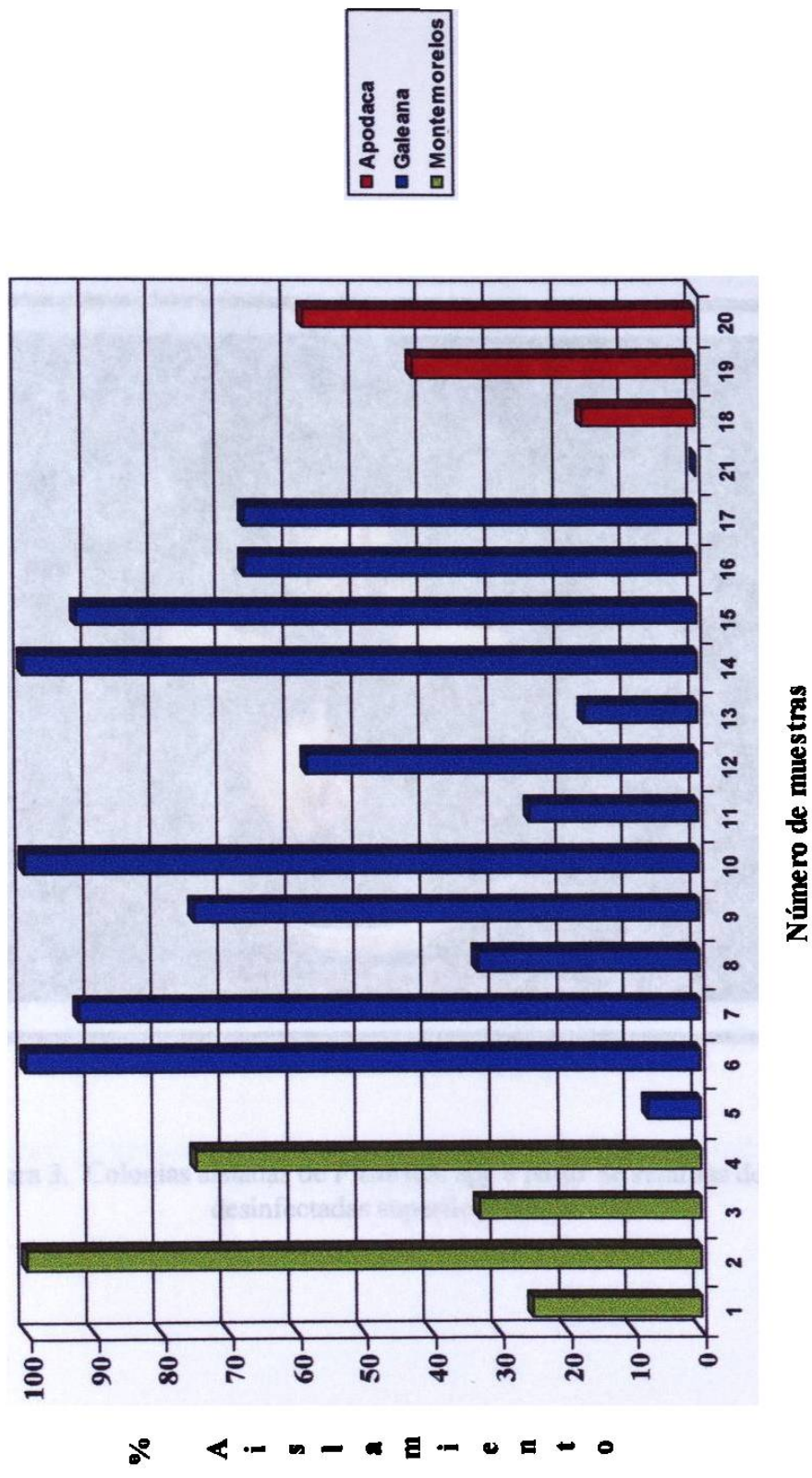
% = Porcentaje de granos con aislamiento de *Fusarium* spp.

1 = Colonias de *Aspergillus* spp y *Acremonium* spp.

2 = Colonias de *Aspergillus* spp.

n = 12.

Figura 2. Porcentaje del aislamiento de *Fusarium* spp en granos de maíz cultivado en los distritos de cultivo del estado de Nuevo León



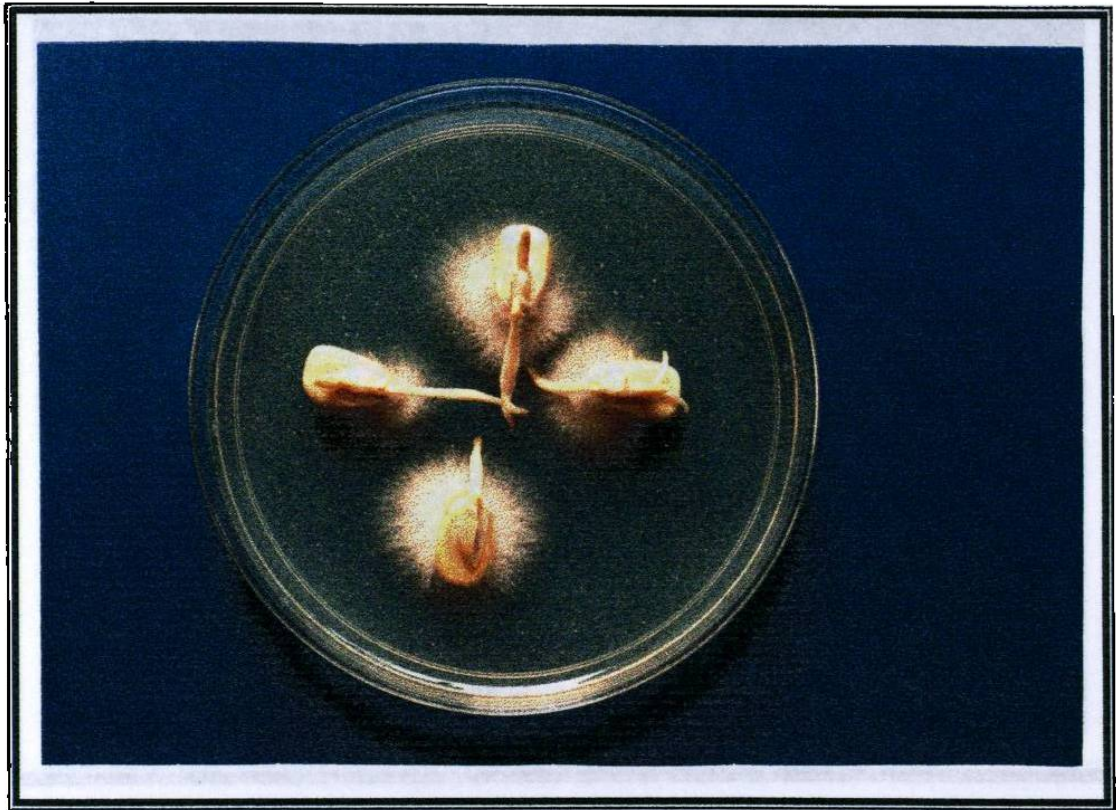


Figura 3. Colonias aisladas de *Fusarium* spp a partir de semillas de maíz desinfectadas superficialmente



Figura 4. Colonias aisladas de *Fusarium* spp a partir de semillas de maíz desinfectadas superficialmente

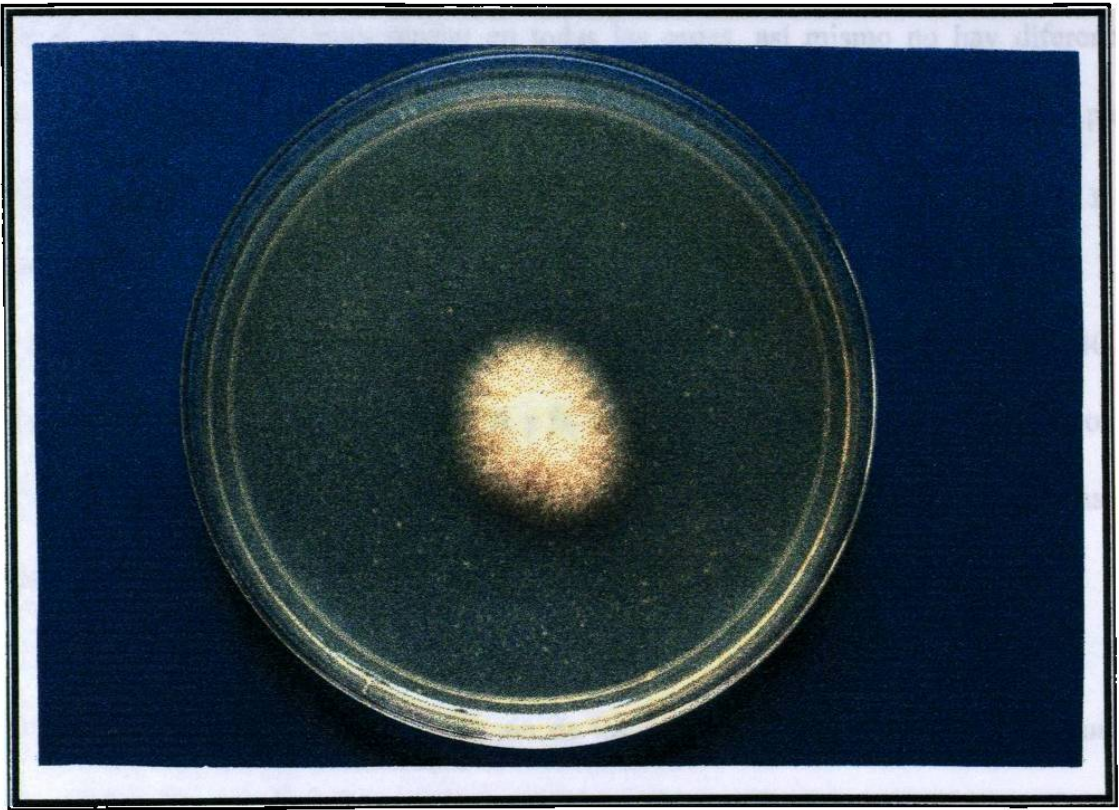


Figura 5. Colonias de *Fusarium moniliforme* Mex-34 utilizadas como control en este estudio

Identificación de *Fusarium moniliforme*

La identificación se llevó a cabo según Nelson *et al.*, (1983) y Booth (1973). Los resultados sobre las características en PDA y SNA de las cepas aisladas de maíz en el medio selectivo PCNB se presentan en la tabla 4, en las cuales podemos observar que la coloración presente en el medio PDA fue muy similar en todas las cepas, así mismo no hay diferencia significativa en el diámetro de la colonia, por lo tanto todas pertenecen a la Sección Liseola, pero las observaciones al microscopio fueron determinantes para distinguir entre *F. moniliforme* y *F. proliferatum*. En la figura 6 se observan las características microscópicas de *F. moniliforme*. Las características de las microconidias en forma de cadena sobre el micelio aéreo 10 X y 40 X respectivamente, se presentan en las figuras 6 A y B, indicando además la caracterización por la formación de monofialides (figura 6 C). La identificación de microconidias (40 X) en suspensión utilizadas para la formación de inóculos en producción *in vitro* se muestra en la figura 6 D.

En la tabla 5 se encuentra la distribución de las cepas de *Fusarium spp*, en las cuales fueron seleccionadas 24 cepas para la producción *in vitro*, 20 identificadas como *F. moniliforme* y 4 *F. proliferatum*, así mismo los resultados nos indica que las cepas de *F. proliferatum* se encuentran en el distrito de Galeana, mientras que *F. moniliforme* está distribuido en los 3 distritos de Nuevo León que fueron analizados. De igual manera en la figura 7 se pone en evidencia la gran variabilidad a el porcentaje de la distribución de las cepas de *Fusarium spp*, encontrándose el mayor porcentaje de cepas en el distrito de Galeana (67 %), el área cosechada en Apodaca, Montemorelos y Galeana fue 2.7, 16.9 y 277.19 HA respectivamente; en el distrito de Anáhuac no se realizó siembra del cultivo de maíz, según datos obtenidos por la SAGAR (1997).

De la tabla 6 podemos constatar que en 20 de 21 (95 %) de las muestras analizadas presentaba *Fusarium* spp, de las cuales en 18 de 21 (86 %) fueron *F. moniliforme* y 4 de 21 (19 %) *F. proliferatum*; de la misma manera en la figura 8 se presenta el porcentaje del aislamiento de *Fusarium* spp en las muestras de maíz del estado de Nuevo León correspondiente al 95 %, de las cuales el 86 % fue *F. moniforme* y el 19 % *F. proliferatum*.

Existen características generales de *Fusarium* spp, entre las cuales pueden producir 3 tipos de esporas: macroconidias, microconidias y clamidosporas; conidioforos en forma de monofiálide (una sola abertura) o polifialide (2 ó más aberturas). Las microconidias pueden presentarse en forma de cadenas sobre ambas fiálides. Además, se clasifican características primarias para la separación de especie en la taxonomía de *Fusarium* spp: la morfología de la macroconidia, la presencia o ausencia de microconidias y clamidosporas así como la morfología de los conidioforos. También se presentan características secundarias que pueden ser utilizadas para describir especies, donde los cultivos están creciendo bajo condiciones estándar de luz, temperatura y sustratos, los criterios son: morfología y pigmentación de la colonia como también indica Nelson *et al.*, (1994); la coloración que se puede presentar es altamente variable entre las especies, pero en algunas es un punto crítico, generalmente el color púrpura al reverso indica que son especies de la Sección Liseola, según Booth (1971) clasifica dentro de esta Sección a *F. moniliforme* Sheldon y *F. moniliforme* var. *subglutinans*, mientras que Nelson *et al.*, (1983) la clasifica en *F. moniliforme* Sheldon, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. anthophilum*. Las características que son determinantes en *F. moniliforme* son la presencia de monifiálides con microconidias en forma de cadenas, según las claves de Nelson *et al.*, (1983) hasta este punto se

puede confundir con *F. solani*, pero éste forma abundantes macroconidias y clamidosporas. En cuanto a la presencia de monofiálides y polifiálides están incluidos *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. antrophilum*, de las cuales solo se puede confundir con *F. proliferatum*, pero éste presenta polifiálides, además de las características de *F. moniliforme*.

Tabla 4 . Características de las cepas fúngicas aisladas en diversas localidades del estado de Nuevo León

Cepa ³	Diámetro ⁴		Microscópicas ⁵ .
	(cm)	Coloración ⁴	
L1M1-C1	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L1M2-C2	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L1M2-C3	7.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L1M3-C4	7.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L2M4-C5	7.5	Lila	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L3M5-C6	8.5	Naranja	Monofiálides, polifiálides y microconidias en cadena ²
L3M6-C7	7.0	Crema	Monofiálides, polifiálides y microconidias en cadena ²
L3M6-C8	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L4M7-C9	8.5	Lila	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L4M7-C10	7.0	Crema	Monofiálides, polifiálides y microconidias en cadena ²
L4M8-C11	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L5M9-C12	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L6M10-C13	7.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L7M11-C14	8.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L8M12-C15	8.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L9M13-C16	7.0	Lila	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L10M14-C17	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L11M15-C18	8.0	Lila	Monofiálides, polifiálides y microconidias en cadena ²
L11M16-C19	7.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L11M16-C20	7.5	Lila	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L12M17-C21	8.0	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L13M18-C22	7.5	Lila	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L14M19-C23	7.5	Lila	Monifiálides y microconidias en cadena ¹
L15M20-C24	7.5	Púrpura	Monifiálides y microconidias en cadena ¹

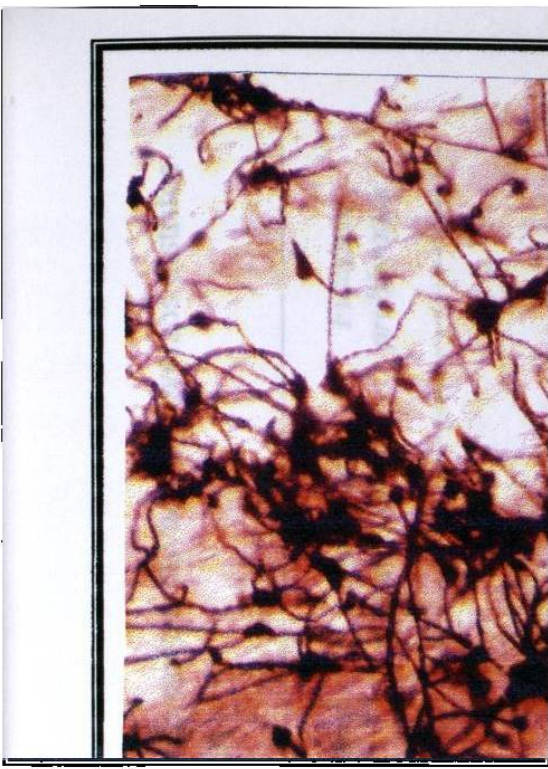
1. *Fusarium moniliforme*.

2. *Fusarium proliferatum*.

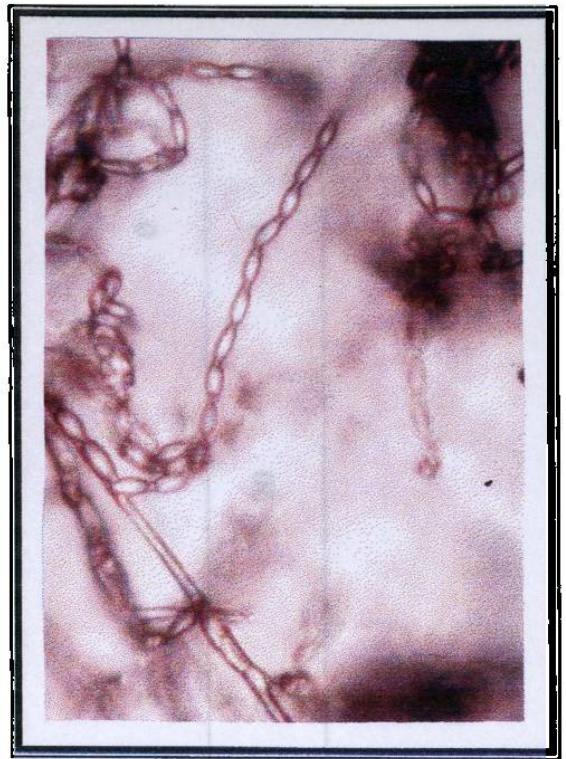
3. L: localidad, M: muestra obtenida en diferente campo agrícola, C: cepa

4. Características en PDA.

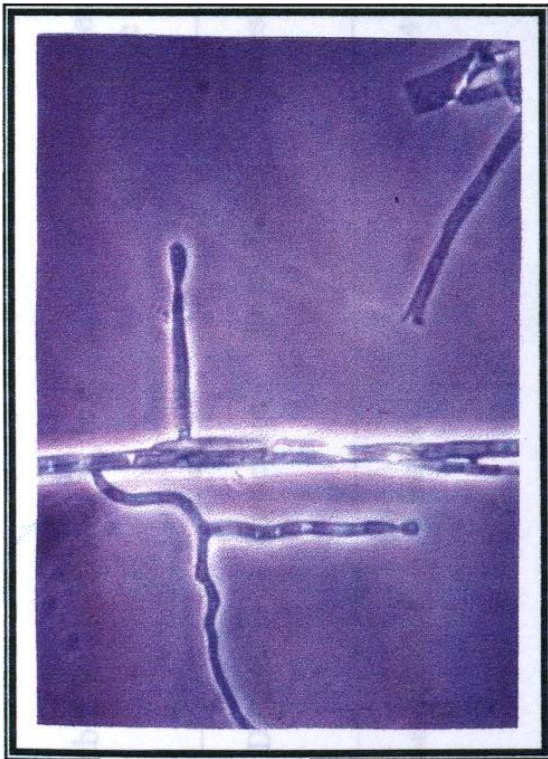
5. Características en SNA.



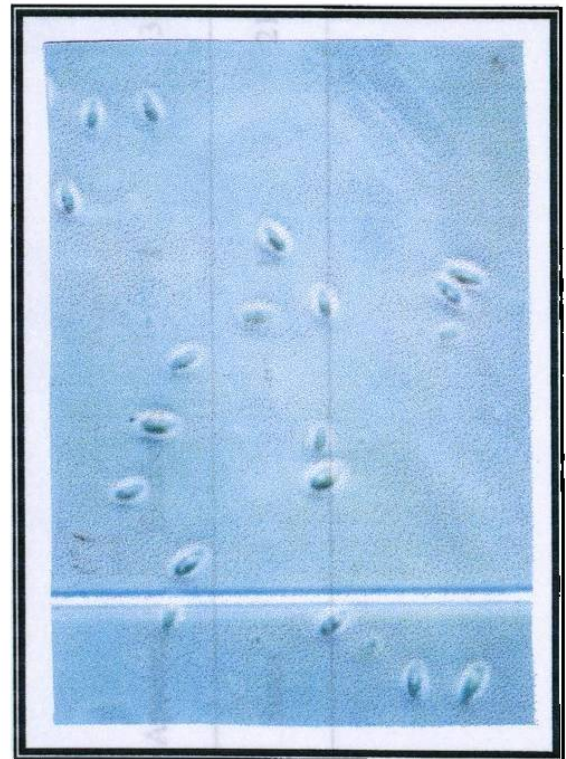
A



B



C



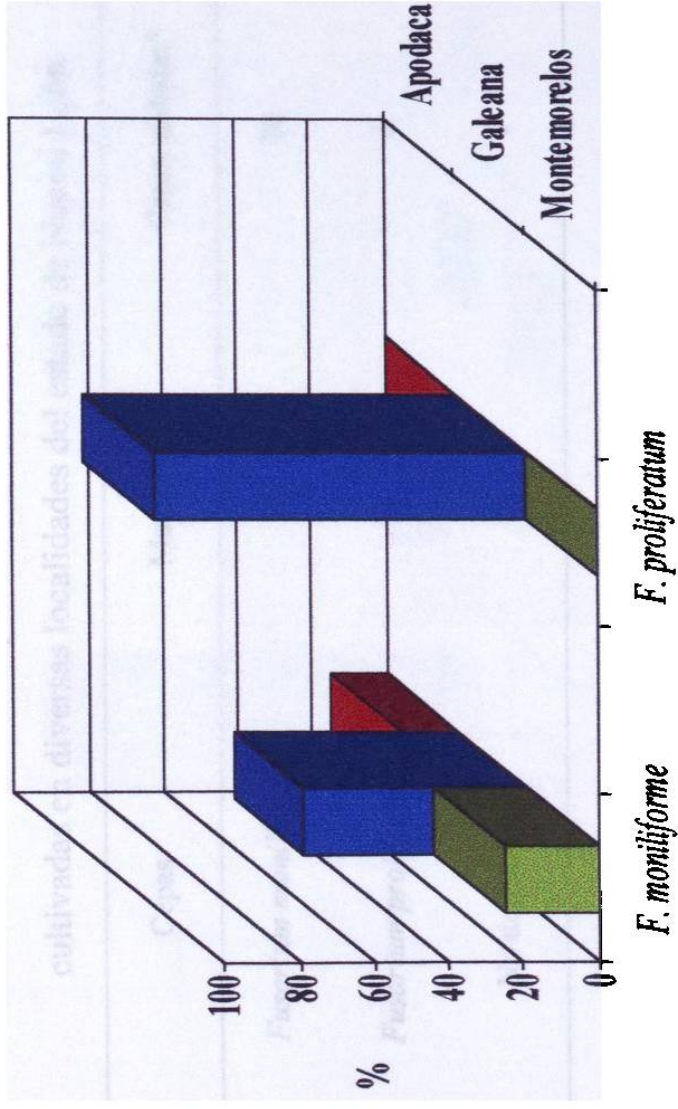
D

Figura 6. Características morfológicas de *Fusarium moniliforme*: A) Microconidias en cadena 10 X, B) Microconidias en cadena 40 X, C) Monofiálide 40 X, D) Microconidias 40 X

Tabla 5. Distribución de cepas de *Fusarium* spp en muestras de maíz cultivado en diversos distritos del estado de Nuevo León

Distritos	Municipios	Localidades	Muestras	Cepas	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
Montemorelos	Linares	2	4	5	5	0
Galeana	Dr. Arroyo	7	9	11	8	3
	Galeana	4	5	5	4	1
Apodaca	Escobedo	3	3	3	3	0
Suma		16	21	24	20	4

Figura 7. Porcentaje del aislamiento de cepas de *Fusarium* spp en maíz cultivado en los distritos del estado de Nuevo León



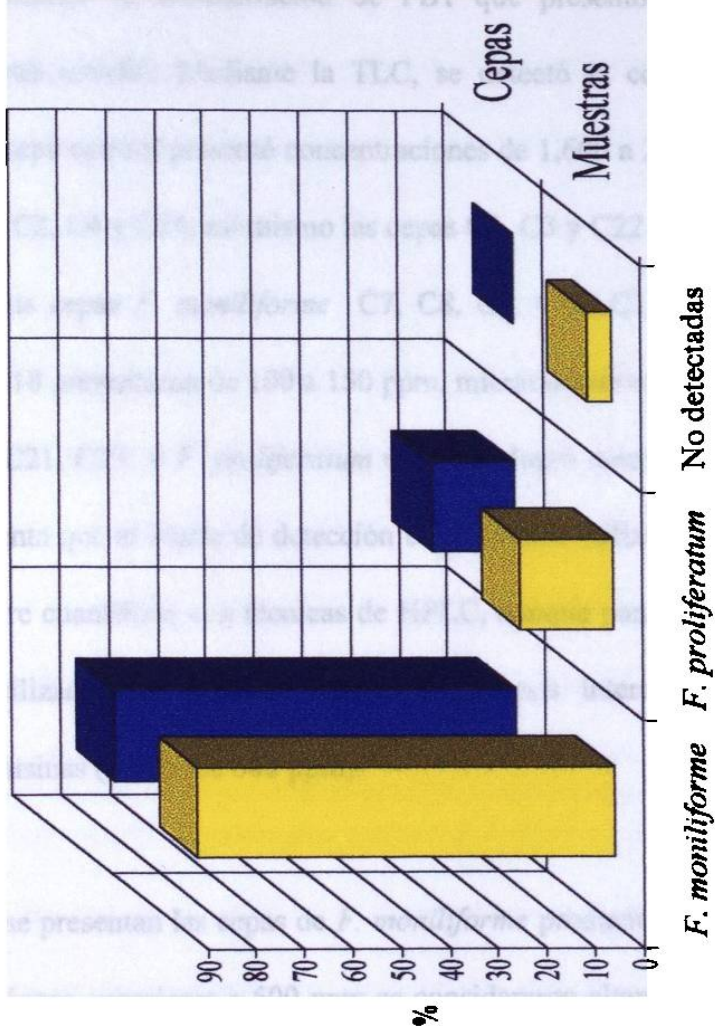
Cepas de *Fusarium* spp

Tabla 6. Detección de cepas de *Fusarium* spp en muestras de maíz cultivadas en diversas localidades del estado de Nuevo León

Cepas	Muestras	Cepas aisladas*
<i>Fusarium moniliforme</i>	18	20
<i>Fusarium proliferatum</i>	4	4
No detectadas	01	-

* Aislamiento en PCNB

Figura 8. Porcentaje del aislamiento de *Fusarium* spp en muestras de maíz cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León



Cepas de *Fusarium* spp

Producción *in vitro* de fumonisinas

Las cepas de *Fusarium* spp (20 de *F. moniliforme* y 4 de *F. proliferatum*) fueron evaluadas para la producción *in vitro* de fumonisinas, esto fue en medios de cultivo a base de maíz. En la tabla 7 se puede observar la concentración de FB1 que presentó cada una de las cepas seleccionadas para este estudio. Mediante la TLC, se detectó la concentración de FB1 por estimación visual, la cepa control presentó concentraciones de 1,600 a 2,400 ppm al igual que las cepas *F. moniliforme* C2, C4 y C24, así mismo las cepas C1, C3 y C22 se les detectó 800 a 1,200 ppm. Sin embargo, las cepas *F. moniliforme* C7, C8, C9, C12, C13, C14, C15 y C17 y *F. proliferatum* C10 y C18 presentaron de 100 a 150 ppm, mientras que en las cepas *F. moniliforme* C5, C11, C19, C20, C21, C23 y *F. proliferatum* C6 no se logró detectar la concentración de la FB1, tomando en cuenta que el límite de detección en la técnica utilizada fue inferior a 50 ppm; por lo tanto, se sugiere cuantificar con técnicas de HPLC, aunque para cumplir nuestro objetivo no fue necesario utilizar estas técnicas, debido a que nos interesan las cepas altamente productoras de fumonisinas (mayor de 500 ppm).

En la tabla 8 se presentan las cepas de *F. moniliforme* productoras de fumonisinas, en las cuales las concentraciones superiores a 500 ppm se consideraron altamente productoras de FB1, las de 50 a 500 ppm cepas con producción intermedia y las de inferior a 50 ppm de baja producción. Así mismo en la figura 9 nos muestra las cepas productoras de FB1, donde se puede observar que en los 3 distritos del estado de Nuevo León, se logró el aislamiento de cepas altamente productoras, además en el distrito de Galeana fue donde se realizó aislamiento en 10 localidades, pero la mayoría fueron cepas productoras intermedias o de baja producción; las cepas

aisladas en Montemorelos que fueron altamente productoras pertenecen a la misma localidad (1), a diferencia de la localidad 2 que fueron de baja producción. De igual manera, en la tabla 9 observamos que las cepas de *F. moniliforme* están distribuidas en las 3 clasificaciones de concentración, pero ninguna de las cepas de *F. proliferatum* fueron altamente productoras. Así mismo la figura 10 nos muestra que algunas cepas de *F. moniliforme* poseen la capacidad de producir FB1 en altas concentraciones y otras en baja concentración, considerando también importante las de producción intermedia.

En la tabla 10 se observa el análisis de varianza simple de la concentración de fumonisinas de los distritos de cultivo de Nuevo León, los datos indican que existe diferencia significativa entre ellos, ya que el distrito 1 (Montemorelos), las cepas presentaron mayor capacidad para producir fumonisinas; por el contrario en el distrito 2 (Galeana), las cepas tenían menor capacidad para producir dichas toxinas, aunque se encontró la presencia de una cepa altamente productora; estadísticamente no se detectaron efectos significativos, basándose en las clasificaciones de concentración los datos nos marcan que existen valores superiores a 50 ppm, por lo tanto, se considera que los distritos 1 y 3 poseen cepas con potencial para producir FB1 y el distrito 2 presenta un potencial intermedio. De la misma manera, en la tabla 11 el análisis de varianza de los municipios analizados nos indica que existen 2 grupos homogéneos, los municipios 2 y 3 corresponden al mismo distrito, por lo tanto no hay diferencia significativa entre las localidades correspondientes al mismo distrito. Aunque los municipios 1 y 4 pertenecen a distritos diferentes, no se encontró diferencia, ya que en ambos se aislaron cepas toxigénicas. Así mismo, en la tabla 12 se presenta el análisis de varianza entre las localidades y encontramos 3

grupos homogéneos, en el cual están las altamente productoras (grupo c), las de producción intermedia (grupo b) y las de producción baja (grupo a); al asignarle en la tabla el distrito correspondiente a cada localidad, se observa que las cepas con potencial toxigénico (grupo c) están presentes en los 3 distritos estudiados. Sin embargo, el análisis de varianza de las variedades de maíz se muestran en la tabla 13, se encontraron tres grupos homogéneos en donde se aislaron cepas de producción baja (grupo a) en las variedades 1, 2, 3 y 5, mientras que la variedad 4 presentó cepas de producción intermedia (grupo a b) y en la variedad 6 (grupo b) cepas de producción alta. Aunque las cepas toxigénicas se presentaron en las variedades 1, 4 y 6, estadísticamente no hay diferencia en la variedad 1, pero en las 4 y 6, existe diferencia con respecto al resto de las variedades.

Tabla 7. Producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium* spp cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León

Distrito	Municipio	Cepas de <i>Fusarium</i> spp*	Concentración de FB1 [ppm]
Montemorelos	Linares	L1M1-C1	800 - 1,200
		L1M2-C2	1,600 - 2,400
		L1M2-C3	800 - 1,200
		L1M3-C4	1,600 - 2,400
		L2M4-C5	ND
Galeana	Dr. Arroyo	L3M5-C6	ND
		L3M6-C7	100 - 150
		L3M6-C8	100 - 150
		L4M7-C9	100 - 150
		L4M7-C10	100 - 150
		L4M8-C11	ND
		L5M9-C12	100 - 150
		L6M10-C13	100 - 150
		L7M11-C14	100 - 150
		L8M12-C15	100 - 150
	L9M13-C16	800 - 1,200	
	Galeana	L10M14-C17	100 - 150
		L11M15-C18	100 - 150
		L11M16-C19	ND
		L11M16-C20	ND
L12M17-C21		ND	
Apodaca	Escobedo	L13M18-C22	800 - 1,200
		L14M19-C23	ND
		L15M20-C24	1,600 - 2,400
		Mex-34	1,600 - 2,400

ND = No detectable, límite < 50 ppm.

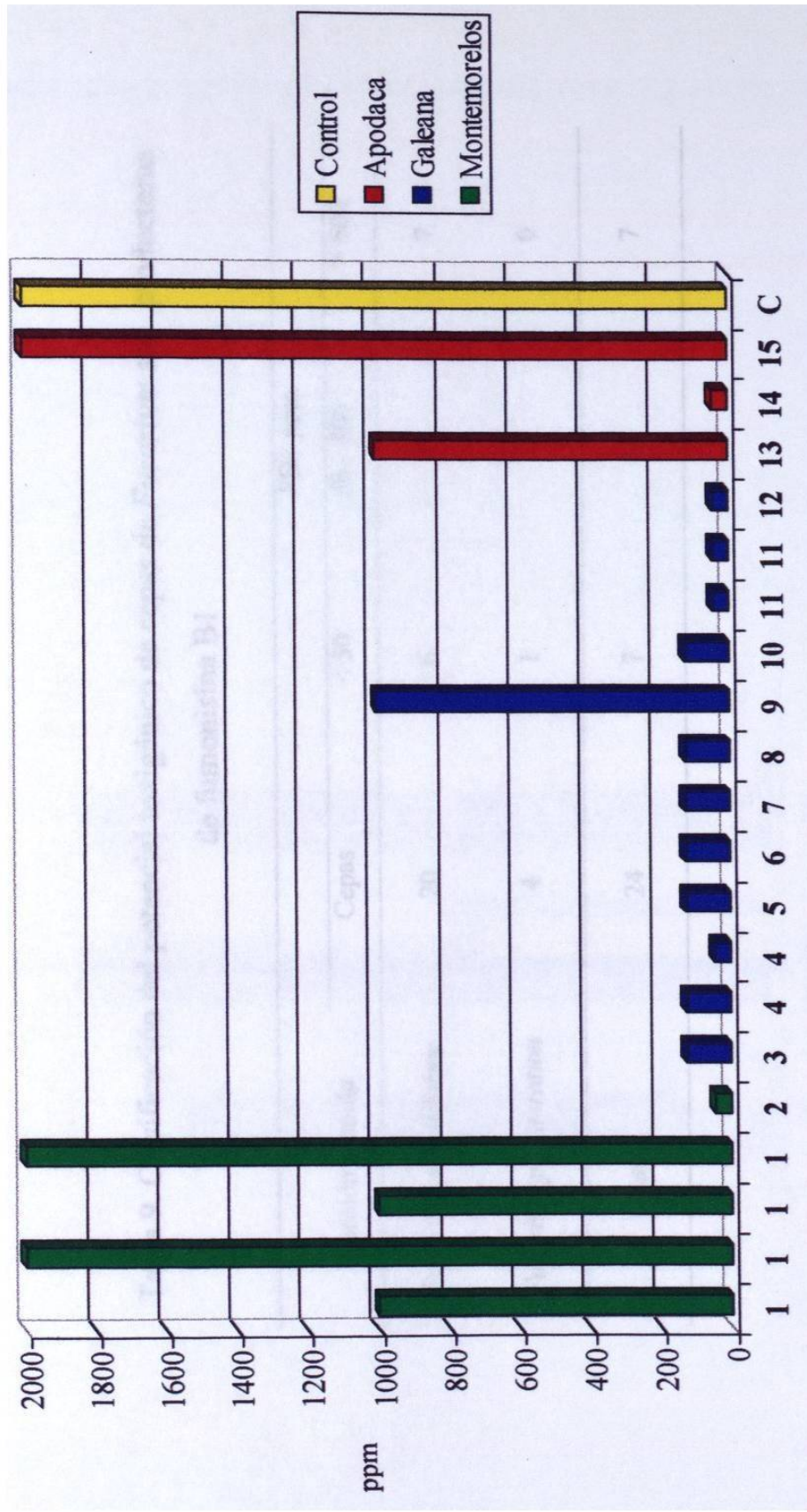
* = L : localidad, M : muestra obtenida en diferente campo agrícola y C : cepa.

Tabla 8. Distribución del potencial toxigénico de cepas de *Fusarium moniliforme* en los distritos de cultivos del estado de Nuevo León

Concentración de FB1 (ppm)	Cepas					Suma
	Montemorelos	Linares	Dr. Arroyo	Galeana	Apodaca	
>500		4	1	ND	2	7
50-500		ND	6	1	ND	6
< 50		1	1	3	1	7
Suma		5	8	4	3	20

ND = No detectable.

Figura 9. Comparación del potencial toxigénico de cepas de *Fusarium moniliforme* aisladas de maíz cultivado en diversas localidades del estado de nuevo León

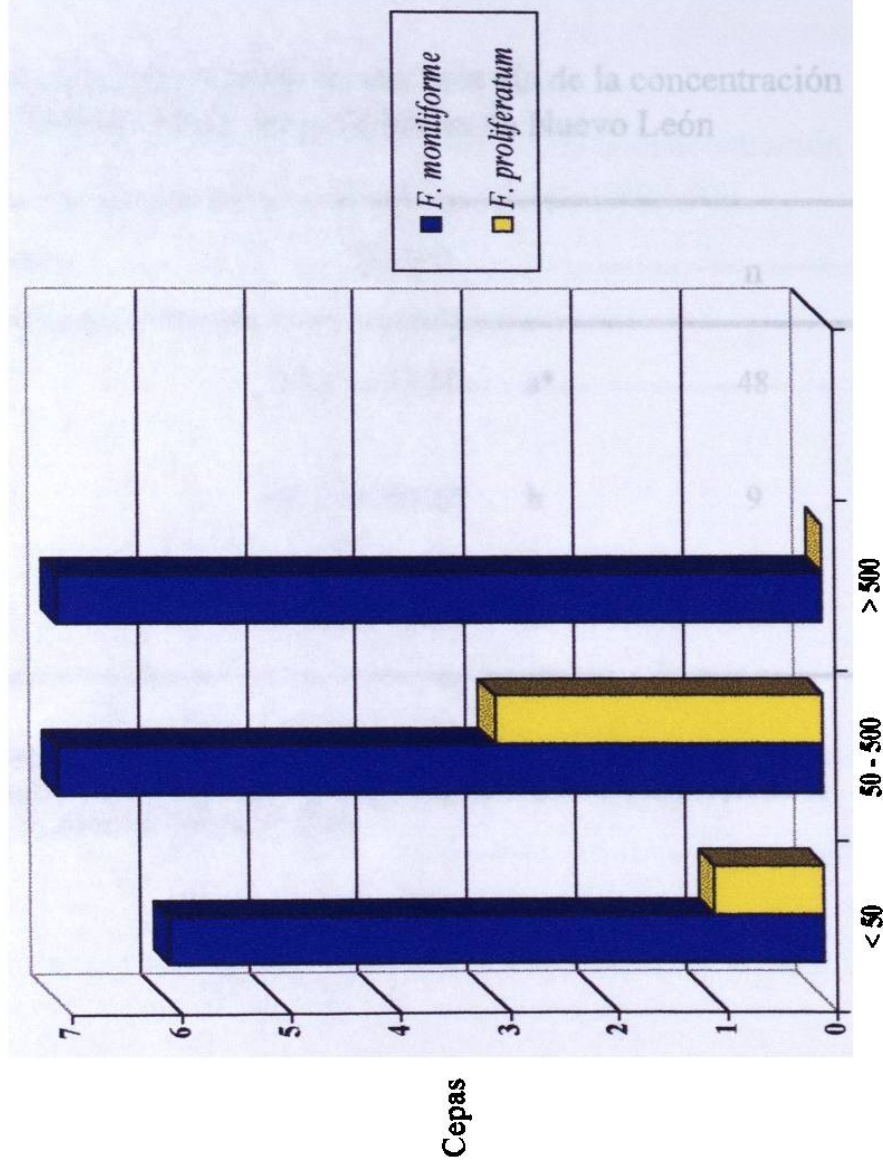


Localidades

Tabla 9. Clasificación del potencial toxigénico de cepas de *Fusarium* spp productoras de fumonisina B1

Sección Lisecola	Cepas	FB1 ppm		
		< 50	50 - 500	> 500
<i>Fusarium moniliforme</i>	20	6	7	7
<i>Fusarium proliferatum</i>	4	1	3	0
Suma	24	7	10	7

Figura 10. Comparación del potencial toxigénico entre cepas de *Fusarium* spp aisladas de maíz cultivado en diversas localidades del estado de Nuevo León



Fumonisin B1 [ppm]

Tabla 10. Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en los distritos de Nuevo León

Distrito	$X \pm E.E.$		n
2	151.56 ± 32.37	a*	48
3	905.55 ± 253.50	b	9
1	$1,176.66 \pm 201.06$	b	45

X = Media.

E.E. = Error estándar.

* = Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de medias de Tukey (Zar, 1996).

Tabla 11. Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en los municipios de Nuevo León

Municipio	X ± E.E.		n
3	65.00 ± 8.01	a*	15
2	190.90 ± 45.51	a	33
4	905.55 ± 253.50	b	9
1	1,176.66 ± 201.06	b	15

X = Media.

E.E. = Error estándar.

* = Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de medias de Tukey (Zar, 1996).

Tabla 12. Análisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en las localidades de Nuevo León

Localidades	X		n	Distrito
2	50.00	a*	3	1
12	50.00	a	3	2
14	50.00	a	3	3
11	66.66	b	9	2
10	75.00	b	3	2
3	83.33	b	9	2
7	100.00	b	3	2
4	125.00	b	9	2
5	125.00	b	3	2
6	125.00	b	3	2
8	125.00	b	3	2
9	1000.00	c	3	2
13	1000.00	c	3	3
1	1458.33	c	12	1
15	1666.66	c	3	3

X = Media.

* = Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de medias de Tukey (Zar, 1996).

Tabla 13. Analisis de varianza de una sola vía de la concentración de fumonisina B1 en las variedades de maíz de Nuevo León.

Variedades	X		n
2	50.00	a*	6
3	50.00	a	3
5	50.00	a	3
1	453.24	a	54
4	1,000.00	a b	3
6	1,666.66	b	3

X = Media.

* = Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$); de acuerdo a la prueba de rango múltiple de medias de Tukey (Zar, 1996).

De acuerdo con Riley *et al.*, (1993), existen métodos cromatográficos que se pueden aplicar para la detección y cuantificación de las fumonisinas. La cromatografía de gases acoplada al espectro de masas (GC-MS) es altamente sensible y específico, además su costo es muy elevado al igual que la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Por otro lado, la TLC es económica, pero de baja sensibilidad. Sin embargo, el límite de detección para TLC con *p*-anisaldehído es cerca de 100 ng sobre la placa, pero las interferencias de los extractos crudos el cual migran con las FBs, pueden obstruir la detección. A pesar de estas limitaciones, la TLC puede ser utilizada para un monitoreo en los extractos crudos del MC, porque la producción de fumonisinas por cepas toxigénicas excede a 1,000 µg/g, en límites de detección menores a éste se requiere limpieza de la muestra (Nelson, *et al.*, 1993), aunque con esta técnica se pueda estimar hasta 50 ppm.

En 1994, Desjardins *et al.*, detectaron y cuantificaron FBs en MC de *F. moniliforme* mediante la extracción con ACN/H₂O 1:1 y la técnica de TLC con ACN/H₂O 85:15 y como revelador *p*-anisaldehído, estos investigadores mencionan que la limpieza de las muestras no fue necesaria debido a que las concentraciones de FB1 obtenidas fue elevada, por lo tanto fácil de detectar. Considerando que la AOAC ha establecido una técnica oficial para cuantificar FBs mediante HPLC, que sustituye el ACN por el metanol, nosotros implementamos el método de extracción de esta técnica, sin efectuar limpieza de los extractos. La detección de la FB1 se realizó mediante TLC propuesta por Plattner *et al.*, (1990), el cual utilizó sílica gel desarrolladas en cloroformo/metanol/ácido acético (6:3:1) y *p*-anisaldehído, con un R_f de 0.24 . Sin embargo, en nuestra investigación se realizaron modificaciones a la polaridad del eluyente a (6:4:1),

encontrando valores de Rf de 0.74, esto nos indica que las impurezas se quedaron en un Rf inferior, por lo tanto se logró separar la FB1 de las interferencias de la matriz (pigmentos, lípidos y otros). Se realizaron co-cromatografías con el estándar de FB1 para confirmar la migración de la toxina y su separación, las manchas observadas confirmaron los resultados obtenidos, por lo que el método utilizado nos permitió la detección de la FB1 en los MC y la estimación de la concentración mediante la comparación visual con los estándares. En cada placa se aplicaron controles positivos (extractos crudos FB1 mayor de 2,000 ppm) y negativos (FB1 no detectable) para validar la técnica. Las recomendaciones en base a la técnica es que valores superiores a 200 ppm (Desjardins, *et al.*, 1994) es aplicar técnicas más sensibles como HPLC, pero los resultados obtenidos nos dan información sobre un panorama general en base a la presencia de cepas toxigénicas y predecir la importancia de realizar estudios posteriores en base a la cuantificación de estas toxinas directamente en el maíz, así como en sus productos derivados, respecto a la presencia de cepas toxigénicas en los 3 distritos de cultivo del estado de Nuevo León que se analizaron, el riesgo de que el maíz se encuentre contaminado con estas toxinas sería elevado.

Las fumonisinas fueron descubiertas recientemente (1988), la toxicidad de maíz contaminado con *F. moniliforme* ha sido documentado por más de 100 años, una de las manifestaciones dramáticas es la LEM, enfermedad fatal para equinos causada por FB1, pero en otros animales las principales lesiones no son en el cerebro, sino en el pulmón donde desarrolla un edema fatal. No obstante, el papel de las FBs en maíz se ha establecido en algunas enfermedades del ganado, pero aún no se conoce su importancia en enfermedades del hombre y particularmente, es más difícil determinar su potencial carcinogénico. Sin embargo, la IARC,

FDA entre otras, están evaluando el potencial toxigénico de las FBs, pero la IARC ha determinado que todavía no hay suficiente evidencia para clasificar las fumonisinas como un carcinógeno humano, aunque las ha clasificado como toxinas de *F. moniliforme* de la clase 2 B, posiblemente carcinógeno en humanos (Castegnaro y Wild, 1995; Desjardins, *et al.*, 1997).

Se conoce que más de 70 países regulan las micotoxinas en alimentos de humanos y forraje de animales, esta regulación incluye aflatoxinas en maíz, cacahuate, semilla de algodón y leche; desoxinivalenol y otros tricotecenos en maíz y trigo; ocratoxinas en granos, patulina en jugo de manzana y fumonisina B1 en maíz. Los niveles de tolerancia pueden impactar dentro de la agricultura en los productos de importación y exportación. Más específicamente, decisiones recientes de regulación sobre fumonisinas en maíz importado en algunos países europeos, puede impactar en el maíz exportado de los E.U.A. a Europa (Desjardins, *et al.*, 1997). En base a lo anterior es importante preocuparse por la salud humana en México y las pérdidas económicas que las FBs puede generar dentro de la agricultura y la ganadería, ya que también se realiza la importación de estos productos.

Varios investigadores (Dutton, *et al.*, 1996; Desjardins, *et al.*, 1997) han presentado algunas estrategias para prevenir la presencia de *F. moniliforme* en los cultivos de maíz, ya que parece imposible poder eliminar en su totalidad estas toxinas debido al ciclo de vida de este hongo, principalmente cuando está en maíz asintomático, una de ellas ha sido mediante cultivos resistentes a cepas toxigénicas, la cual se ha investigado por Rheeder *et al.*, (1990), así como el uso de agentes de biocontrol, donde los granos de maíz son tratados con rizobacterias antagónicas

(Bacon y Williamson, 1992), también están las prácticas rurales como la rotación de cultivos y el secado del mismo, para disminuir la formación de micotoxinas durante el crecimiento, cosecha y almacenamiento.

CONCLUSIONES

1. El medio de cultivo implementado en este trabajo permitió el aislamiento de *Fusarium* de la Sección Liseola en el 95 % de las muestras de maíz, cultivadas en diversas localidades del estado de Nuevo León.
2. El 86 % de las muestras de maíz cultivadas en diversas localidades del estado de Nuevo León presentaron *F. moniliforme* y el 19 % *F. proliferatum*.
3. La técnica de cromatografía en capa fina permitió determinar las cepas toxigénicas sin previa limpieza de los extractos, reduciendo el costo final de la determinación.
4. El 29 % de las cepas aisladas de maíz de diversas localidades del estado de Nuevo León, presentaron un elevado potencial para producir fumonisina B1 y el 42 % presentó un potencial intermedio.
5. En el 25 % de las localidades del estado de Nuevo León se aislaron cepas toxigénicas.
6. Las cepas toxigénicas de *Fusarium moniliforme* se presentaron en las variedades híbridas de maíz.

CONCLUSION

En maíz cultivado en el estado de Nuevo León, prevalece *F. moniliforme* con potencial toxigénico en el 25 % de las localidades que fueron evaluadas y están distribuidas en los 3 distritos de cultivo; particularmente en las variedades híbridas fueron las que albergaron la flora fúngica más toxigénica.

LITERATURA CITADA

Abbas, H.K., S.O Duke and T. Tanaka, 1993. Phytotoxicity of fumonisins and related compounds. *J. Toxicol.Toxin.* **12:**225-251.

Alberts, J.F., W.C.A. Gelderblom, R. Vleggaar, W.F.O. Marasas and J.P. Rheeder. 1993. Production of [14C] fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme* MRC 826 in corn cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59:**2673-2677.

AOAC, 1995. AOAC Official method 995.15 fumonisins B1,B2 y B3 in corn. *Natural Toxins.* Chapter **49:**49-50.

Azcona-Olvera, J.I., M.M. Abousied, R.D. Plattner and J.J. Pestka. 1992. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins-B2, and fumonisins-B3. *J. Agric. Food Chem.* **40:**531-34.

Bacon, C.W. and J.W. Williamson, 1992. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria whit corn. *Mycopathology.* **117:**65-71.

Bezuidenhout, S.C., W.C.A. Gelderblom, C.P. Gorst-Allman, R.M. Horak, W.F.O. Marasas, G. Spiteller and R. Vleggaar. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J Chem. Soc. Chem. Comm.* 743-745.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. p14-33,122-129.

Castegnaro, M and C. Wild, 1995. IARC activities in mycotoxin research. *Natural Toxins* **3:**327-331.

Cawood, M.E., W.C.A. Gelderblom, R. Vleggaar, Y. Behrend, P.G. Thiel and W.F.O. Marasas. 1991. Isolation of the fumonisin mycotoxins a quantitative approach. *J. Agric. Food. Chem.* **39**:1958-62

Chu, F.S, and G.Y. Li. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the people's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:847-852.

Cole, R.J., J.W. Kirksey, H.G. Cutler, B.L. Douppnik and J.C. Peckham. 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals. *Science* **179**:1324-1326.

Desjardins, A.E., R.D. Plattner and P.E. Nelson. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1695-1697.

Desjardins, A.E and G.P. Munkvold. 1997. Fumonisin in maize can we reduce their occurrence?. *Plant Dis.* **81**:557-565.

Dutton, M.F. 1996. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol.* **70**:137-161.

Faber, J.M and P.M. Scott. 1989. Fusarin C. In *Fusarium* mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Ed. J. Chelkowski. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pp 41-52.

Foley, D.C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **52**:870-872.

Gelderblom, W.C.A., P.G. Thiel, W.F.O. Marasas and J.K.V. Merwe. 1984. Natural occurrence of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.* **32**:1064-1067.

Gelderblom, W.C.A., P.G. Thiel, K. Jaskiewicz and W.F.O. Marasas. 1986. Investigations on the carcinogenicity of fusarin C a mutagenic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis*. **11**:1899-1901.

Gelderblom, W.C.A., K. Jashiewicz, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, R.M. Horak, R. Vleggaar and N.P.J. Kriek. 1988. Fumonisin-nivels mycotoxins whit cancer-promotingn activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1806-1811.

Jashiewicz, K., S.J. Van Rensburg, W.F.O. Marasas and W.C.A. Gelderblom. 1987. Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. *JNCL* **78**:321-325.

Kellerman, T.S., W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, W.C.A. Gelderblom, M. Cawood and J.A. Coetser. 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **57**:269-75.

Klittich, C.J.R and J.F. Leslie. 1992. Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia*. **84**:541-47.

Kriek, N.P.J., T.S. Kellerman and W.F.O. Marasas. 1981. A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep, and rats. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **48**:129-131.

Leslie, J.F., R.D. Plattner, A.E. Desjardins and C.J.R. Klittich. 1992. Fumonisin B1 production by strans from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* **82**:341-45.

Lynch, M.J., S.S. Raphael, L.D. Mellor, P.P. Spare and M.J. Inqood. 1985. Métodos de laboratorio. Segunda edición. Nueva editorial interamericana, S. A. de C.V. p. 708-713.

- Marasas, W.F.O., T.S. Kellerman, J.G. Pienaar and T.W. Naudé.** 1976. Leucoencephalomalacia: a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. Onderstepoort. J. Vert. Res. **43**:113-122.
- Marasas, W.F.O., P.E. Nelson and T.A. Toussoun.** 1984. Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. University Park, Penn. State Univ. Press. Pp 320.
- Marasas, W.F.O., P.G. Thiel, C.J. Rabie, P.E. Nelson and T.A. Toussoun.** 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section Liseola. Mycologia. **78**:242-47.
- Marasas, W.F.O., P.E. Nelson and T.A. Toussoun.** 1988. Reclasification of two important moniliformin-producing strains of *Fusarium*, NRRL 6022 and NRRL 6322. Mycologia. **80**:407-10.1984.
- Merril, A.H. Jr.** 1991. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. J. Bioenerg. Biomemb. **23**:83-104.
- Moreno, M.E.** 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM. ISBN 968-36-0718-7 Primera Ed. Cap. 4. Pp.31-76.
- Murphy, P.A., L.G. Rice and P.F. Ross.** 1993. Fumonisin B1, B2 and B3 content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. J. Agric. Food Chem. **41**:263-266.
- Nelson, P.E., T.A. Toussoun, and W.F.O. Marasas.** 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press. University Park, PA. P.5-48,139-141.
- Nelson, P.E., R.D. Plattner, D.D. Shackelford and A.E. Desjardins.** 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. Appl. Environ. Microbiol. **57**:2410-2412.

Nelson, P.E., R.D. Plattner, D.D. Shackelford and A.E. Desjardins. 1992. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in *Section Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:984-989.

Nelson, P.E., A.E. Desjardins and R.D. Plattner. 1993. Fumonisin, mycotoxin production by *Fusarium* species, biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**:233-252.

Nelson P.E., C.M Dignani and E.J Anaissie. 1994. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol.* **7**:449-504.

Norred, W.P., E. Wang, H. Yoo, R.T. Riley and A.H. Jr. Merrill. 1992. *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. *Mycopathologia.* **117**:73-78.

Oswailer, G.D., P.F. Ross, T.M. Wilson, P.E. Nelson and S.T. Witte.1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in a wine associated with fumonisin in corn screenings. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**:53-59.

Park, D.L., S.M. Rua, C.J. Mirocha, A.M El Saved and C.Y. Weng. 1992. Mutagenic potential of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure. *Mycopathology* **117**:105-108.

Plattner, R.D., W.P. Norred, K.A.Voss, R. Peterson, D.D. Shackelford and D.A. Weislander. 1990. A method of detection of fumonisin in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycology.* **82**:698-702.

Plattner, R.D., D. Weisleder, D.D. Shackelford, R. Peterson and R.G. Powell. 1992. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia.* **117**:23-28.

Powell, R.G. and R.D. Platner. 1995. In "alkaloides: chemical and biological perspectives". S. W. Pelletier Ed. Chap 6. Pergamon Press. Pp. 247-278.

Rheeder, J.P., W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard and D.J.V. Schalkwyk. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*. **82**:353-57.

Rheeder, J.P., W.F.O. Marasas and P.S. Vanwyk. 1990. Fungal association in corn kernels and effects on germination. *Phytopathology*. **80**:131-134.

Ross, P.F., P.E. Nelson, J.L. Richard, G.D. Osweiler, L.G. Rice, R.D. Plattner and T.M. Wilson. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leucoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3225-3226.

Riley, R.T., W.P. Norred and Ch.W. Bacon. 1993. Fungal toxins in foods. Recent concerns. *Annu. Rev. Nutr.* **13**:167-189.

Rottinghaus, G.E., C.E. Coatney and H.C. Minor. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 326-329.

SAGAR. 1997. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Programa de Fomento Agrícola. Informe de la encuesta Nacional sobre Rendimientos agrícolas de Maíz, frijol y sorgo. Primavera/verano/97. 1/12/97.

Sala, N., V. Sanchis, P. Vilaro, R. Viladrich, M. Torres, I. Viñas and R. Canela. 1994. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. *J. Food. Prot.* **57**: 915- 917.

Scott, P.M and G.A. Laurence. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75:829-34.

Seifert, K. 1996. Fuskey Fusarium Interactive Key. <http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>.

Shelby, R., G.E. Rottinghaus and H.C. Minor. 1994. Comparison of thin layer chromatography and competitive immunoassay methods for detecting fumonisin in maize. *J. Agric. Food. Chem.* 42:2064-2067.

Sheldon, J.L. 1904. A corn mold (*Fusarium moniliforme* n sp.). *Agric. Exp. Stn. Nebraska, Annu. Rep.* 17:23-43.

sp55@cornell.edu. <http://www.anci.cornell.edu/1997ter/Park/#Microbioly> of *Fusarium moniliforme*.

Springer, J.P., J. Clardy, R.J. Cole, J.W. Kirksey, R.K. Hill, R.M. Carlson and J.I. Isidor. 1974. Structure and synthesis of moniliformin, a novel cyclobutane microbial toxin. *J. Am. Chem. Soc.* 96:2267-2268.

Sydenham, E.W., G.S. Shepard and P.G. Thiel. 1992 a. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2 and B3 in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75:313-18.

Sydenham, E.W., W.F.O. Marasas, G.S. Shepard, P.G. Thiel, and E.Y. Hirooka. 1992 b. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.* 40:994-97.

Thiel, P.G., W.F.O. Marasas, E.W. Sydenham, G.S. Shepard and W.C.A. Gelderblom. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for humans and animal health. *Mycopathol. Appl. Mycol.* 117:3-9.

Thiel, P.G., G.S. Shephard, E.W. Sydenham, W.F.O. Marasas, P.E. Nelson and T.M. Wilson. 1991. Levels of fumonisins B1 and B2 in feeds associated with confirmed case of equine leukoencephalomalacia. *J. Agric Food Chem.* **39**:109-11.

Tseng, T.C., K.L. Lee, T.S. Deng, C.Y. Liu and J.W. Huang. 1995. Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. *Mycopathology.* **130**(2):117-21.

Usleber, E., M. Straka and G. Terplan. 1994. Enzyme immunoassay for fumonisin B1 applied to corn-based Foods. *J. Agric. Food Chem.* **42**:1392-1396.

Voss, K.A., W.J. Chamberlain, C.W. Bacon, R.T. Riley and W.P. Norred. 1995. Subchronic toxicity of fumonisin B1 to male and female rats. *Food Addit Contam.* **12**(3):473-8.

Wang, E., W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley and A Jr. Merrill, 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* **266**: 1486-90.

Wilson, T.M., P.F. Ross, L.G. Rice, G.D. Osweiler and H.A. Nelson. 1990. Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**:213-16.

Yoshizawa, T., Y. Luo and T. Katayama. 1990. Comparative Study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins. (trichotecenes and zearalenone) in corn human esophageal cancer in China. *Appl Environ Microbiol.* **56**:3723-3726.

Yoshizawa, T., A. Yamashita and Y. Luo. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high-and-low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ Microbiol.* **60**:1626-1629.

Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis.* 3rd Edition. Prentice-Hall, Inc. Englewood, New Jersey. P. 667.

