

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS

MAESTRIA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN ANIMAL



INCIDENCIA DE *Fusarium moniliforme* Y FUMONISINAS EN MAÍZ  
CULTIVADO EN LAS LOCALIDADES DE AMECA  
Y HUEJOTITÁN, JALISCO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
CECILIA JIMÉNEZ PLASCENCIA

DIRECTOR DE TESIS  
MC. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ

ASESORES:  
DR. AGUSTÍN RAMÍREZ ÁLVAREZ  
DR. RICARDO NUÑO ROMERO

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Mayo de 2001

## **AGRADECIMIENTOS**

---

### **A la Universidad de Guadalajara:**

Porque siempre me ha dado la oportunidad de superarme profesionalmente.

### **Al Dr. Agustín Ramírez Álvarez:**

Jefe del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por su apoyo.

### **A la M. en C. Waldina Patricia Reyes Velázquez:**

A mi directora de tesis y amiga mi agradecimiento por su invaluable ayuda en la realización de este trabajo de tesis.

### **A mis asesores y miembros del Jurado:**

Dr. Ricardo Nuño Romero, Dra. Delia Guillermina González Aguilar, Dra. Esther Albarrán Rodríguez, M. en C. Jorge Hernández Góborra, M. en C. Mario Alberto Ruiz López y al M. en C. Conrado Soto Velasco por sus valiosas aportaciones y observaciones que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

### **A mi familia:**

A mi esposo Ricardo y mis hijos Diego y David dedico esta tesis.

### **A:**

M. en C. Patricia Landeros Ramírez por la amistad que siempre me ha brindado y el apoyo que recibí de ella durante la elaboración de esta tesis.

**A todos un cariñoso reconocimiento**

## CONTENIDO

---

	Página
AGRADECIMIENTOS .....	III
CONTENIDO .....	IV
ABREVIATURAS .....	VI
LISTA DE CUADROS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
RESUMEN .....	IX
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
1. Cultivo del maíz en México .....	3
2. Producción de micotoxinas .....	4
3. Taxonomía y biología de <i>Fusarium moniliforme</i> .....	4
3.1 Fase asexual (anamorfo) .....	5
3.2 Fase sexual (teleomorfo) .....	6
3.3 Morfología y pigmentación de las colonias .....	6
4. Presentación de <i>F. moniliforme</i> en el maíz .....	7
5. Producción de fumonisinas .....	8
5.1 Producción de fumonisinas en el laboratorio .....	10
6. Mecanismo de acción de las fumonisinas .....	11
7. Efectos biológicos en animales .....	13
Leucoencefalomalasia equina (LEME) .....	13
Edema Pulmonar Porcino (EPP) .....	13
Toxicidad en aves.....	14
Toxicidad en humanos .....	14
8. Contaminación por <i>F. moniliforme</i> y fumonisinas en el maíz .	15
9. Metodología para la detección de fumonisinas .....	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
III. JUSTIFICACIÓN .....	20
IV. HIPÓTESIS .....	21
V. OBJETIVOS .....	22

<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	23
7.1 Detección de <i>F. moniliforme</i> y fumonisinas en Huejotitán y Ameca, Jalisco .....	23
7.2 Aislamiento e identificación de <i>F. moniliforme</i> .....	26
7.3 Cuantificación de fumonisinas .....	29
7.4 Valoración de la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de <i>F. moniliforme</i> aisladas en Huejotitán, Jalisco .....	30
<b>VIII. RESULTADOS</b>	
8.1 <i>F. moniliforme</i> en el maíz de Huejotitán, Jalisco .....	34
8.2 <i>F. moniliforme</i> en el maíz de Ameca, Jalisco .....	37
8.3 Fumonisinas presentes en Huejotitán y Ameca, Jalisco..	38
8.4 Capacidad productiva de fumonisinas .....	43
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	44
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	53

## ABREVIATURAS

---

LEME:	Leucoencefalomalacia equina
EPP:	Edema pulmonar porcino
ANOVA:	Análisis de varianza
F.:	<i>Fusarium</i>
ng/g:	nanogramo por gramo
µg/g:	microgramo por gramo
$\bar{x}$ :	promedio
g:	gramo
FAO:	Organización para la Agricultura y Alimentación.
µ:	micrómetro
HCA:	Medio de cultivo hojas de clavel con agar
APD:	Agar papa dextrosa
cm:	centímetro
° C:	grados centígrados
FB <sub>1</sub> :	Fumonisina B1
FB <sub>2</sub> :	Fumonisina B2
FB <sub>3</sub> :	Fumonisina B3
FB <sub>4</sub> :	Fumonisina B4
FA <sub>1</sub> :	Fumonisina A1
FA <sub>2</sub> :	Fumonisina A2
FC <sub>1</sub> :	Fumonisina C1
TCA:	Ácido tricarbóxico
3HP:	3-Hidroxipiridina
mL:	mililitro
USA:	Estados Unidos de Norteamérica
CE:	Cáncer esofágico
µg:	microgramo
FDA.:	Administración de Alimentos y Drogas
CG-EM:	Cromatografía de gases – espectrometría de masas
UDG:	Universidad de Guadalajara
UFCg <sup>-1</sup> :	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
mg:	miligramo
KCl:	Cloruro de potasio
NaCl:	Cloruro de sodio
M:	Molar
msnm:	Metros sobre el nivel del mar
DV:	Daño visual
C.W.:	Características climáticas semihúmedas
OPA:	O-phtaldehído.
NAD:	2,3 dicarboxialdehído naftaleno
ELISA:	Técnica de ensayo inmunoabsorbente mediante enzima ligada.
PBS:	Solución buffer de fosfatos.

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA	PÁGINA
1. Estructura química de las fumonisinas .....	9
2. Localización del área de muestreo .....	24
3. Clasificación del daño visual de las mazorcas .....	25
4. Aislamiento e identificación de <i>F. moniliforme</i> .....	27
5. Técnica y tinción para el microcultivo.....	28
6. Determinación de fumonisinas mediante Cromatografía por Inmunoafinidad y detección Fluorométrica .....	30
7. Valoración de la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de <i>F.moniliforme</i> aisladas en Huejotitán, Jalisco .....	32
8. Cadenas de microconidios típicos de <i>Fusarium moniliforme</i> .....	36
9. <i>Fusarium moniliforme</i> : micelio hialino septado, monofialides, microconidios en falsas cabezas y microconidios ovoides .....	36
10. Precipitación y evaporación acumuladas de Junio a Noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco .....	41
11. Temperaturas máximas y mínimas registradas de Junio a Noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco .....	41
12. Precipitación y evaporación acumuladas de Junio a Noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco .....	42
13. Temperaturas máximas y mínimas registradas de Junio a Noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco .....	42

## RESUMEN

---

*Fusarium moniliforme* es el principal hongo productor de fumonisinas, responsables de la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino. Se encuentran estrechamente relacionadas al cáncer esofágico humano en algunas regiones de Sudáfrica, India, China y Estados Unidos de Norteamérica. El objetivo del presente estudio fue determinar la incidencia de *F. moniliforme* y fumonisinas en el maíz cultivado en Huejotitán, municipio de Jocotepec y en Ameca, Jalisco. Se realizó un muestreo bajo un diseño completamente al azar en mazorcas de maíz y se procedió al aislamiento e identificación de la especie de *Fusarium* según la técnica descrita por Nelson *et al.* La detección y cuantificación de fumonisinas se realizó mediante columnas de inmunoafinidad y detección fluorométrica. Para valorar la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de *F. moniliforme* aisladas se utilizó la técnica descrita por Desjardins *et al.* Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Chi cuadrada, t student y ANOVA a un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Se encontró alta incidencia de *F. moniliforme* en el maíz de ambas localidades del estado de Jalisco (Ameca de 90 – 100% y Huejotitán de 78 – 100%). El desarrollo del UFCg<sup>-1</sup> de acuerdo al daño visual de las mazorcas fue en promedio de 22,422 (daño visual < 2%), de 42,157 (2 – 10%), 418,333 (10 – 25%) en Huejotitán, mientras que en Ameca el desarrollo de UFCg<sup>-1</sup> fue de 1,968.64 (Daño Visual 2%), 1,884.50 (DV 2-10%) y 24,343.71 (DV 25-50%). Existiendo relación estadística en dicha localidad, lo que indica que a mayor daño de la mazorca existe mayor contaminación por *F. moniliforme*. Los niveles de fumonisinas presentes en el maíz de Huejotitán fluctuaron de 9.33 a 11 µg/g y en Ameca de 6.27 a 9.05 µg/g sin que se encontrara diferencia estadística entre localidades. De las cepas aisladas de *F. moniliforme* en el maíz, se encontró el 93.8% con capacidad productiva de fumonisinas (700-2,280 µg/g). Se concluye que en ambas localidades del estado de Jalisco existe alto potencial de contaminación en el maíz que se destina a consumo humano y animal.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La contaminación por hongos en cereales como el maíz, representa importantes pérdidas económicas a la producción agrícola, además de causar deterioro del valor nutritivo de los granos por la degradación de las proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas. Entre otras alteraciones se considera de gran relevancia la producción de metabolitos secundarios, denominados micotoxinas, las cuales pueden ocasionar daño irreparable a la salud de humanos y animales<sup>(4)</sup>.

Dentro de las especies de hongos productores de micotoxinas sobresale *Fusarium moniliforme*, el cual se considera de distribución mundial y es aislado principalmente en cereales como el maíz, trigo, sorgo y avena<sup>(18,22)</sup>. En el maíz se presenta en forma endófito y permanece en la planta asintóticamente, expresión relacionada con la naturaleza genética del hongo, cultivo de maíz y condiciones ambientales<sup>(37)</sup>.

Entre las principales micotoxinas producidas por este hongo se encuentran las fumonisinas, caracterizadas en 1988 por Bezuidenhout y Gelderblom<sup>(5)</sup>, las cuales son responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además de tener efectos hepatotóxicos y cancerígenos en roedores y aterogénicos en primates no humanos<sup>(26)</sup>. En algunas regiones de Sudáfrica, China, India y Estados Unidos de Norteamérica existe estrecha relación entre los niveles de fumonisinas y la alta incidencia de cáncer esofágico humano<sup>(38, 47, 69, 80)</sup>.

Las investigaciones realizadas respecto a la contaminación de fumonisinas en el grano y productos del maíz, reportan altos niveles de la toxina en maíz parcialmente molido y harina, mientras que los niveles fueron bajos o no se detectaron en cereales, tortillas, totopos, palomitas y maicena<sup>(70)</sup>. Los niveles detectados en los diferentes productos varían de 0 a 3.5 µg/g. Se presume que la incidencia de fumonisinas es a nivel mundial<sup>(10)</sup>.

En la actualidad existe escasa información respecto al efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas, dichos estudios han sido limitados por la reducida eficiencia de la metodología analítica, la cual fue diseñada para la detección de fumonisinas a partir de granos<sup>(63)</sup>.

En una investigación realizada en el estado de Nuevo León se aislaron cepas de *F. moniliforme* con alta capacidad productiva de fumonisinas<sup>(19)</sup>, lo que sugiere que existe alta contaminación de fumonisinas en maíz y sus productos. Sin embargo, en otros estados de la República Mexicana no se tienen estudios sobre los niveles de contaminación de fumonisinas en maíz o en sus productos. Se pretende determinar el grado de contaminación por *F. moniliforme* y fumonisinas en particular en dos localidades consideradas de alta producción de maíz en el estado de Jalisco.

## II. ANTECEDENTES

---

### 1. CULTIVO DE MAÍZ EN MÉXICO.

El cultivo de maíz en México cubre el 51% del área agrícola, y Jalisco ocupa uno de los primeros lugares con una producción nacional con 2'052,728 toneladas lo que representa 15.8% del total. Respecto a la utilización del maíz, el 59.5% se consume en tortillas, 4.7% es procesado por la industria almidonera y 35.8% se destina a otros usos (semillas y alimento animal)<sup>(28)</sup>.

El maíz es el alimento de mayor importancia, su consumo *per cápita* se calcula en 300 g/día, que aportan el 56% de las calorías y el 47% de las proteínas en la alimentación. En la áreas rurales estos porcentajes son 70% y 56%, respectivamente<sup>(33)</sup>.

El almacenamiento de granos en países con climas tropicales y subtropicales ocasiona con frecuencia pérdida de peso, transformaciones químicas y contaminación con micotoxinas, microorganismos, fragmentos de insectos, orina y excretas de roedores. Estima la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), una pérdida entre 5 y 10% en los granos alimenticios cosechados. En América latina las pérdidas varían de 25 a 50%<sup>(40)</sup>.

La contaminación por hongos en el cultivo de maíz requiere de altos contenidos de humedad (20 a 21%), los cuales invaden y atacan a los granos antes de la cosecha, afectan su apariencia y calidad (roña, manchas, decoloración). Los géneros considerados de campo que se presentan frecuentemente en el maíz son *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Fusarium*, este último considerado tanto de campo como de almacenamiento<sup>(28)</sup>.

## 2. PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, que en pequeñas cantidades pueden ocasionar daño en plantas, animales y humanos<sup>(4, 31)</sup>.

En la actualidad se conoce un gran número de micotoxinas de diferentes tipos y nivel de toxicidad, su liberación en productos alimenticios, depende de la cepa específica del hongo y es influenciada por factores ambientales como la temperatura y humedad, por lo tanto la contaminación puede variar según las condiciones geográficas. Por lo general, las micotoxinas en el campo son el resultado de la interacción de dos o más micotoxinas, sin embargo, un tipo puede ser la de mayor prevalencia e impacto<sup>(28, 49)</sup>.

Algunos de los factores que intervienen cuando se presenta toxicidad causada por hongos son: a) infección de una planta susceptible a un hongo productor de micotoxinas; b) factores ambientales favorables para que se manifieste la enfermedad; c) capacidad genética del patógeno de producir metabolitos tóxicos para humanos y animales; y d) acumulación de cantidades suficientes de metabolitos tóxicos en la planta enferma<sup>(53)</sup>.

## 3. TAXONOMIA Y BIOLOGIA DE *F. moniliforme*.

Dentro del género *Fusarium*, sobresale la especie de *Fusarium moniliforme*, de distribución mundial sobre una gran variedad de plantas y de mayor prevalencia en el maíz. Este hongo se presenta no sólo en zonas de clima templado húmedo y subhúmedo, sino también en zonas tropicales y subtropicales<sup>(43)</sup>.

*Fusarium moniliforme* J. Sheldon, pertenece al Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Tuberculariaceae. La fase sexual de este especie es *Gibberella fujikuroi* Sawada, de

la Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Subclase Pyrenomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae. La taxonomía de *Fusarium* es compleja y confusa, ya que se aplican diversos sistemas taxonómicos<sup>(42)</sup>. El sistema propuesto por Nelson *et al.*, establece 12 secciones, entre las que se encuentra la sección Liseola, a la cual pertenece *F. moniliforme*<sup>(45)</sup>.

El estado peritecial de este hongo consiste en un complejo de 6 diferentes especies o poblaciones biológicas designadas con las letras A a la F; miembros de las poblaciones A y F pertenecen a *Fusarium moniliforme*, las poblaciones B y E a *F. subglutinans* y la población D a *F. proliferatum*<sup>(42)</sup>.

### 3.1 Fase asexual (anamorfo):

*F. moniliforme* forma conidióforos en hifas aéreas; estos presentan una célula basal simple con 2 a 3 fiálides apicales laterales simples; miden de 20-30  $\mu\text{m}$  de longitud, 2-3  $\mu\text{m}$  de ancho en la base y 1.5  $\mu\text{m}$  en el ápice. Los microconidios se forman agrupados en cabezas falsas sobre monofiálides y en cadenas basípetas originadas de conidióforos ramificados o en fiálides individuales. Son fusiformes, ovoides, elipsoidales o clavados, con la base ligeramente aplanada, usualmente mononucleares, miden de 1.5-3.5 x 5-12  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios se desarrollan en fiálides de hifas laterales; a veces son escasos. En medio de cultivo hojas de clavel-agar (HCA), se producen masas abundantes en esporodoquios anaranjado-pálidos. Son alargados, delgados defalcados a casi rectos, con 3 a 7 septos; miden de 2.5-4 x 25-60  $\mu\text{m}$ ; su pared es delgada. La célula apical es ligeramente curvada y ahuzado en el extremo y la célula basal tiene forma de pie. Esta especie se distingue por las cadenas largas de microconidios producidos por monofiálides individuales y la ausencia de clamidosporas<sup>(6, 11, 45)</sup>.

### 3.2 Fase sexual (teleomorfo):

*Gibberella fujikuroi*, estado perfecto de *F. moniliforme*, produce peritecios individuales o en grupos, superficiales o sumergidos en el substrato, de globosos a subcónicos, azul-oscuros, ostiolados, de 220-300 x 250-375  $\mu\text{m}$ . Las ascas son rectas, elipsoidales a clavadas, con 4-8 ascosporas hialinas, de elipsoidales a fusiformes, con 1-3 septos, con sus extremos redondeados, con estrechamiento en los septos y dispuestas oblicuamente en 1 o 2 series en el asca. Las masas de ascosporas son de color ocre-salmón; miden de 3.9-6 x 14-19  $\mu\text{m}$ <sup>(6, 45)</sup>.

### 3.3 Morfología y Pigmentación de las colonias de *F. moniliforme*:

En el medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) el *F. moniliforme* forma micelio blanco, de crecimiento rápido. Al madurar la colonia produce pigmentaciones que fluctúan de anaranjado-violeta a violeta-oscuro, pálido, lila, vináceo, crema o magenta-oscuro, de acuerdo con el código de colores propuesto por Nelson *et al.*, (1983). Algunos cultivos carecen de coloración. El micelio aéreo es denso, varía de velludo a afieltrado, de aspecto pulverulento por la formación de microconidios. Los esporodoquios están normalmente ausentes, cuando se presentan son de color anaranjado pálido a bronceado y están confluentes<sup>(6, 11, 45)</sup>.

Estudios de laboratorio indican que *F. moniliforme* puede permanecer en la semilla del maíz viable hasta por 8 años, debido a su localización sistémica lo que provee condiciones favorables para mantener su virulencia y viabilidad por años. Produce dos clases de esporas, las macroconidias, de sobrevivencia mayor, que transportan al hongo durante las estaciones, mientras que los microconidios, transportados por el viento, funcionan como propágulos de infección secundaria, infectando la planta durante la estación de crecimiento. No produce clamidosporas como estructuras de sobrevivencia, pero puede sobrevivir durante 12 meses en el suelo como hifas dentro de fragmentos de tallos enterrados a 30 cm, con humedad de 5 a 35%, y temperatura de 5 a 10 °C<sup>(53)</sup>.

#### 4. PRESENTACIÓN DE *F. moniliforme* EN EL MAÍZ.

La extensión y naturaleza de la enfermedad del maíz depende de la vía de infección, cuando la enfermedad en la planta de maíz es asintomática, originada en la semilla, puede causar declinación de la planta o muerte antes del estado reproductivo<sup>(42)</sup>.

Los insectos y el viento son importantes como acarreadores del hongo, lo cual ocurre usualmente por los orificios que hacen los gusanos. El daño visual de la infección en la planta de maíz es variable, algunas veces es asintomática y otras notoriamente infectado. Como resultado de la infección, *F. moniliforme* llega al grano, localizándose en su base como escasas hifas, pero en los casos donde el maíz es asociado a efectos tóxicos en animales es usual encontrar una masa abundante de hifas esporuladas, las cuales colonizan la sección interna del grano incluyendo al embrión. El hongo con frecuencia infecta la planta a partir del germen en un período de dos semanas y ya sea, la infección no muestra síntomas o bien ocasiona la muerte de la planta<sup>(46)</sup>.

Los estudios de laboratorio han establecido que la temperatura óptima de crecimiento de las cepas de *F. moniliforme* es entre 22.5 y 27.5° C, con una máxima de 32 a 37° C. Estudios adicionales indican que la humedad mínima para el crecimiento vegetativo es a -180 bars (potencial de agua), mientras que la germinación de conidios ocurre a -140 bars<sup>(6)</sup>.

Las investigaciones realizadas respecto al crecimiento del hongo bajo condiciones de almacenamiento son limitadas y éstas no fueron diseñadas para determinar la producción de toxinas en el almacén. Se ha determinado que el maíz infectado con un contenido de humedad de 18.4 a 23%, fue óptima para el crecimiento de *F. moniliforme*, mientras que se inhibió su crecimiento a 28% de humedad. El desarrollo del hongo en el maíz almacenado fue complejo debido a que existió interacción de la humedad con los niveles con O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En dicho estudio se observó crecimiento en

condiciones de almacenamiento de 0% de O<sub>2</sub> y 60% de CO<sub>2</sub> a 26° C, sin embargo, se redujo su crecimiento en niveles similares de CO<sub>2</sub> cuando la temperatura fue de 12° C, lo que sugiere crecimiento bajo condiciones anaeróbicas cuando el maíz no está en movimiento<sup>(11)</sup>.

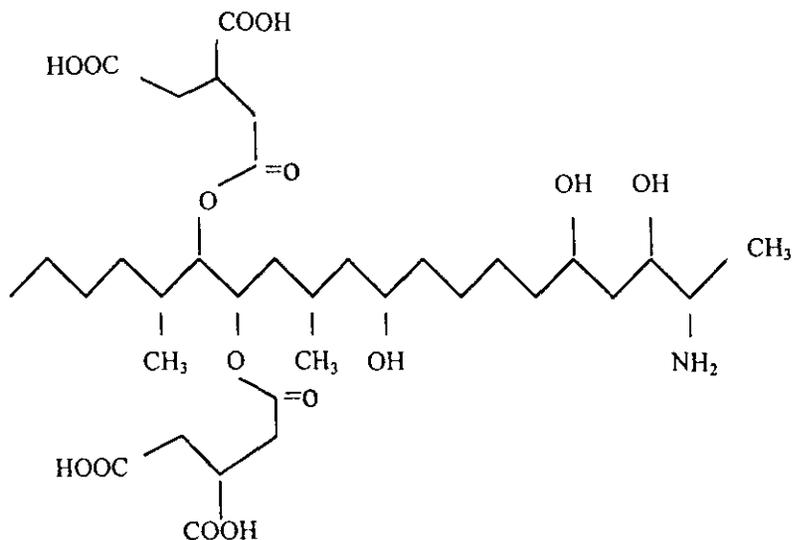
## 5. PRODUCCIÓN DE FUMONISINAS.

De las micotoxinas producidas por *F. moniliforme*, sobresalen la moniliformina, potencialmente tóxica y de alta mortalidad; fusarin C y ácido fusárico ambas potencialmente mutagénicas (fusarinas)<sup>(42)</sup>.

Las fumonisinas fueron caracterizadas en 1988 como diésteres de ácido tricarbóxico y amino alcoholes de 22 carbonos con un peso molecular de 721 (Figura 1).

De las 7 fumonisinas caracterizadas químicamente (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub> y FC<sub>1</sub>), la FB<sub>1</sub> se encuentra en cantidades elevadas y es la más tóxica. En el maíz contaminado de forma natural, la relación de FB<sub>1</sub>:FB<sub>2</sub> es de aproximadamente 3:1 y de FB<sub>1</sub>:FB<sub>3</sub> es de 12:1. Las FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> se encuentran en el maíz cosechado y se presentan en proporciones consistentes. Las FC<sub>1</sub>, FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub> se consideran artefactos de aislamiento de las otras fumonisinas<sup>(8)</sup>.

Estudios realizados en Argentina, Brasil, Canadá, China, Egipto, Estados Unidos, Nepal y Perú reportan la presencia de fumonisinas en maíz y en sus productos, lo cual sugiere que la producción de estas micotoxinas es de distribución mundial<sup>(18, 44, 53, 60)</sup>.



**Figura 1. Estructura química de las fumonisinas**

En la actualidad se desconoce el periodo y el patrón de acumulación de la producción de fumonisinas, una vez infectada la planta por el hongo. *F. moniliforme* y *F. proliferatum* son patógenos biotróficos, aunque esta relación no es obligatoria, ambos hongos son considerados de campo e implica que producen sus toxinas bajo estas condiciones, sin embargo, puesto que su relación con el maíz y otras plantas no es obligatoria, es posible encontrarlas en fragmentos de maíz contaminado y en restos de plantas muertas, sirviendo de substrato para la producción de sus toxinas, especialmente durante el almacenamiento. Además, se encontró que el porcentaje de infección con *F. moniliforme* se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando el maíz se cosechó con humedad de 12.4% y se almacenó durante 8 meses, al término de este estudio se encontró una humedad de 13.7% por efecto del desarrollo del hongo<sup>(63)</sup>.

Los resultados indican que existe alto potencial para la producción de fumonisinas en un amplio intervalo de condiciones de almacenamiento, concluyendo que pueden surgir en campo debido al parasitismo del hongo e incrementarse bajo condiciones inapropiadas de almacenamiento<sup>(9)</sup>.

### **5.1. Producción de fumonisinas en el laboratorio.**

La evaluación de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* para la producción de fumonisinas se basa en el cultivo en laboratorio sobre maíz estéril y el análisis de la cantidad producida de fumonisinas.

La producción en el laboratorio incluye el ajuste del contenido de humedad de maíz entero o parcialmente molido a 43% y esterilizado durante 30 minutos. El agua puede ser adicionada antes de esterilizar o asépticamente después de la esterilización; en el primer caso debe dejarse de 1 a 4 horas con el maíz, ya que el exceso reduce el rendimiento de fumonisinas. Otro aspecto importante es la aeración que recibe el cultivo del hongo, la cual es controlada mediante el uso de recipientes con tapón ligeramente ajustado. Para este propósito se recomienda que para el cultivo en 50 g de maíz se utilicen matraces Erlenmeyer de 300 mL de capacidad, para 100 g matraces de 500 mL y para 500 g en matraces Fernbach de 2.8L. En pruebas tamiz se utilizan cultivos de 50 g, mientras que para la producción de fumonisinas a gran escala en investigaciones toxicológicas se utilizan los matraces Fernbach<sup>(60)</sup>.

Para la preparación del inóculo de conidios se recomienda el crecimiento del hongo en medios de cultivo de 1 a 2 semanas, posteriormente se recupera el micelio en agua estéril o medios líquidos enriquecidos, o bien por conidios liofilizados. Una vez realizada la inoculación en el maíz, los cultivos son incubados en obscuridad a 25° C de 21 a 30 días; períodos mayores pueden dar lugar a una mayor producción de fumonisinas<sup>(7)</sup>. El tiempo depende del método usado y de la

cantidad total de maíz en el fermentador; durante los tres primeros días, los cultivos deben ser agitados 1 o 2 veces por día<sup>(8)</sup>.

El siguiente cuadro muestra la producción de fumonisina B<sub>1</sub> de diferentes cepas de *F. moniliforme* aisladas de fuentes diversas.

**Cuadro 1. Producción de fumonisina B<sub>1</sub> en cultivo a partir de diferentes cepas de *Fusarium moniliforme*<sup>(3)</sup> \***

Alimento de animales con maíz contaminado (USA)	Sorgo y Milo (Nigeria y Zimbawe)	Maíz mohoso (Nepal)	Alimento para animales con maíz de buena calidad (USA)	Queratitis micótica y cáncer (Canadá y USA)
M-2546 (2,589)	M-5054 (2,448)	M-5496 (nd)	M-211 (1927)	M-722 (1,914)
M-2552 (6421)	M-5067 (733)	M-5500(traza)	M-2232 (3,091)	M-773 (2,500)
M-2547 (144)	M-5068 (539)	M-5507(traza)	M-2270 (459)	M-1102 (nd)
M-2650 (traza)	M-5081 (traza)	M-5519 (60)	M-2285 (2,716)	M-1810 (130)
M-3031 (1,391)	M-5193 (traza)			M-2768 (nd)
M-3034 (6,090)	M-5243 (104)			M-5114 (2,900)
M-3041 (323)	M-5234 (95)			M-2978 (1,700)

\* Número de acceso de las cepas de *F. moniliforme* en el Centro de Investigaciones de *Fusarium* con concentraciones de FB<sub>1</sub> en µg/g dentro del paréntesis.

nd = no detectable.

## 6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS FUMONISINAS

Recientemente se ha demostrado que la FB<sub>1</sub> interfiere con la biosíntesis de esfingolípidos, inhibiendo a la enzima esfingonina N-aciltransferasa (enzima que

normalmente produce dihidroceramida a partir de esfingonina en la vía metabólica de esfingosina a ceramida), lo cual causa acumulación de esfingosina y esfingonina a nivel intracelular. Probablemente la inhibición de la enzima se debe a la estructura similar de la esfingonina y fumonisina<sup>(52, 62)</sup>.

Cultivos de células y animales expuestos a las fumonisinas tienden a incrementar las bases esfingoides libres (esfingonina y esfingosina) en suero, tejidos y orina, lo cual es considerado como un signo de diagnóstico primario<sup>(78)</sup>.

Las fumonisinas FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> y el hidrolizado de FB<sub>1</sub> han demostrado ser los primeros inhibidores específicos de la biosíntesis de *novo* de esfingolípidos. En hepatocitos de rata a consecuencia de la inhibición de la N-aciltransferasa, disminuyeron la biosíntesis de ceramida y por lo tanto, la biosíntesis de *novo* de esfingosina, además de la rápida acumulación de esfingonina (precursor inmediato en la vía biosintética de la dihidroceramida), ocasionando alteración en la relación esfingosina: esfingonina y depresión del complejo esfingolípido<sup>(52)</sup>.

En cultivo de neuronas cerebrales, la FB<sub>1</sub> inhibió la biosíntesis de *novo* de esfingomielina más que la de glicolípidos. El hecho de que la acumulación de la esfingonina es mayor que la de esfingosina sugiere que la vía de *novo* es el blanco primario de inhibición.

Si bien, existe la hipótesis de que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos es el evento molecular primario en la presentación y progresión del daño celular y de la asociación con las enfermedades causadas por las fumonisinas. El mecanismo responsable exacto, no será fácilmente revelado debido a que el papel de los esfingolípidos en la regulación celular es bastante complejo y no se comprende en su totalidad<sup>(54)</sup>.

Las fumonisinas, son agentes no – genotóxicos lo que sugiere que el incremento de riesgo de cáncer ocurre por aumento en la proliferación celular producida por efecto

mitogénico a células blanco o por proliferación celular regenerativa subsecuente a la citotoxicidad. Aunque esta propuesta no es aceptada universalmente, provee los medios de entender la carcinogenicidad de las fumonisinas<sup>(15, 25)</sup>.

## 7. EFECTOS BIOLÓGICOS EN ANIMALES

### **Leucoencefalomalacia equina (LEME).**

Este síndrome se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas licuefactivas de la materia blanca del cerebro. Fue reconocida desde el siglo XIX y se le denominaba "Contaminación del maíz mohoso". En 1971 se reportó el aislamiento de *F. moniliforme* como agente causal de la LEME, posteriormente en 1988, después de la caracterización de las fumonisinas, investigadores reprodujeron la enfermedad en equinos mediante la administración intravenosa de FB<sub>1</sub><sup>(36, 61)</sup>.

Los estudios sugieren que dosis altas de fumonisinas inducen a hepatotoxicidad aguda con lesiones leves en cerebro, mientras que dosis menores causan lesiones severas en cerebro y hepatotoxicidad leve<sup>(24, 34, 56)</sup>.

### **Edema Pulmonar Porcino (EPP).**

En 1989-1990 se reportó un brote de EPP en diversas regiones de Estados Unidos, el cual se atribuyó a la contaminación en el alimento predominantemente con *F. moniliforme*. Diversos autores demostraron que la FB<sub>1</sub> produjo edema pulmonar cuando se administró 175 µg/g por vía intravenosa durante 14 días, mientras que el consumo de dietas contaminadas por fumonisinas en forma natural ocasionó hepatotoxicidad (dosis < 23 µg/g)<sup>(16, 17, 29, 30, 48, 57)</sup>.

### **Toxicidad en aves.**

Se ha encontrado inmunosupresión en pollos alimentados con dietas contaminadas por *F. moniliforme*, además de existir la confirmación del efecto tóxico de la FB<sub>1</sub> en aves de engorda y embriones de pollo cuando los niveles fueron relativamente altos (75-644 µg/g)<sup>(21, 39)</sup>.

El Laboratorio Diagnóstico del Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Veterinarios, recomienda que el alimento no contenga niveles mayores de 5 y 10 µg/g para equinos y cerdos, y de 50 µg/g para bovinos carne y pollos<sup>(74)</sup>.

### **Toxicidad en Humanos.**

Estudios epidemiológicos en Transkei, Sudáfrica, han correlacionado la alta incidencia de cáncer esofágico (CE) de humanos (50-200 casos por cada 100,000 habitantes) con niveles de fumonisinas de 10.2 µg/g en maíz sano y 140 µg/g de maíz mohoso. También existen reportes de alta incidencia de CE en regiones de China, Irán y Charleston, área sur de Carolina en Estados Unidos<sup>(37, 38, 69, 80)</sup>.

Aunque se han realizado estudios con animales de laboratorio en los cuales se utilizó alimento contaminado con *F. moniliforme* o fumonisinas, no se han encontrado lesiones precancerosas o cancerosas en esófago, no existe hasta el momento un modelo animal que apoye la teoría de la relación del hongo con el CE<sup>(35)</sup>.

Además de la diversidad toxicológica por especies de las fumonisinas, como lo es la LEME que se presenta en equinos, el EPP en cerdos, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y cáncer hepático en ratas, es importante considerar la influencia de otros factores, como las nitrosaminas u otros agentes carcinogénicos, como responsables del incremento de la incidencia del CE aunado a la potente actividad promotora de cáncer por las fumonisinas<sup>(47, 58, 64, 77)</sup>.

Un estudio realizado en monos Vervet, los cuales recibieron alimento contaminado con *F. moniliforme* y fumonisinas, mostró la posibilidad que las micotoxinas estuvieran involucradas con otras enfermedades de humanos. En dicho estudio se encontró respuesta aterogénica, relacionada con una respuesta hipercolesterolémica, la cual se presentó con la alimentación de una dieta que contenía 5% de maíz contaminado con *F. moniliforme*. La dosis de fumonisina que consumieron los monos fue de 209 a 547  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo por día. También se encontró en los monos evidencias de daño hepático (elevada actividad de aspartato transaminasa), sugieren los autores que la respuesta aterogénica fue secundaria al efecto hepatotóxico del hongo, sin embargo, estos estudios han intrigado debido a la alta incidencia de arteroesclerosis en la región norte de China donde la alimentación se basa en el maíz no así en el sur de China, donde la dieta se basa en arroz<sup>(13)</sup>.

## **8. CONTAMINACIÓN POR *F. moniliforme* y FUMONISINAS EN EL MAÍZ.**

Existen reportes en diversos países del nivel de contaminación de *F. moniliforme* en maíz amarillo y blanco, en los cuales resulta ser la especie de mayor frecuencia, influyen en esto las condiciones ambientales del año de cosecha y la localización geográfica. En Estados Unidos en el año de cosecha de 1991 se encontró un rango de infección del 28 al 94% por especies de *Fusarium*, con mayor contaminación por *F. moniliforme* en el maíz amarillo, especialmente en el maíz molido, en tanto que durante la cosecha de 1992 se encontró principalmente *F. subglutinans* en maíz blanco, lo cual pudo ser debido a las condiciones húmedas y frías que prevalecieron durante el año, lo que favoreció la invasión de otras especies de *Fusarium*<sup>(8)</sup>.

Estudios realizados en España en granos de maíz, sorgo, trigo y cebada permitieron el aislamiento de 147 cepas del género *Fusarium*, correspondiendo el 87.5% a *F. moniliforme*. Del total de cepas aisladas de la sección Liseola, 34% produjeron

fumonisinias B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en cantidades variables a partir de 5 a 9,600 µg/g de FB<sub>1</sub> y de 1-4,600 µg/g de FB<sub>2</sub><sup>(60)</sup>.

El comportamiento de la contaminación por *F. moniliforme* es variable debido a que existe heterocigocidad dentro de los cultivos de maíz, además de la variación genética dentro de las especies del hongo, así como por las condiciones ambientales; por lo que para el control del hongo es necesario el conocimiento detallado de la asociación de *F. moniliforme* y el cultivo del maíz<sup>(18)</sup>.

El manejo del cultivo pre y post cosecha influye en gran medida en los niveles de contaminación de las fumonisinias, sin embargo, no existen datos suficientes en nuestro país sobre factores climáticos y de manejo agrícola que influyan en la presencia de las micotoxinas en el campo, lo cual debe ser evaluado y validado para cada región agroecológica<sup>(23)</sup>.

Se han realizado en algunos países estudios que han permitido detectar niveles de fumonisinias en alimentos, tal es el caso de Estados Unidos (1988-1991) donde se reportaron intervalos de 0 a 37.9 µg/g de FB<sub>1</sub>, 0-12.3 µg/g de FB<sub>2</sub>, y de 0-4.0 µg/mg de FB<sub>3</sub> durante la cosecha de maíz<sup>(10, 41)</sup>.

Los productos derivados del maíz que han sido analizados incluyen a la harina de maíz, hojuelas de maíz, salvados, tortillas, totopos, palomitas y pan de maíz, en los que se encontró una concentración de fumonisinias menor de 1.0 µg/g en el 70.8% de las muestras y de 2.5 µg/g en el 5.7%.<sup>(12)</sup>

En una investigación realizada con productos obtenidos de supermercados en el área metropolitana de Washington D.C., se encontraron altos niveles de contaminación por fumonisinias en harina de maíz y en el maíz parcialmente molido y bajos niveles en el salvado, hojuelas, cereal de maíz inflado, tortilla, palomitas y

totopos. Resultados similares fueron detectados en países como Canadá, Egipto, Perú, Sudáfrica y Suiza<sup>(8)</sup>.

Dentro de los pocos estudios realizados en México con respecto a *Fusarium moniliforme* y fumonisinas, cabe mencionar lo reportado por Desjardins *et al.*, (1994), donde se encontró predominio de cepas de la población A de *F. moniliforme*, similar a los casos reportados en Estados Unidos; a pesar de que el tamaño de muestra fue pequeño en el estudio realizado en 4 ejidos del Estado de Nuevo León, el 97% de las cepas aisladas tuvieron alto potencial productivo de fumonisinas, con un rango de producción de 10 a 9,000 µg/g. Los resultados reportados en el noreste del país indicaron alto riesgo de contaminación en el maíz mexicano, así como en productos del maíz para consumo humano y animal<sup>(19)</sup>.

En investigaciones desarrolladas en Argentina se evaluó la contaminación por especies de *Fusarium* en diferentes estados de madurez del maíz, se obtuvo *F. moniliforme* como la especie de mayor prevalencia durante las etapas finales de madurez, mientras que *F. proliferatum* se encontró en altos niveles en los estados de madurez intermedios<sup>(71)</sup>.

## 9. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE FUMONISINAS.

En la actualidad se citan 2 métodos de extracción mediante solventes de alta polaridad (metanol/agua o acetonitrilo/agua); seguido de limpieza mediante columna de intercambio iónico (SAX) o vía columna C<sub>18</sub> de fase reversa Sep-Pak<sup>(51)</sup>.

Para la detección de la toxina mediante cromatografía de líquidos o cromatografía de capa fina se requiere derivatización con agentes fluorescentes como fluorescamina, OPA (O-ftalaldehído) o el NAD (2,3 dicarboxialdehído naftaleno), mientras que para cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se requiere la hidrólisis de bases, a fin de remover los grupos de ácidos tricarbóxicos y la derivatización de grupo amino para aumentar la volatilización. La ventaja del método de CG-EM, es

que combina la cuantificación de la fumonisina con la confirmación estructural, desafortunadamente se requiere de tiempo considerable para su determinación<sup>(51, 59, 72)</sup>.

El método de elección para la determinación de fumonisinas en alimentos es mediante cromatografía de líquidos, el cual permite la separación de las fumonisinas FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub> en 16 minutos mediante un sistema de solventes y permite un límite de detección de 50 ng/g<sup>(32)</sup>.

El método de cromatografía de capa fina tiende a separar e identificar eventualmente las fumonisinas, pero es de escasa sensibilidad, siendo el límite de detección de 50 µg/g<sup>(59)</sup>.

Con la creación de la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales en aplicaciones analíticas, particularmente en el terreno de las micotoxinas, se hace posible determinaciones rápidas y confiables de contaminación con métodos de bajo costo. Entre los métodos que utilizan anticuerpos se incluyen las técnicas inmunoenzimáticas (Agri-Screen y Veratox de Noegen), las cuales se basan en la técnica de Ensayo Inmunoabsorbente mediante enzima ligada (ELISA), así como la cromatografía con columnas de inmunoafinidad y detección fluorométrica (Fumonitest de Laboratorios Vicam)<sup>(2, 73, 79)</sup>.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

El efecto que ejercen las micotoxinas en salud animal se manifiesta principalmente por reducción de la ganancia de peso, menor eficiencia alimenticia, inmunodepresión, resistencia tisular disminuida, daños a órganos reproductores, lesiones renales y hepáticas. Todas estas afecciones pueden ocasionar carcinomas, e incluso en casos de intoxicación aguda provocar muerte de animales. La disminución de la eficiencia en la producción animal provoca pérdidas económicas importantes en las explotaciones pecuarias.

Las micotoxinas más comunes son producidas por los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, éste último de gran habilidad para crecer en un amplio rango de sustratos. Entre las especies más estudiadas en la actualidad se encuentra *Fusarium moniliforme*, productor de las fumonisinas, responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además de ser consideradas como potentes promotores de cáncer por la Agencia Internacional de investigaciones contra el Cáncer.

Estudios realizados respecto a la contaminación de fumonisinas en maíz reportan altos niveles de la toxina en diferentes regiones del mundo. En Nuevo León, México, se aislaron cepas de *Fusarium moniliforme* a partir de muestras de maíz, las cuales mostraron alta capacidad productiva de fumonisinas, sin embargo los estudios respecto a la contaminación por el hongo y la micotoxina se limitan a algunas regiones del Noreste de la República Mexicana, mientras que los reportes de brotes de leucoencefalomalacia equina se detectan en diversos estados del país<sup>(24, 61)</sup>.

## VI. JUSTIFICACIÓN

---

Es importante determinar el grado de contaminación por *Fusarium moniliforme* en maíz cultivado en las regiones de alta producción agrícola en el estado de Jalisco, el cual ocupa un lugar importante en la producción nacional.

La afección en el grano del maíz por *F. moniliforme* ocasiona pérdidas tanto en la calidad del maíz durante el cultivo, así como en condiciones de almacenamiento, en ambas circunstancias es posible la producción de fumonisinas, con la consecuente contaminación del alimento destinado al consumo animal, afectándose los parámetros productivos y la salud.

Es por tanto de relevancia, el conocer el grado de contaminación por el hongo *Fusarium moniliforme* y fumonisinas presentes en el maíz que se cultiva en Ameca y Huejotitán Jalisco, localidades consideradas de alta producción de maíz, tomando en cuenta la influencia de las variedades del maíz, la localización geográfica y las condiciones climatológicas en dichas regiones.

## V. HIPÓTESIS

---

Es posible encontrar elevada contaminación por *Fusarium moniliforme* y fumonisinas en el maíz cosechado en Huejotitán y Ameca Jalisco, independientemente de la genética del hongo y de la variedad del cultivo, localización geográfica y condiciones ambientales.

## VI. OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar la incidencia de *Fusarium moniliforme* y fumonisinas en el maíz cultivado en dos localidades del estado de Jalisco.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el porcentaje de incidencia de *F. moniliforme* en maíz blanco cosechado en Huejotitán, municipio de Jocotepec y en Ameca, Jalisco.
2. Determinar los niveles de fumonisinas en las variedades de maíz UDG 600, UDG 601 y UDG 602 durante el cultivo en campo en Ameca, Jalisco, y en el maíz cosechado en Huejotitán, municipio de Jocotepec Jalisco.
3. Establecer si existe relación estadística entre el daño visual de la mazorca, el número de unidades formadoras de colonias (UFCg<sup>-1</sup> de maíz) y los niveles de fumonisinas presentes en el maíz.
4. Valorar la capacidad productiva de las cepas de *F. moniliforme* aisladas en Huejotitán, municipio de Jocotepec bajo condiciones "in vitro".

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

---

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

### 7.1. Detección de *F. moniliforme* y fumonisinas en Huejotitán y Ameca Jalisco.

Localización de área de muestreo (figura 2).

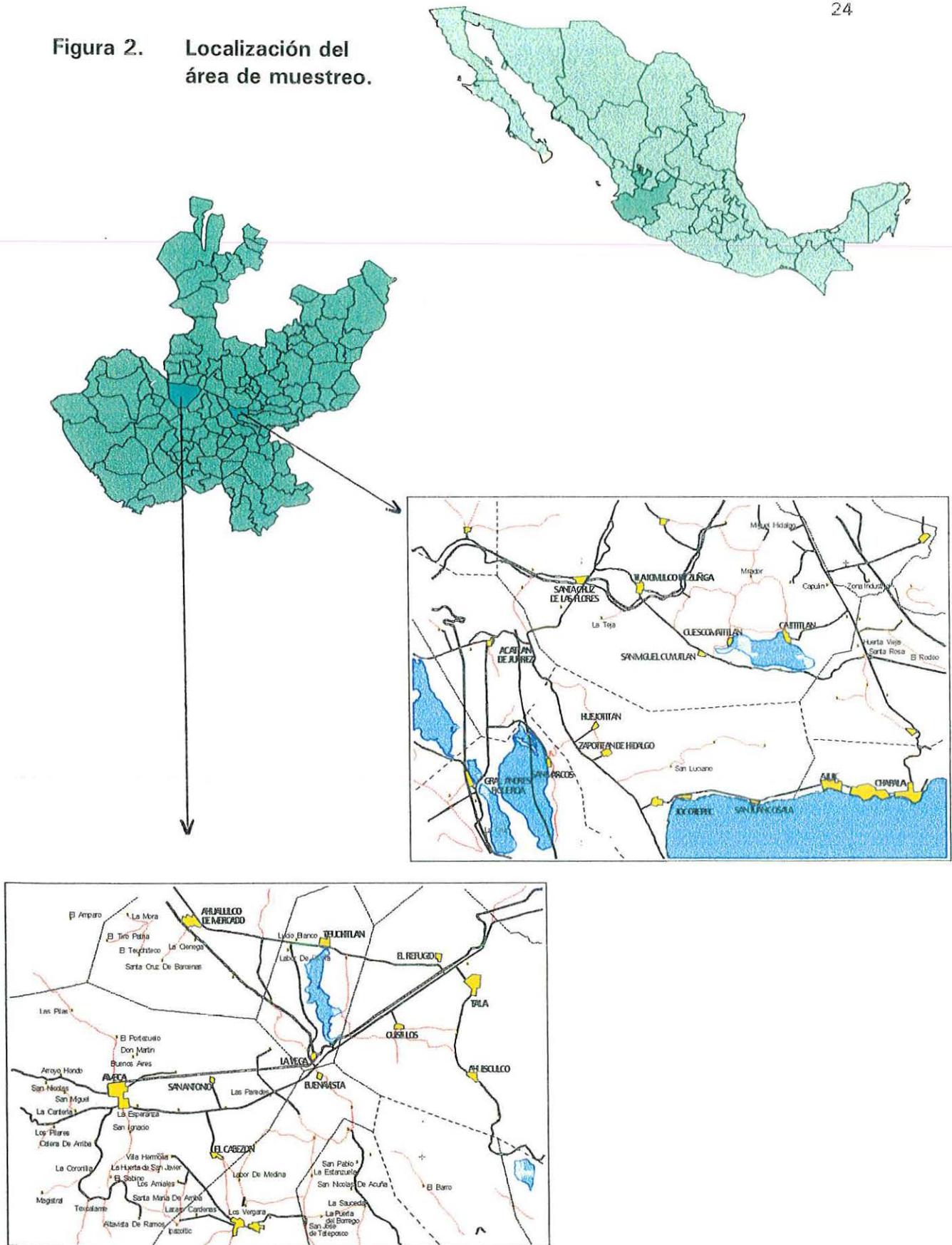
#### A. Obtención y clasificación de las muestras:

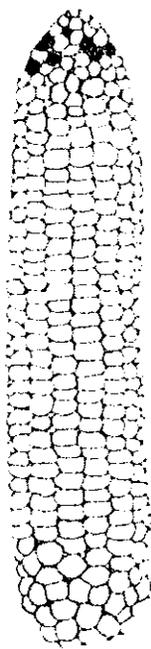
Se procedió a un muestreo aleatorio en 4 parcelas localizadas en Huejotitán municipio de Jocotepec, identificadas como A, B, C y D, ubicadas en un radio aproximado de 3 km de la zona urbana, la cual se encuentra a una latitud norte de 20°21' 24", una longitud oeste de 103° 29' 52" y una altitud de 1552 msnm, obteniendo 10 mazorcas de maíz tipo amarillo semidentado por parcela y se trasladaron al laboratorio para su análisis. El muestreo se realizó al término de la cosecha de Junio – Noviembre de 1996.

En Ameca el muestreo aleatorio se realizó en una parcela localizada en Centro Experimental Agrícola del CUCBA, localizado a una latitud 20°33'N, longitud 104°03'W y altitud de 1225 msnm, donde se obtuvieron 30 mazorcas de las variedades de maíz tipo amarillo semidentado UdG 600, UdG 601 y UdG 602 (n= 90), una vez que alcanzaron la madurez de cosecha se trasladaron en bolsas de papel estraza para su análisis. El estudio se realizó al término de la cosecha de Junio – Noviembre de 1997.

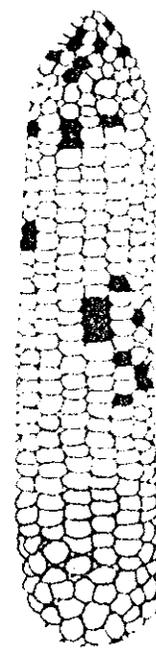
Para el análisis de las muestras, tanto de Huejotitán como de Ameca, Jalisco, las mazorcas se separaron de acuerdo a la clasificación del daño visual descrita por Rodríguez, (1994)<sup>(65)</sup>. Escala que se muestra en la figura 3:

Figura 2. Localización del área de muestreo.

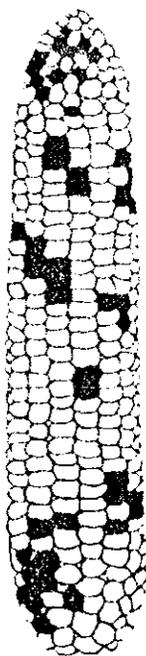




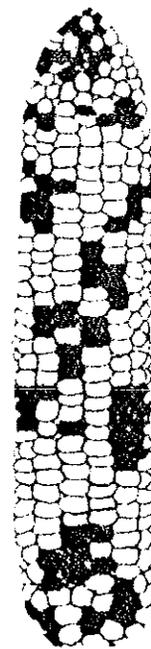
0-2%



2-10%



10-25%



25-50%

Figura 3 Clasificación del daño visual de las mazorcas

## 7.2 Aislamiento e identificación de *F. moniliforme* (figura 4).

1. Se colocó 1 g de muestra en un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril (dilución 1/10 ) y se agitó durante 30 segundos.
2. Se pasó 1 mL de la dilución a un segundo tubo con 9 mL de agua destilada (dilución 1 /100) y se agitó durante 30 segundos, posteriormente se trasladó a un tercer tubo (dilución 1/1000 ).
3. Se agregó 0.1mL de cada dilución sobre el medio selectivo de Nash-Sneider dispersándose con una varilla de vidrio previamente esterilizada. Se prepararon 3 repeticiones por muestra.
4. Se incubó durante 4 a 5 días a una temperatura entre 20 y 25 °C y se procedió a la identificación de la especie y a la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).
5. Se seleccionaron las cajas de petri de la dilución adecuada que mostraron desarrollo entre 10 y 100 colonias, el número de UFC se multiplicó por 10 y por la inversa de la dilución correspondiente.

### Preparación del medio Nash – Sneider:

Contiene:	15.5 g	Difco peptona
	1.0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.5 g	MgSO <sub>4</sub>
	20.0 g	Agar bacteriológico
	1.0 g	Pentacloronitrobenceno (terraclor)
	1000 mL	Agua destilada

El medio es ajustado a un pH de 5.5 a 6.5 con HCL 0.1 N, se esterilizó en autoclave a 15 lb durante 20 minutos, posteriormente se le agregó 20 mL de sulfato de estreptomycin en solución (5 g de estreptomycin, 750 unidades de estreptomycin base/mg en 100 mL de agua destilada) y 12 mL de sulfato de neomicina en solución (1 g de sulfato de neomicina, 702 mg de neomicina base/mg en 100 mL de agua

destilada) por cada litro, posteriormente se distribuye a las cajas de petri previamente esterilizadas.

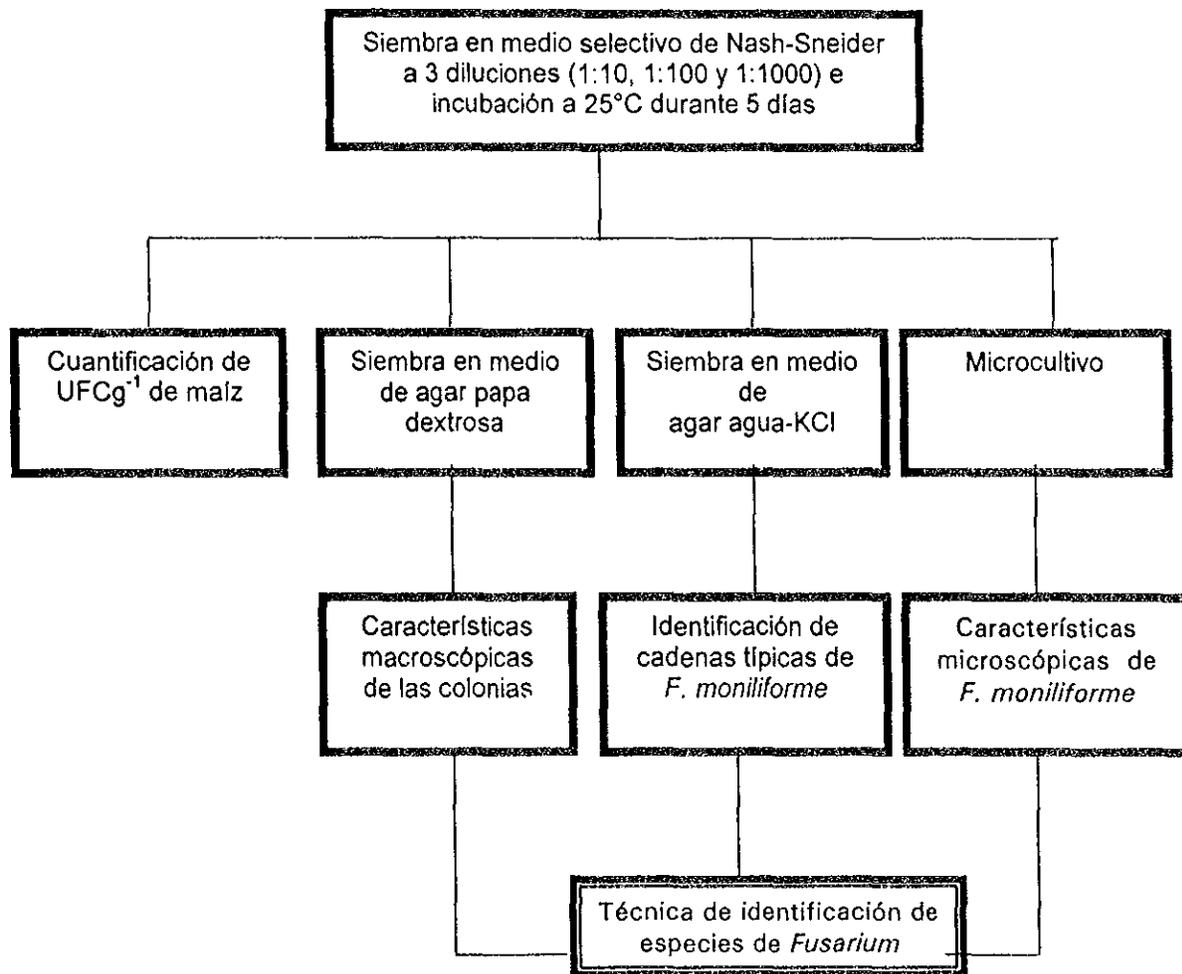
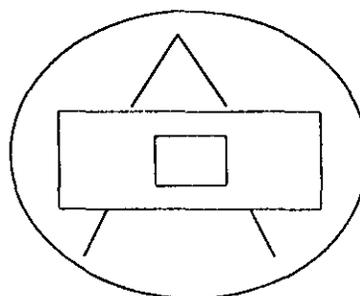
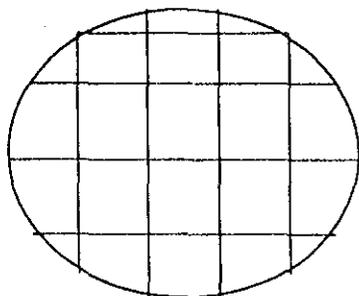


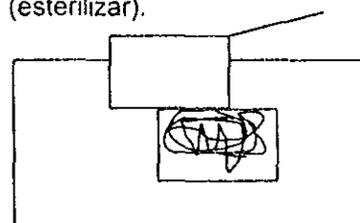
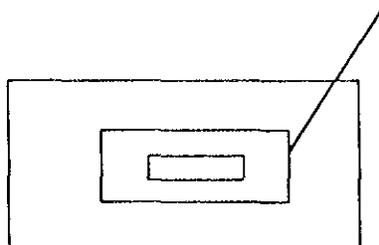
Figura 4. Aislamiento e identificación de *F. moniliforme*<sup>(45)</sup>

La identificación de la especie se realizó a partir de las colonias aisladas en el medio selectivo para especies de *Fusarium*, las cuales se seleccionaron por sus características típicas de crecimiento descritas en el Manual de Nelson (1983), y se resembraron en papa dextrosa con agar, en agar agua- KCl (5 g de KCl + 15 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada) y en microcultivo<sup>(40)</sup> (figura 5).



1) Preparar medio base agar papa dextrosa (cortar en cuadros)

2) Colocar en caja de petri una varilla doblada sobre una gasa, además de un portaobjeto y cubreobjeto (esterilizar).



3) Colocar el bloque de agar sobre el portaobjetos y sembrar la muestra fungal, poner cubreobjetos, agregar 10 mL de agua destilada estéril e incubar 8 días.

4. Se retira el cubreobjeto y el medio de agar y sobre el crecimiento del hongo en el portaobjetos y cubreobjetos se tiñe con azul de lactofenol.

**Figura 5. Técnica y tinción para el microcultivo<sup>(40)</sup>.**

### 7.3 Cuantificación de fumonisinas (figura 6):

La detección y cuantificación se realizó mediante la técnica de cromatografía por inmunoafinidad y detección Fluorométrica<sup>(79)</sup>, que consistió en lo siguiente:

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en una jarra para licuadora.
2. Se agregaron 100 mL de metanol al 80% y licuaron a alta velocidad durante 1 min.
3. Se pasó a través de un filtro aflautado y se colectó en un vaso de precipitado.
4. 10 mL del extracto filtrado se diluyeron con 40 mL de solución de lavado de micotoxinas.
5. Se filtró el extracto diluido a través de filtro microfibra y 10 mL del extracto filtrado se agregaron a la columna de Fumonitest.
6. Se lavó dos veces la columna con 10 mL de solución buffer PBS al 0.1%.
7. Se realizó la elución de las fumonisinas con 1 mL de metanol grado HPLC y colectó en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro.
8. Se agregó 0.5 mL de reactivo O-ptaldehído y 0.5 mL del reactivo Mercaptoetanol (reveladores). La lectura de la concentración de fumonisinas se realizó a los 240 segundos.

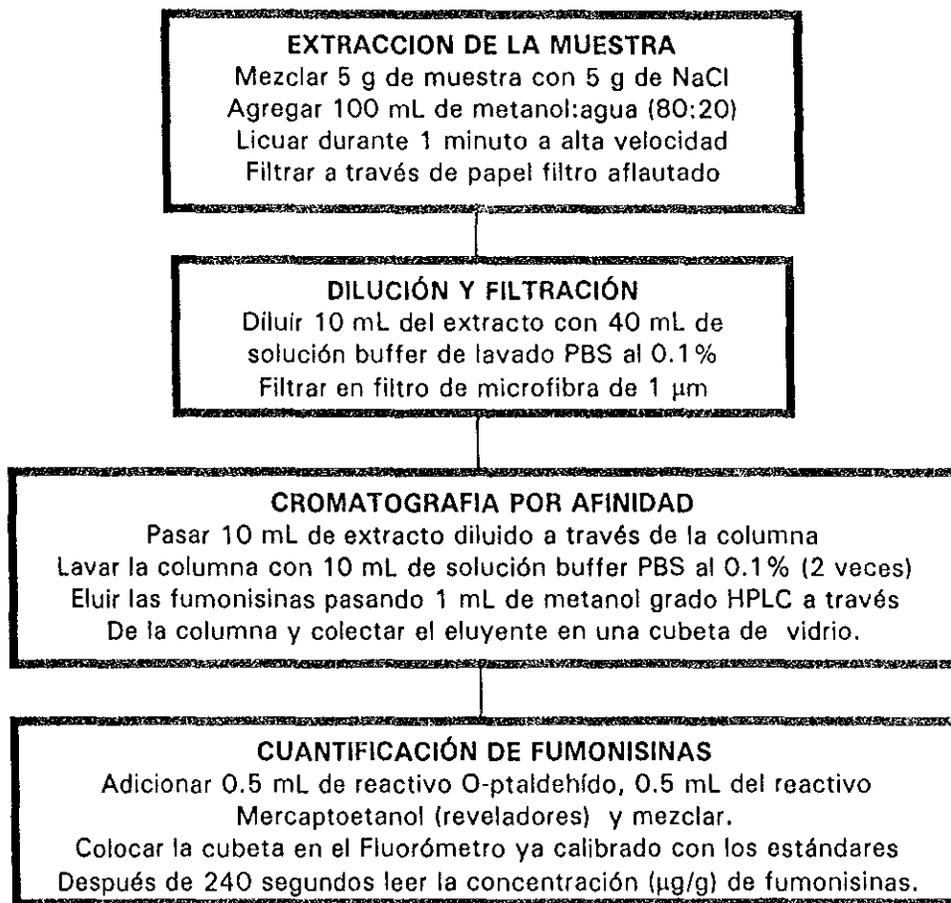


Figura 6. Determinación de fumonisinas mediante Cromatografía por Inmunoafinidad y detección Fluorométrica<sup>(79)</sup>.

#### 7.4 Valoración de la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de *F. moniliforme* aisladas en Huejotitán, Jalisco (figura 7).

##### Preparación del inóculo:

1. Una vez identificadas las cepas de *F. moniliforme* se procedió a la recuperación de conidios en medio de cultivo agar extracto de malta y dejó incubar 10 días a 25 °C, obteniendo el micelio aéreo mediante agua destilada estéril, posteriormente se agregaron a 40 mL de medio líquido pre-enriquecido de agar extracto de malta e incubó en agitación orbital (100 rpm) durante 24 horas a 25

°C, posteriormente se preparó el inóculo ( $10^7$  conideas) previa cuantificación de conidios y agregó al fermentador.

2. En un matraz Erlenmeyer de 300 mL de capacidad con tapón de gasa (fermentador) se colocaron 40 g de maíz parcialmente molido y se agregaron 11 mL de agua destilada, dejando 1 hora para después esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 30 minutos. Una vez realizada la inoculación de las cepas de *F. moniliforme* se dejó incubar en la oscuridad durante 30 días a 25 °C.

#### **Extracción y limpieza de los extractos:**

1. 15 g de muestra se colocaron en una botella de boca ancha con 100 mL de acetonitrilo: agua (50 :50) y se agitaron durante 30 minutos.
2. Se tomó una alícuota de 10-25 mL de extracto, decantó y filtró.
3. Se acondicionó una columna C-18 con 5 mL de metanol, seguido por 5 mL de cloruro de potasio al 1%; 2 mL del extracto filtrado se combinaron con 5 mL de cloruro de potasio al 1% y se aplicaron a la columna, posteriormente se lavó con 5 mL de cloruro de potasio al 1% seguido por 2 mL de acetonitrilo: cloruro de potasio al 1% (1 :9).
4. Las fumonisinas se diluyeron con 4 mL de acetonitrilo :agua (7 :3), la columna se evaporó y secó con aire caliente.

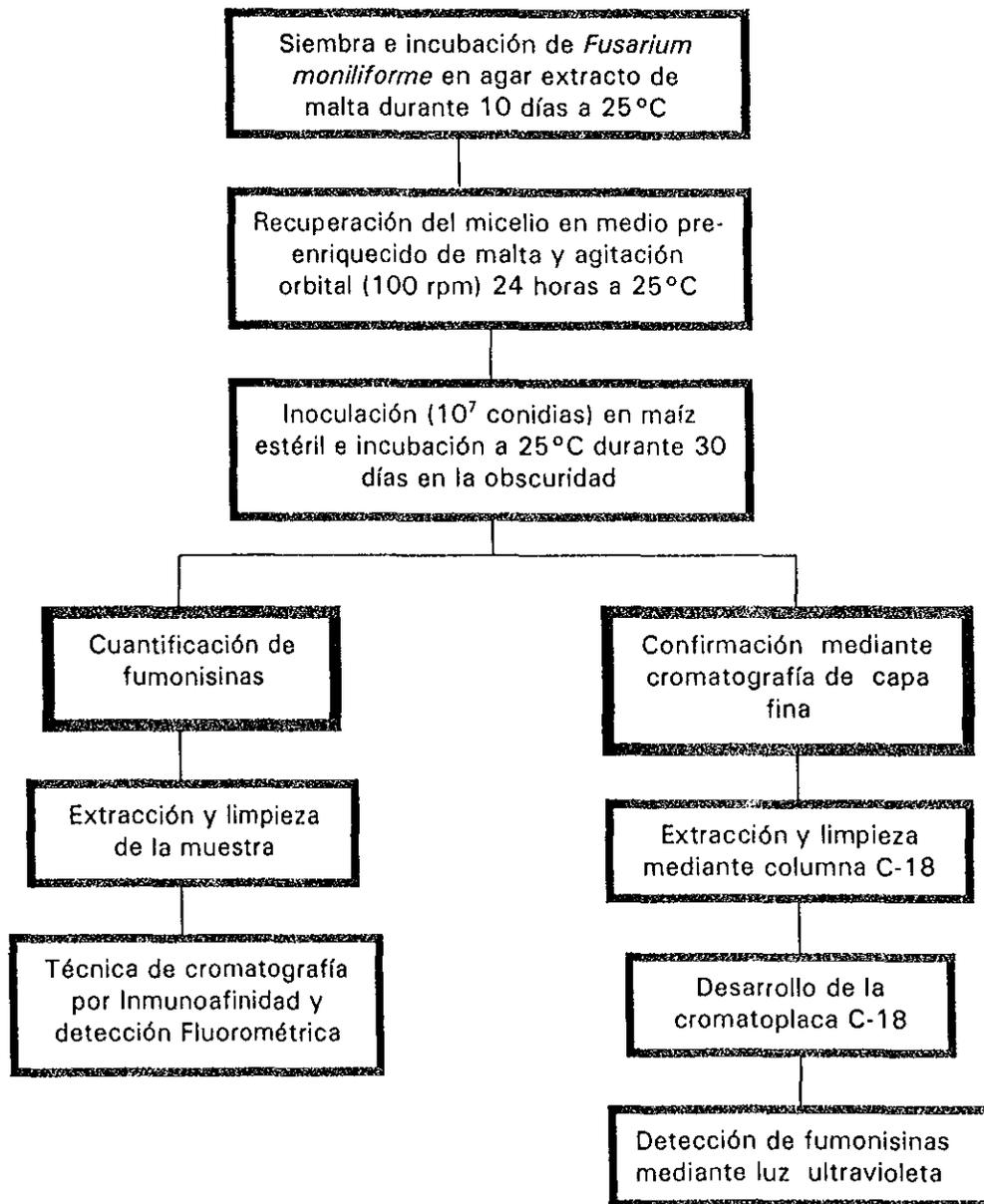


Figura 7. Valoración de la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de *F. moniliforme* aisladas en Huejotitán, Jalisco.

### **Detección mediante Cromatografía de capa fina.**

1. El residuo de la muestra se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo :agua (50 :50) y 10  $\mu\text{l}$  se aplicaron a la placa de cromatografía C-18, así como 10  $\mu\text{l}$  del estándar de  $\text{FB}_1$  (5, 10, 100  $\mu\text{g/g}$ ) disuelto en acetonitrilo :agua (50 :50).
2. La placa se desarrolló en metanol:cloruro de potasio al 1% (60 :40), se secó al aire y aplicó buffer de borato de sodio al 0.1 M (pH 8-9) seguido de fluorescamina (0.4 mg/mL de acetonitrilo); 1 min después se aplicó acetonitrilo:ácido bórico (60 :40) y secó a temperatura ambiente. El examen se realizó bajo luz ultravioleta con longitud de onda de 254 y 366 nm realizándose la detección de forma cualitativa.

### **Cuantificación de fumonisinas mediante cromatografía por afinidad<sup>(70)</sup>:**

Se realizó la cuantificación de fumonisinas por la técnica descrita en la figura 6, la cual se modificó para la determinación de niveles mayores a 100  $\mu\text{g/g}$ . La modificación consistió en diluir el extracto en 49 mL de solución buffer, del cual se tomó 1 mL (equivalente a 0.01 g de muestra) y se pasó por la columna, procediendo al lavado en forma similar a la técnica descrita previamente, al término de la determinación en el fluorómetro el resultado se multiplicó por 100.

### **Análisis Estadístico.**

Para el estudio estadístico del desarrollo de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de maíz se utilizó el análisis de varianza, y se aplicó la prueba de Tuckey. La valoración de la capacidad productiva de fumonisinas se analizó como variable descriptiva expresada en una tabla de frecuencias, para lo que se estableció las clases de acuerdo al intervalo máximo y mínimo de fumonisinas en  $\mu\text{g/g}$ . El estudio de correlación estadística entre el daño visual de la mazorca y los niveles de fumonisinas se analizó mediante la elaboración de una tabla de contingencia y se aplicó la prueba de Chi cuadrada<sup>(66, 68)</sup>.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 *F. moniliforme* en el maíz de Huejotitán, Jalisco.

La clasificación del daño visual (DV) de las mazorcas en el total de las muestras se observa en el cuadro No. 2 resaltando que el mayor porcentaje de las muestras mostraron un daño menor a 10% y sólo una muestra presentó daño marcado (> 25%). El desarrollo de UFC de maíz en medio selectivo de Nash Sneider permitió observar elevado número de colonias en todos los grupos según el daño visual, el promedio de UFC g<sup>-1</sup> para aquellas con daño < 2% fue de 22,422 UFCg<sup>-1</sup>, 42,157 UFCg<sup>-1</sup> (2-10%); y 418,333 UFCg<sup>-1</sup> (DV 10-25%). Puesto que el grupo con mayor DV mostró sólo una observación, no se consideró para su comparación. El análisis de varianza se realizó mediante la transformación logarítmica de los valores de unidades formadoras de colonias siendo similares estadísticamente entre grupos ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 2. Clasificación del daño visual de las mazorcas y UFCg<sup>-1</sup> de maíz cosechado en Huejotitán, Jalisco.**

Daño visual (DV) de la mazorca (n)	% de muestras	<i>F. moniliforme</i> % Positivas	Rango de UFCg <sup>-1</sup>	Promedio	Desviación Estándar
< 2 % (9)	45	78	300 – 80,000	22,422	33,255
2 – 10 % (7)	35	86	3,000 – 90,000	42,157	56,843
10 – 25 % (3)	15	100	5,000 – 1'160,000	418,333	643,707
25 – 50 % (1)	5	-	-	8,000	-

*F. moniliforme* se aisló en todos los grupos excepto en el grupo con DV 25-50%, el porcentaje de aislamiento fue de 78% y 86% en los grupos con DV < 2% y 2-10 %, mientras que se aisló en el 100% en las muestras con daño mayor (DV 10-25%).

La identificación de *F. moniliforme* se realizó mediante la observación de las características macroscópicas de crecimiento de las colonias en papa dextrosa con agar, así como por las características morfológicas y microscópicas y la formación de las cadenas típicas de microconidios observadas en el microscopio compuesto (figura 8).

En el medio de cultivo agar papa dextrosa se produjeron 4 tipos de pigmentaciones, las más comunes fueron el rojo carmín (8%), violeta oscuro (22%), violeta pálido (33%) y lila (37%).

Las cepas en el medio de cultivo de agar cloruro de potasio formaron abundantes cadenas de microconidios, que es una de las características morfológicas distintivas de esta especie de *Fusarium*. Las cadenas se pudieron distinguir con mayor facilidad a partir del microcultivo en el microscopio compuesto, observándose micelio hialino de crecimiento rápido, septado con abundantes ramificaciones, conidióforos simples y ramificados, microconidios hialinos unicelulares, ovales, producidos en forma individual, en falsas cabezas o en cadenas largas y microconidios hialinos, falcados con 3 a 5 septas producidos en fialides simples y esporodoquios (Figura 9). Estas características morfológicas y de cultivo son de valor taxonómico para la identificación de la especie *F. moniliforme*.

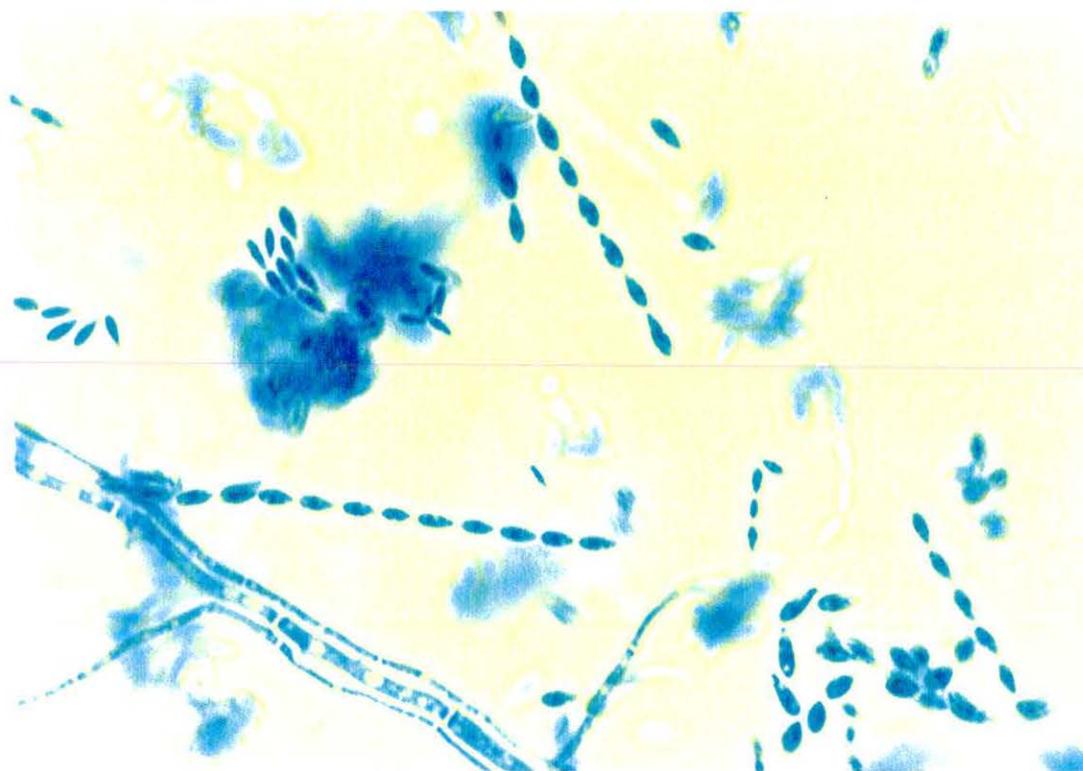


Figura 8. Cadenas de microconidios típicas de *Fusarium moniliforme*.

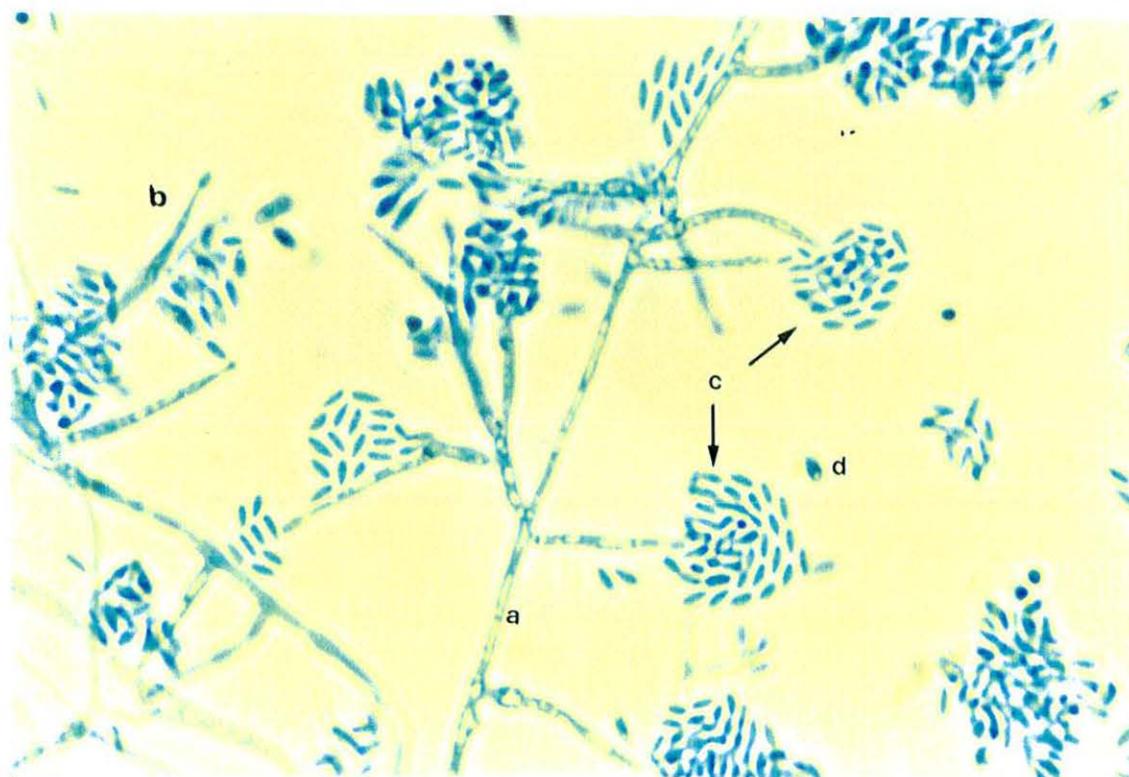


Figura 9. *Fusarium moniliforme* a) micelio hialino septado, b) monofialides, c) microconidios en falsas cabezas y d) microconidios ovoides.

## 8.2 *F. moniliforme* en el maíz de Ameca, Jalisco.

La clasificación del daño visual de las mazorcas permitió detectar alto porcentaje de mazorcas aparentemente sanas en las variedades UDG 600 y 602 (70%), mientras que la variedad UDG 601 sólo presentó el 40% de mazorcas aparentemente sanas, no se encontraron mazorcas con daño entre 10 y 25% ni con daño mayor del 50% (Cuadro 3).

El cultivo en medios selectivos permitió el aislamiento de *Fusarium moniliforme* en el 90% de las mazorcas de la variedad UDG 600 y en el 100% de las muestras de las variedades UDG 601 y 602, las características de cultivo en medio de APD mostraron menor variación en la pigmentación, encontrándose principalmente tonalidades lila (65%) y violeta (35%). La morfología del hongo mostró características similares a las encontradas en las cepas aisladas de Huejotitán.

**Cuadro 3. Clasificación del daño visual de las mazorcas en las variedades de maíz UDG 600, 601 y 602 en Ameca, Jalisco (% de muestras).**

DAÑO VISUAL (%)	UDG 600 % de muestras	UDG 601 % de muestras	UDG 602 % de muestras
0 – 2	70	40	70
2 – 10	30	40	10
25 – 50	0	20	20

El elevado porcentaje de muestras aparentemente sanas no se considera determinante sobre la inocuidad del maíz, ya que la variedad con mayor número de mazorcas sanas presentó el 100% de incidencia de *F. moniliforme*, mientras que en las variedades con mayor número de mazorcas dañadas la incidencia del hongo fue menor.

El desarrollo de unidades formadoras de colonias en el maíz fluctuó de 8 a 52,571 UFCg<sup>-1</sup>, siendo los valores promedio de 2,826.4, 5,442.3 y 6,579.5 UFCg<sup>-1</sup> en las variedades UDG 600, 601 y 602 respectivamente (Cuadro 4), no se encontró diferencia estadística entre las variedades de maíz, para dicho análisis fue necesaria la transformación logarítmica de los datos.

**Cuadro 4. Desarrollo de UFCg<sup>-1</sup> de maíz en las variedades UDG 600, 601 y 602 en Ameca, Jalisco.**

	UDG 600	UDG 601	UDG 602
Promedio	2,826.4	5,442.3	6,579.5
Desviación estándar	6,127	14,128	16,221
Máximo	20,000	43,538	52,571
Mínimo	27	8	83

### 8.3 Fumonisinias presentes en el maíz de Huejotitán y Ameca, Jalisco.

Los niveles de fumonisinias detectados en la variedad de maíz cosechada en las 4 parcelas de Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco, fluctuaron en un rango de 8.5 µg/g a 17 µg/g, con un valor promedio de 10.2 µg/g. Cuando se compararon de acuerdo al daño visual los niveles promedio fueron de 10.13, 10.55, 9.33 y 11 µg/g en los grupos A, B, C y D respectivamente, similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ) (cuadro 5). En Ameca se detectaron en el total de las muestras de maíz, sin encontrarse diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre variedades, los niveles promedio fueron de 6.6 µg/g para la variedad UDG 600, 6.12 µg/g para la UDG 601 y 6.78 µg/g para la variedad UDG 602. La comparación de los niveles promedio entre ambas localidades mostró diferencia estadística a un nivel de significancia  $p < 0.05$ .

Al agruparse las muestras de Ameca de acuerdo al DV de las mazorcas independientemente de la variedad de maíz, los niveles promedio fueron de 6.27, 8.3 y 9.05 en los grupos A, B y D respectivamente, sin que se encontrara diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre los grupos.

Cuando se analizó si se presentaba relación estadística de los niveles de fumonisinas con daño visual y UFC  $g^{-1}$ , sólo se valoró para los grupos A, B y C en Huejotitán y en Ameca los grupos A, B y D.

En Huejotitán se observó que a mayor DV en mazorcas mayor desarrollo de UFC  $g^{-1}$  sin que existiera diferencia estadística ( $p > 0.05$ ), sin embargo los niveles de fumonisinas fueron similares en todos los grupos, sin que se considerara el grupo D por presentarse una observación. En Ameca el estudio de relación entre el DV y el desarrollo de UFC  $g^{-1}$  permitió detectar diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) mediante el análisis de varianza y una relación positiva que indica que a mayor daño visual se incrementa el desarrollo de unidades formadoras de colonias sin que fuera significativa la relación entre el DV y los niveles de fumonisinas de manera similar que en Huejotitán.

**Cuadro 5. Relación entre daño visual de la mazorca, UFCg<sup>-1</sup> y niveles de fumonisinas en maíz cosechado en Huejotitán y en Ameca, Jalisco.**

DANO VISUAL	HUEJOTITAN				AMECA			
	UFCg <sup>-1</sup>	Desviación Estándar	FUM µg/g	Desviación Estándar	UFCg <sup>-1</sup>	Desviación Estándar	FUM µg/g	Desviación Estándar
< 2% A (n)	22,422 (9)	31,353	10.21	1.18	1,968.64 a(18)	4,533	6.27	4.68
2-10% B (n)	42,157 (7)	52,000	10.55	2.83	1,884.50 a (8)	987	8.3	654
10-25% C (n)	418,333 (3)	52,584	9.33	0.478	-	-	-	-
25-50% D(n)	8000 (1)	-	11.00	-	24,343.71 b (4)	23,925	9.05	4.8

FUM = fumonisinas

Las literales indican diferencia estadística  $p < 0.05$ .

Al comparar las dos localidades se observó mayor desarrollo de UFCg<sup>-1</sup> en Huejotitán, lo cual coincide con una fluctuación pluvial de la época de cultivo (figura 12), lo que favoreció además que se presentaran mayores niveles de fumonisinas en todos los grupos. En Ameca las condiciones climatológicas fueron favorables al cultivo durante los 3 primeros meses del cultivo al presentarse una precipitación pluvial entre 60 – 90 mm (figura 10), lo que pudo influir en un menor desarrollo de UFCg<sup>-1</sup>.

La valoración de las condiciones ambientales en ambas localidades se presentan en las figuras 10 – 13, donde se aprecian fluctuaciones en la precipitación pluvial, en tanto que las temperaturas registradas fueron similares, debiéndose considerar que en Huejotitán en estudio se desarrolló durante la cosecha de 1996 y en Ameca en 1997.

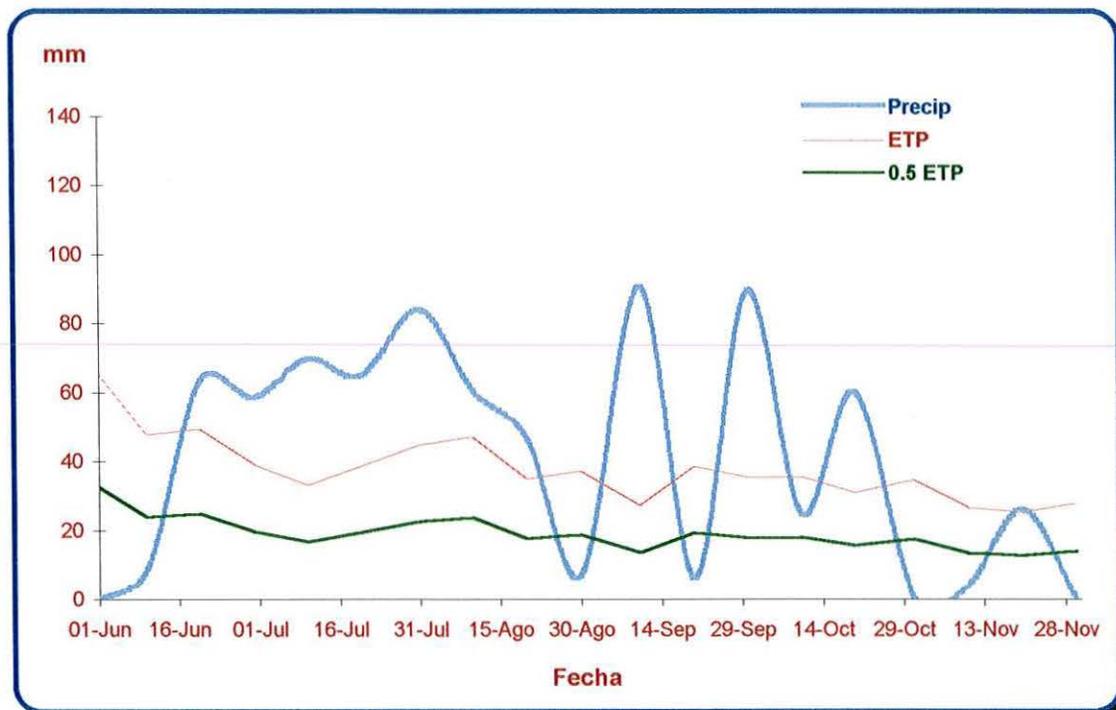


Figura 10. Precipitación y evaporación acumuladas de Junio a Noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco.

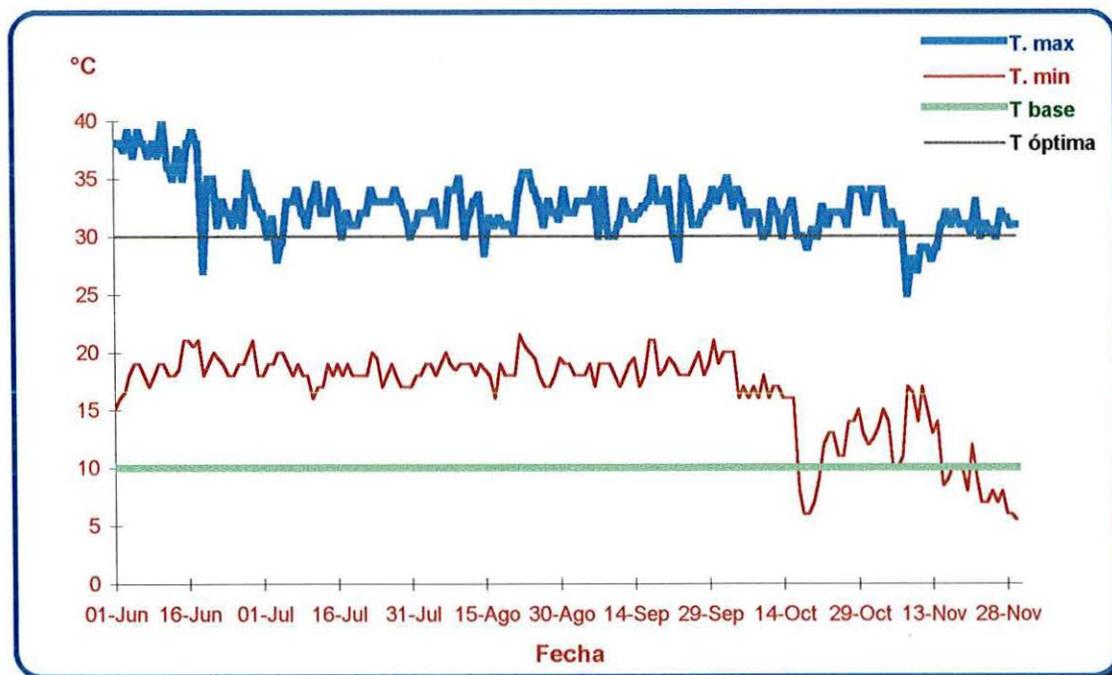
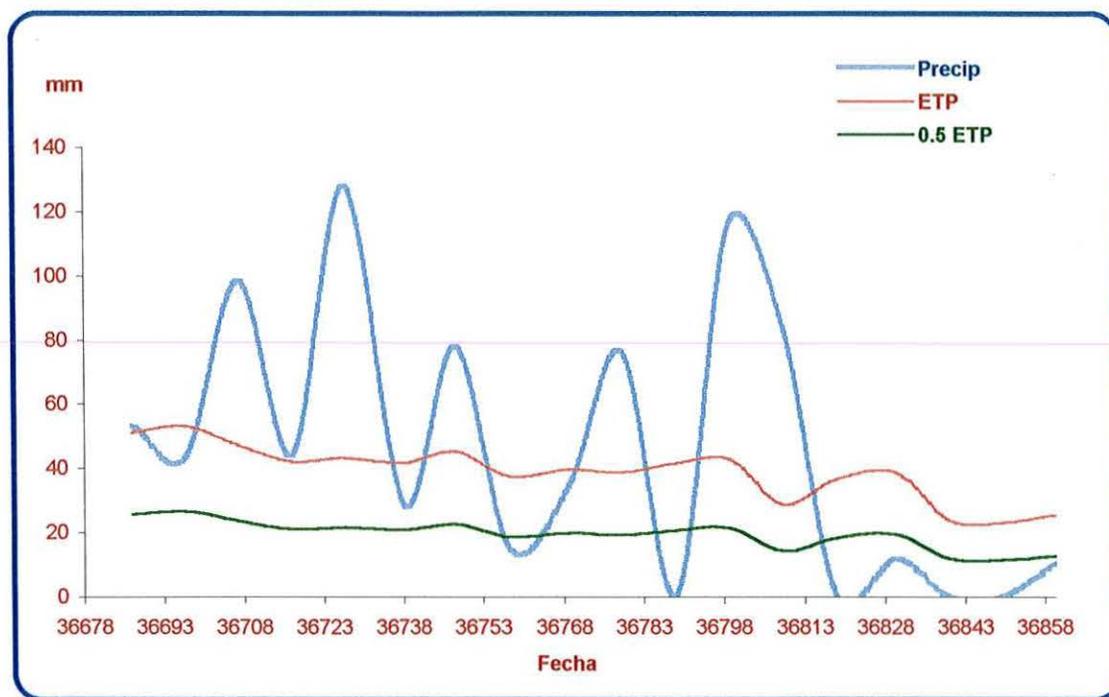
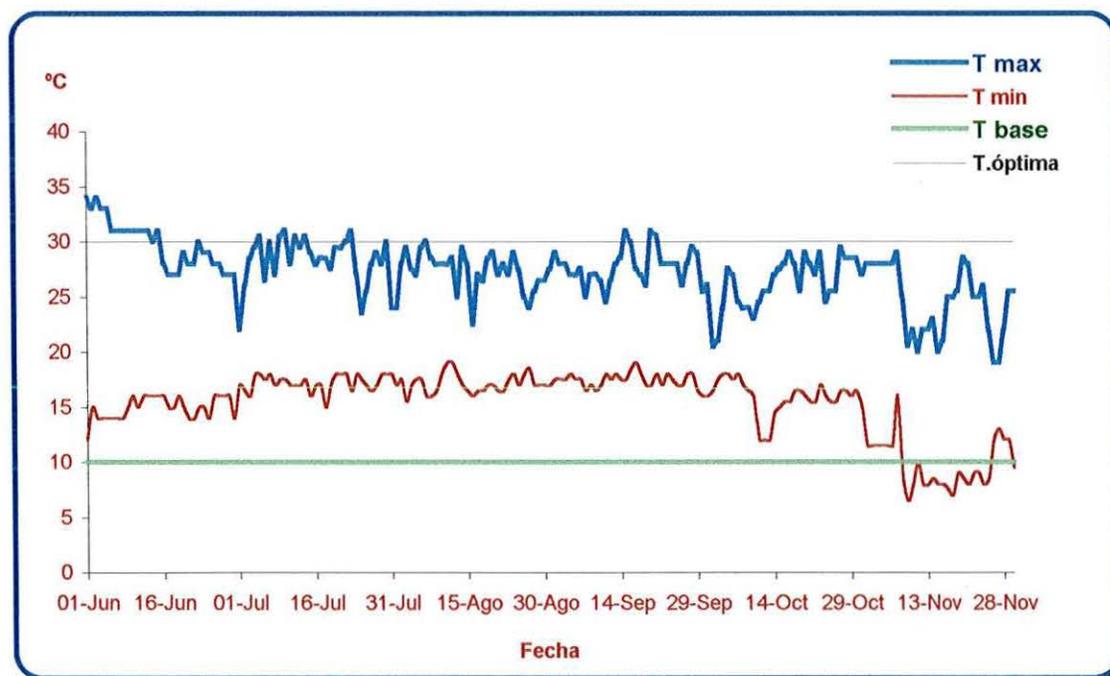


Figura 11. Temperaturas máximas y mínimas registradas de Junio a Noviembre de 1997 en Ameca, Jalisco.



**Figura 12. Precipitación y evaporación acumuladas de Junio a Noviembre de 1996 en Huejotitán, Jalisco.**



**Figura 13. Temperaturas máximas y mínimas registradas de Junio a Noviembre de 1996 en Hujotitán, Jalisco.**

#### 8.4 Capacidad productiva de fumonisinas.

Los resultados de la producción de fumonisinas por las cepas aisladas del maíz se presentan en el Cuadro 6, siendo el 93.8% de las cepas (15/16) productoras de fumonisinas, con mínimo de 700  $\mu\text{g/g}$  y máximo de 2,280  $\mu\text{g/g}$ , encontrándose que el 80% de las cepas tuvieron una producción mayor de 1000  $\mu\text{g/g}$ .

**Cuadro 6. Capacidad productiva de fumonisinas por cepas de *F. moniliforme* aisladas en el maíz de Huejotitán, Jalisco.**

Rango ( $\mu\text{g/g}$ )	Cepas positivas/total	Porcentaje	Frecuencia acumulada (%)
2001-2500	3/15	20	13.3
1501-2000	3/15	20	60
1001-1500	7/15	46.7	80
700-1000	2/15	13.3	100

## IX. DISCUSIÓN

---

La incidencia de *F. moniliforme* en el maíz cosechado en Huejotitán y Ameca, Jalisco fue elevada en ambas localidades independientemente de la variedad de maíz y del daño visual de las mazorcas, lo que coincide con otros estudios donde se encontraron niveles de 64 a 100% aún en maíz aparentemente sano<sup>(63)</sup>.

La identificación de la especie de *Fusarium* permitió observar gran variedad de pigmentación en las colonias, lo cual se ha descrito en los manuales de identificación de especies de *Fusarium*<sup>(11, 45)</sup>, cabe mencionar que estas variaciones macroscópicas no influyen sobre las características morfológicas microscópicas. Por otra parte, las variaciones y la tonalidad e intensidad de la coloración de los cultivos dependen además del genotipo, la edad de la colonia y las condiciones de luz y temperatura<sup>(6)</sup>. *Fusarium* es un género muy variable, que se adapta mediante cambios morfológicos y fisiológicos a las variaciones del medio donde se desarrolla<sup>(45)</sup>.

Respecto al desarrollo de UFCg<sup>-1</sup>, indicativo del grado de infección del grano, se encontraron elevadas cuentas de colonias tanto en Ameca como en Huejotitán, sin embargo, en esta última localidad se presentó amplio rango en los valores en cada grupo, lo que pudo influir sobre el análisis de relación estadística. El mayor desarrollo de unidades formadoras de colonias que se observó en Huejotitán en todos los grupos pudo ser determinado por las variaciones climatológicas que causan estrés en el cultivo y que favorecen el desarrollo de hongos fitopatógenos y la producción de micotoxinas<sup>(9)</sup>.

Viquez *et al*, (1996)<sup>(75)</sup>., reportan el análisis microbiológico realizado en las regiones de Brunca, Huetar Norte y Huetar Atlántica en Costa Rica, en las cuales se observa la presencia de *F. moniliforme* en el 86% de las muestras de maíz, con niveles promedio de 912 UFCg<sup>-1</sup> y un intervalo de 0.0 a 32,359.4 UFCg<sup>-1</sup> existiendo

significancia estadística ( $p < 0.05$ ) en la región de Huetar Atlántica, la cual mostró los mayores niveles de contaminación del hongo posiblemente debido a diferencias en las técnicas de cosecha ya que dicha región se caracteriza por prácticas agrícolas pobres además de otras como la fase de recolección y las condiciones de almacenamiento. Durante la estación de cultivo se presentaron además condiciones ambientales que mostraron drástica variación especialmente en los meses de marzo a agosto, lo que produjo estrés fisiológico en los cultivos<sup>(75)</sup>.

La comparación de la incidencia de *F. moniliforme* en cultivos de maíz en diferentes años de cosecha y países como Argentina, Estados Unidos, Italia y Sudáfrica permitió observar alta incidencia del hongo, siendo predominante en áreas calurosas, húmedas y donde se presenta con frecuencia pudrición de la mazorca. Relacionado con la distribución del hongo se observó que la contaminación con fumonisinas en maíz parece ser menor en climas fríos como en los países del norte de Europa y en Canadá<sup>(65)</sup>.

En México se ha reportado alta incidencia de pudrición de la mazorca, entre los estados más involucrados se encuentra Jalisco, dicha enfermedad causa daños más severos cuando se presentan lluvias fuertes y permanentes, desde la etapa de espigamiento hasta la cosecha<sup>(23)</sup>, condiciones que prevalecieron en Huejotitán.

El presente estudio se realizó en dos regiones de características climáticas semihúmedas similares, con lluvia estacional en verano, sin embargo durante la época de cultivo en Huejotitán se presentaron variaciones pluviales en todos los meses de la época de lluvias, mientras que en Ameca las variaciones sólo se presentaron durante los meses de septiembre y octubre. Las características ambientales presentes en la primera localidad se considera estresantes al cultivo, factores abióticos que favorecen el desarrollo del hongo durante la etapa previa a la madurez fisiológica de la planta de maíz, la cual se presenta entre los 45 y 60 días después de la floración<sup>(14)</sup>.

Las temperaturas registradas en ambas localidades durante la época de estudio fueron similares, manteniéndose para Huejotitán en un promedio de 25° C y en Ameca de 30° C, temperaturas que se consideran óptimas para el desarrollo de *F. moniliforme*<sup>(42)</sup>.

El grado de infección del germen de maíz por *F. moniliforme* y la subsecuente contaminación de fumonisinas en el maíz y sus productos para consumo humano y/o animal ha llegado a ser un fenómeno crónico de amplia distribución mundial<sup>(20)</sup>.

Los niveles detectados de fumonisinas en el maíz de Huejotitán y Ameca se consideran elevados ya que los niveles reportados en maíz entero en países como Estados Unidos indican niveles por debajo de 1 µg/g<sup>(70)</sup>. Sin embargo Castelo *et al.*, (1998), encontraron en maíz amarillo niveles de 2.3 µg/g de fumonisina B<sub>1</sub> mediante la detección por HPLC, mientras que por la técnica CD-Elisa se presentaron en un rango de 0.5 a 4.75 µg/g de fumonisinas totales<sup>(12)</sup>.

Características específicas de los genotipos de maíz (líneas consanguíneas e híbridos) tales como el tipo endospermo y la clase de madurez (FAO) han sido evaluadas para determinar su influencia sobre la contaminación con fumonisinas y su acumulación en maíz, reportándose mayor producción en el maíz de tipo dentado, contaminación intermedia en el maíz semidentado y baja en el de tipo cristalino. No encontrándose relación entre el contenido de fumonisinas y el ciclo vegetativo del genotipo de maíz en los diferentes países, sin embargo cuando se consideraron los datos en forma global (países del centro y oeste de Europa y países africanos) se pudo observar cierta tendencia a presentarse mayor contaminación conforme se prolonga el ciclo vegetativo<sup>(20)</sup>.

Los niveles de fumonisinas en maíz no implicados con micotoxicosis son variables, encontrándose mayores niveles en el maíz molido o parcialmente molido<sup>(67)</sup>. Shephard *et al.*, (1996), reportan niveles elevados en maíz entero o en sus

subproductos durante diferentes cosechas y países, resaltando la contaminación encontrada en Estados Unidos a partir de maíz entero durante la cosecha de 1992-93, la cual mostró alto porcentaje de muestras positivas (233/234), con niveles de fumonisinas  $\leq 5 \mu\text{g/g}$  ( $n=223$ );  $5-10 \mu\text{g/g}$  ( $n=9$ );  $10-25 \mu\text{g/g}$  ( $n=1$ ), mientras que en maíz molido de la misma cosecha los resultados que se presentaron fueron ( $55/55$ )  $\leq 5 \mu\text{g/g}$  ( $n=33$ );  $5-10 \mu\text{g/g}$  ( $n=2$ );  $10-25 \mu\text{g/g}$ : ( $n=24$ ) y  $>$  de  $25 \mu\text{g/g}$  ( $n=26$ )<sup>(65)</sup>.

Las implicaciones económicas de la contaminación de fumonisinas en alimentos de animales son relevantes especialmente si la contaminación ocasiona la muerte del ganado. Se han reportado niveles de fumonisinas en alimento relacionados con brotes de enfermedades de animales. Entre los niveles implicados con leucoencefalomalacia equina se reportan en maíz niveles en un rango de  $10-23 \mu\text{g/g}$  (1992-93) y en alimento a base de maíz  $< 1 - 126 \mu\text{g/g}$  (1989-90). Los niveles de la toxina implicados con brotes de EPP se presentaron en un rango de  $3-330 \mu\text{g/g}$  y un nivel promedio de  $76 \mu\text{g/g}$  en maíz entero y molido, mientras que en alimento base maíz fue de  $<1-330 \mu\text{g/g}$  y promedio de  $65 \mu\text{g/g}$ <sup>(65)</sup>.

En México existen pocos reportes sobre el grado de contaminación de fumonisinas en alimentos de humanos o animales y puesto que el maíz representa la base de alimentación de la población<sup>(33)</sup>, determinar la incidencia natural de fumonisinas en maíz y sus productos es importante para establecer el riesgo a la salud. Valorar el grado de exposición, es uno de los dos aspectos que contribuyen al estudio del riesgo, el cual involucra la frecuencia o el grado de la contaminación natural y los niveles de fumonisinas en que se presenta la contaminación. El segundo aspecto a medir es el impacto toxicológico de la toxina que es evaluado en estudios con animales<sup>(65)</sup>.

En áreas de alta incidencia de cáncer esofágico humano, como la región de Transkei Sudáfrica no sólo el maíz está altamente contaminado con fumonisinas u otras micotoxinas, sino es el alimento básico de la población. La diferencia en

el consumo se enfatiza al comparar el consumo diario estimado de 460 g de maíz en el adulto de 70 kg<sup>(74)</sup> contra no más de 4 g por persona en Suiza y un estimado de 7g en Alemania e Inglaterra. Asumiendo el promedio del peso de un adulto de 70 kg y un promedio de contaminación por fumonisinas de 1.7 µg/g en maíz sano en áreas de alta incidencia de cáncer esofágico en Transkei y de 0.5 µg/g en Europa es posible calcular un consumo diario para estas poblaciones de 11.2 µg/kg de peso vivo/día en Transkei y de 0.03 µg/kg de peso vivo/día en Suiza y de 0.05 µg/kg de peso vivo/día en Alemania e Inglaterra<sup>(65)</sup>. En México se reporta un consumo per cápita de maíz de 300 g por día<sup>(33)</sup>, por lo que de acuerdo a los niveles promedio detectados de fumonisinas en el maíz, los cuales se deben considerar de manera discrecional por el número reducido de muestras, se puede estimar un consumo diario de 24 µg/kg de peso vivo/día.

Con base en las investigaciones desarrolladas en ratas para el estudio de cáncer a partir de dosis bajas durante periodos de 24 meses se estimó un nivel de efectos no observados (NOEL) siendo calculado el consumo diario tolerable (TDI=NOEL/1000) de fumonisinas de 0.8 µg/kg de peso vivo/día, por lo que en comunidades del norte de Europa las fumonisinas no representan un riesgo a la salud, sin embargo las comunidades rurales que dependen del consumo de maíz de cultivo casero como base de su alimentación se encuentran con alto riesgo aun con maíz sano, sin considerar el consumo adicional de bebidas fermentadas procedentes de maíz altamente contaminado o de maíz mohoso que sustituya a maíz sano<sup>(27)</sup>, lo cual puede compararse con los hábitos alimenticios de nuestro país.

Como parte de las estrategias para el control de fumonisinas en Estados Unidos en alimentos de humanos y suplementos para animales, la FDA junto con el Instituto de Seguridad de Alimentos y Aplicaciones en Nutrición (Organismo Mundial de la Salud) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos proporcionaron una guía de niveles que recomiendan los límites máximos de fumonisinas para alimentos de

humanos y animales\*, los cuales se obtienen cuando se utilizan buenas prácticas agrícolas y de manufactura. La FDA considera que bajo estos niveles recomendados se puede reducir la exposición a efectos adversos de salud en animales y humanos asociados con fumonisinas. Los niveles que presenta la guía publicada el 6 de junio de 2000, incluye a las fumonisinas B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + B<sub>3</sub>; para productos de maíz desgerminado para consumo humano con un contenido de grasa < 5% de 2 µg/g, y con niveles de grasa ≤ de 2.25% de 4 µg/g (hojuelas, harina). En equinos y conejos 5 µg/g (no más del 20% de la dieta); en cerdos de 20 µg/g (no más del 50% de la dieta) y en rumiantes lactantes y pollos de engorda 30 µg/g (no más del 50% de la dieta).

Respecto a la capacidad productora de fumonisinas por las cepas aisladas en el maíz, se consideró que existe alto potencial productivo ya que el 80% presentó una producción superior a 1000 µg/g. Nelson *et al.*, (1992), consideró cepas de alta producción a aquellas con niveles mayores a 500 µg/g, mientras que son productoras intermedias de 50 – 500 µg/g, y de baja producción de menos de 50 µg/g, en dicho estudio las cepas procedentes de alimento asociado con leucoencefalomalacia fueron altas productoras, mientras que las cepas aisladas del sorgo pocas mostraron alta producción. Los resultados indican que la mayoría de las cepas aisladas a partir de diferentes substratos y áreas geográficas pueden producir estas micotoxinas y que la producción es alta, encontrándose en maíz de buena calidad en Estados Unidos, niveles entre 459-3,091 µg/g y en alimento de maíz dañado de 144 a 6,090 µg/g, lo que coincide con los resultados que se encontraron en el presente estudio, ya que las cepas se aislaron tanto de maíz sano como con daño aparente<sup>(43)</sup>.

---

\* FDA/CFSA; Draft Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feed. <http://vm.cfsan.fda.gov//Edms/fumongui.html>

Estudio realizado en Argentina mostró la capacidad de las cepas de *F. moniliforme* aisladas en diferentes etapas del cultivo, con niveles de fumonisinas de 1,467 a 3,986  $\mu\text{g/g}$ , encontrándose mayor producción a los 75 días post – floración<sup>(14)</sup>.

En Cataluña, España las investigaciones realizadas en maíz mostraron que 33.8% de las cepas de *Fusarium* de la sección Liseola aisladas produjeron  $\text{FB}_1$  y 18%  $\text{FB}_2$ , siendo *Fusarium moniliforme* la especie predominante en la producción de fumonisinas. Se observó alto grado de variabilidad en las cantidades de  $\text{FB}_1$  y  $\text{B}_2$  por las 45 cepas del hongo, los niveles fluctuaron de 5 a 9,600  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_1$  y de 1-4,600  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_2$ <sup>(60)</sup>.

En Europa la valoración sobre la producción de cepas de *Fusarium* aisladas a partir de maíz, sorgo, trigo, cebada y alimento balanceado en Italia, España, Polonia y Francia, mostraron que todas las cepas de *Fusarium moniliforme* y una cepa de *F. proliferatum* produjeron fumonisinas en cantidades desde 0.7 a 4,100  $\mu\text{g/g}$ . Fumonisina  $\text{B}_2$  fue producida por todas las cepas productoras de  $\text{FB}_1$ , en una relación de  $\text{FB}_2/\text{FB}_1$  promedio de 0.22. La mayor producción de fumonisinas se obtuvo a partir de las cepas aisladas de maíz (promedio 1,259  $\mu\text{g/g}$ ), seguido de las cepas obtenidas del trigo (promedio 764  $\mu\text{g/g}$ ) y cebada (320  $\mu\text{g/g}$ ). Estos resultados confirman los datos previamente reportados en otras áreas geográficas de Europa. En general estos datos se consideran similares a los reportados en Norteamérica<sup>(76)</sup>.

Con relación al estudio de cepas de *F. moniliforme* aisladas del maíz en zonas con alta incidencia de cáncer esofágico humano en Transkei, Sudáfrica, se encontró que la cepa MRC826, a partir de la cual se caracterizaron a las fumonisinas, produjo 7,100  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_1$  y 3,000  $\mu\text{g/g}$  de  $\text{FB}_2$ . Los cultivos de la cepa MRC 826 también han sido considerados de potente actividad promotora de cáncer, lo cual fue comparable con otras cepas de alta producción de fumonisinas (MRC4317 y MRC4321), mientras que cepas de baja producción no exhibieron actividad promotora de cáncer<sup>(1)</sup>.

Debido a que las cepas de *F. moniliforme* aisladas en el maíz de Huejotitán, Municipio de Jocotepec, Jalisco son consideradas de alta producción, deben realizarse nuevas investigaciones, tanto de índole toxicológico como epidemiológico en las regiones donde el maíz presente mayor contaminación por *F. moniliforme* y las cepas pertenezcan a poblaciones genéticas de alto potencial productivo de fumonisinas.

## CONCLUSIONES

---

1. Se presentó alta incidencia de *Fusarium moniliforme* en el maíz de las dos localidades estudiadas, independientemente de la variedad del maíz, del daño visual de las mazorcas y de las condiciones climatológicas que prevalecieron en la época de cultivo.
2. El desarrollo de unidades formadoras de colonias fue mayor en Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco aún en maíz aparentemente sano (daño menor a 2%) lo cual pudo ser influenciado por las variaciones pluviales que se presentaron en dicha localidad.
3. La contaminación de fumonisinas se presentó en el 100% de las muestras de maíz en ambas localidades, encontrándose valores significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) en Huejotitán.
4. El estudio de relación entre daño visual de las mazorcas y el desarrollo de unidades formadoras de colonias fue significativo en Ameca lo cual indicó que a mayor DV mayor desarrollo de UFCg<sup>-1</sup>, efecto no observado en Huejotitán posiblemente por el amplio rango de valores encontrado.
5. La relación entre el daño visual de las mazorcas y niveles de fumonisinas en maíz no fue significativa estadísticamente, presentándose altas concentraciones tanto en maíz aparentemente sano como dañado.
6. Se encontró alta capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de *Fusarium moniliforme* aisladas en el maíz de Huejotitán Jalisco.
7. Existe alta contaminación por *F. moniliforme* y fumonisinas en el maíz cultivado en Ameca y Huejotitán Jalisco, lo que indica alto riesgo de exposición en la alimentación de humanos y animales.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. **Alberts, J.F.**, Gelderblom, W.C.A., Vlegaar R., Marasas, W.F.O. y Rheeder, J.P. 1993. Production of (C<sub>14</sub>) fumonisin B<sub>1</sub> by *F. moniliforme* MRC826 in corn cultures. Appl. Environ Microbiol. 59(8):2673-2677.
2. **Azcona, O.J.**, Abouzied, M. M., Plattner, R.D. y Pestka, J.J., 1992. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins Fumonisin B<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>. J. Agric. Food Chem. 40 :531-534.
3. **Bacon, CH. W.** y Nelson, P.E. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic Strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium Proliferatum*. J. Food Prot. 6 :514-521.
4. **Bartolini, R.**, 1990. Plagas, enfermedades y fisiopatías del maíz. En: El Maíz, Agroguías Mundi Prensa Ed. Madrid. pp: 237-266.
5. **Bezuidenhout, S.C.** y Gelderblom, W.C.A., 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Commun. 4 :743-745.
6. **Booth, C.**, 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, Inglaterra. pp: 237.
7. **Bordson, G.**, Meerdink, G., Bauer, K. y Tumbleson, M. 1993. Fumonisin recovery from samples dried at various temperatures. Presented at the Midwest Section Meeting Association of Official Analytical Chemists International Junio 7-10. (Abstract).
8. **Bullerman, LL.B.** y Draughon, F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and fumonisin Symposium. J. Food Prot. 57 (6): 513.
9. **Bullerman, LL.B.** y Northolt, M.D. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. J. Foods Prot. 45(6):519-526.
10. **Bullerman, LL.B.** y Tsai Wei-Yun, J. 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based Foods and Feeds. J. Food Prot. 57 (6): 541- 546.
11. **Burgess, L.W.** y Liddell, C.M. 1983. Laboratory manual for *Fusarium* research. Fusarium Research Laboratory. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sydney. pp: 162.

12. **Castelo, M.M.**, Sumner, S.S. y Bullerman M.B. 1998. Occurrence of fumonisins in corn – based food products. *J. Food Prod.* 61 (6): 704-707
13. **Chang, Y.S.**, Zhang, C.L., Zhao, P.Z. y Deng, Z.L. 1991. Human aortic proteoglycans of subjects from districts of high and low prevalence of atherosclerosis in China. *Atherosclerosis* 41:9-15.
14. **Chulze, S.N.**, Ramírez, M.L., Farnuchi, M.C., Pascale, M., Visconti, A., y March, G. 1996. *Fusarium* and fumonisin ocurrence in Argentina corn at different ear maturuty stages. *J. Agric. Food. Chem.* 44: 2797-2801.
15. **Cohen, S.M.** y Ellwein, L.B. 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249:1007-1011.
16. **Colvin, B.M.** y Harrison, L.R. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia.* 117:79-82.
17. **Colvin, B.M.**, Cooley, A.J. y Beaver, R.W. 1993. Fumonisin toxicosis in swine : Clinical and Patologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5 :232-241.
18. **Daniels, B. A.** 1983. Elimination of *F. moniliforme* from corn seed. *Pl. Dis.* 67: 609-611.
19. **Desjardins, A.E.**, Plattner, R.D. y 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.
20. **Doko, M.B.**, Rapior S., Visconti, A. y Schjoth, J.E. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.* 43: 429-434.
21. **Engelhardt, J.A.**, Carlton, W.W. y Tuite, J.F. 1989. Toxicity of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* for chicks, duckling and turkey poult. *Avian Dis.* 33:357-360.
22. **Frederiksen, R.A.** 1986. Compendium of sorghum diseases. American Phytopatological Society and Departament of Plant Pathology. Texas A. & M. University. pp:27-29.
23. **Galindo, J.** y Romero, S. 1982. *Fusarium moniliforme* como causa de la germinación prematura del maíz. Informe de actividades 1979-1983. Convenio de colaboración Académica. Colegio de Posgraduados. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 4-8.

24. **García, T.M.** 1995. Confirmación química y estudio epizootiológico de fumonisina B<sub>1</sub> en maíz de Oaxaca causante de leucoencefalomalacia equina. Tesis de Licenciatura de Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. pp: 44-47.
25. **Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., y Thiel, P.G.,** 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisina B<sub>1</sub> in rats. *Carcinogenesis* 12:1247-1251.
26. **Gelderblom, W.C.A., Jaskrewiez, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Viegar, R. y Kriek, N.P.J.** 1988. Fumonisins- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 :1806-1811.
27. **Gelderblom, W.C.A., Snyman, S.D., Abel, S., Lebepe-Mazur, S. Smuts, C.M. Van der Westhuizen, Marasas, W.F.O., Victor, T.C., Knasmüller, S., y Huber, W.** 1996. Fumonisins in food, L. Jackson (Ed.), Plenum Press, New York, N.Y. In Shepard, G.S. *et al.*, 1996. Survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International* 79 (3): 671-687.
28. **González, A.V.** 1995. El maíz y su conservación. Ed. Trillas, México. pp. 214-251.
29. **Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., y Cole, R.J.** 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:217-221.
30. **Haschek, W.M., Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L., y Beasley, W.J.** 1992. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia* 117:83-96.
31. **Hayward, D.G.** 1996. Investigación Bibliográfica sobre micosis en Medicina Veterinaria. Fuentes, incidencia, patogenia, toxicidad, signos clínicos, diagnóstico y métodos analíticos. Tesis de Licenciatura de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M., México, D.F.
32. **Holcomb, M., Sulherland, J.Bb., Chiarelli, M.P., Korfmacher, W.A., Thompson, H.C., Hankins, L.J. y Cerniglia, C.F.** 1993. HPLC and FAB mass spectrometry, analysis of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J. Agric. Food Chem.* 41 : 357-360.
33. **Jugenheimer, R.W.** 1981. Maíz. Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Ed. Limusa México pp: 225-234

34. **Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A. y Cawood, M.A.**, 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. Onderstepoort. J. Vet. Res. 57:269-275.
35. **Marasas, W.F. O.**, 1982. Mycotoxicological investigations on corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. In C.J. Pfeiffer (ed.). Cancer of esophagus. Vol. I CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 29-40.
36. **Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., y Thiel, P.G.** 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub>, isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J. Vet. Res. 55:197-203.
37. **Marasas, W.F.O., Kriek, N.P.J., Wiggins, V.M., Steyn, P.S., Towers, D.K. y Hastie, T.J.** 1979. Incidence, geografic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. Phytopathology. 69:1181-1185.
38. **Marasas, W.F.O., Wehner, F.C., y Van Schalkwyk, D.J.** 1981. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, South Africa. Phytopathology. 71:792-796.
39. **Marijanovic, D.R., Holt, P., Norred W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A., Stancel, P.C. y Ragland, P.** 1991. Inmunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. Poultry Sci. 70 :1895-1901.
40. **Moreno, M.E.** 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM., México, D.F. pp:17-38, 78-83.
41. **Murphy, P.A., Rice, L.G. y Ross F.** 1993. Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. J. Agric. Food Chem. 41:263-266.
42. **Nelson, P.E., Dignani, M.C. y Anaissie, E.J.** 1994. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. Clin. Microbiol. Rev. 7(4) :479-504.
43. **Nelson, P.E., Juba, J.H., Ross, P.F., Rice, L.G.,** 1992. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates: J. AOAC International. 77: 522-525.
44. **Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. y Desjardins, A.E.** 1992c. Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section Liseola and by some related species. Appl. Environ. Microbiol. 58(3):984-989.
45. **Nelson, P.E., Toussoum, T.A., y Marasas, W.F.O.** 1983. *Fusarium species*. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University, USA., pp: 7, 128-131.

46. **Nelson, P.E.** 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia. 117:29-36.
47. **Norred, W.P.** y Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot. 57(6) :522-527.
48. **Osweller, G.D.**, Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E., y Witte, S.T. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. J. Vet. Diagn. Invest. 4:53-59.
49. **Palomino, H.J.** 1992. Protección alimentaria y actividades de salud pública veterinaria. Oficina Internacional de Epizootias. REVUE. 11(1):169-188.
50. **Rheeder, J.P.**, Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. y Vanschalcwyk. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisin in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology. 82:353-357.
51. **Rice, G.L.** y Roos, P.F. 1994. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. J. Food Prot. 5 (6) :536-540.
52. **Riley, R.T.**, Hinton, D.M., Chamberlain, W.J., Bacon, C.W., Wang, E., Merrill, A.H. y Voss, K.A. 1994. Dietary Fumonisin B<sub>1</sub> induced disruption of sphingolipid metabolism in Sprague Dawley rats : A new mechanism of nephrotoxicity. J. Nutr. 124 :594-603.
53. **Riley, R.T.**, Norred, W.P. y Bacon, Ch.W. 1993. Fungal toxins in foods. Recent Concerns. Annu. Rev. Nutr. 13:167-189.
54. **Riley, R.T.**, Voss, K.A. Soo, Yool, H., Gelderblom, W.C.A. y Merrill, A.H., 1994. Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis. J. Food Prot. 57(6):528-535.
55. **Rodríguez, S.R.S.** 1994. Estudio preliminar de correlaciones entre el desarrollo de colonias de *Fusarium moniliforme* in vitro, escala visual del daño en mazorca y contenido de fumonisinas en el cultivo de maíz (*Zea mays L.*). Tesis de Licenciatura. Ing. Agrícola U.A.G. pp: 7-21.
56. **Ross, P.F.**, Nelson, P.E., Owens, D.L., Rice, L.G., Nelson, H.A. y Wilson, T.M. 1994. Fumonisin B<sub>2</sub> in cultured *Fusarium proliferatum* M-6104, causes equine leukoencephalomalacia. J. Vet. Diagn. Invest.
57. **Ross, P.F.**, Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweller, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. y Wilson, T.M. 1990. Production of Fumonisins by *Fusarium moniliforme* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. Appl. Environ. Microbiol. 56 :3225-3226.

58. **Ross, P.F.**, Rice, L.G., Plattner, R.D., Osweiler, G.D., y Wilson, T.M. 1991. Concentrations of fumonisin B<sub>1</sub> in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia*. 114:129-135.
59. **Rothinghaus, E.G.**, Coathey, E.C., y Minor, C.H. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for detection of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. *J. Vet. Diagn. Invest.* 40 :326-329.
60. **Sala, N.**, Sanchis, V., Vilaro P., Viladricha, R., Torres, Ma. Viñas, I. y Canela, R. 1994. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. *J. Food Prot.* 10 :915-917.
61. **Sánchez, S.M.R.** 1987. Estudio anatomopatológico de tres casos de leucoencefalomalacia en equinos. Tesis de Licenciatura de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A.M. pp: 35-39.
62. **Schroeder, P.M.** , Crane, H.M., Xia, J., Liotta, D.C. y Merrill, A.M., 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* 269 (5):3475-3481.
63. **Scott, P.M.** 1993. Fumonisin Mini-review international. *J. Food Microbiol.* 18 :257-270.
64. **Segal, I.**, Reinach, S.G., y Beer, M., 1988. Factors associated with oesophageal cancer in Soweto, South Africa. *Br. J. Cancer.* 56: 681-686.
65. **Shepard, G.S.**, Thiel, P.G., Stockenström and Sydenham, E., Worldwide. 1996. Survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC International.* 79 (3):671-687.
66. **Snedecor, G.W.**, y Cochran, W.G. 1997. Métodos Estadísticos. CECSA. México. pp: 321-407.
67. **Stack, M.E.** y Eppley, R.M. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn products. *J. A.O.A.C. International.* 75:834-837.
68. **Steel, R.G.D.**, y Torrie J.H. 1986. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Segunda Edición. Ed. Mc. Graw-Hill. México. D.F. pp: 466-475.
69. **Sydenham, E.W.**, Shepard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. y Koch, K.R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38 :1900-1903.

70. **Sydenham, E.W.**, Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. y Stockenstrom, S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39 :2014-2018.
71. **Sydenham, E.W.**, Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Peralta, Sanhueza, C.E., González, H.H.L. y Resnik, S.L. 1993. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *J. Agric. Food Chem.* 41:891-895.
72. **Sydenham, E.W.**, Shephard, S.G. y Thiel, G.P. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in foods and feeds. *J. AOAC International.* 2 :313-318.
73. **Tejeda, M.V.**, Marovatsanga, L.T. y Pestka, J.J. 1994. Comparative detection of fumonisin by HPLC, Elisa and Immunocyto-Chemical localization in *Fusarium* cultures. *J. Food Prot.* 6 :666-672.
74. **Thiel, P.G.**, Marasas, W.F.O., y Sydenham, E.W. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycophatologia.* 117: 3-9.
75. **Viquez, O.M.**, Castell – Pérez, M.E. y Shelby, R.A. 1996. Ocurrence of fumonisin B<sub>1</sub> in maize grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.* 44:2789-2791.
76. **Visconti, A.** y Doke, B. 1994. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC International.* 77(2) :546-550.
77. **Voss, K.A.** Norred, W.P. y Bacon, C.W. 1992. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme*- contaminated corn, culture material and ammoniated culture material. *Mycophatologia.* 117 :97-104.
78. **Wang, E.**, Ross, P.F., Wilson, T.M., Riley, R.T. y Merrill, A.H. 1992. Increases in serum sphingosine and sphinganina and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.* 122 :1706-1716.
79. **Ware, G.M.**, Umrigar, P.P. y Carman Jr. 1994. Evaluation of Fumonitest immunoaffinity columns. *A.S. Analytical Letters.* 27(4): 693-715.
80. **Yang, C.S.** 1980. Research on esophageal cancer in China: A review. *Cancer Res.* 40:2633-2644.