



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

**BIOCONTROL DE FUSARIUM MICOTOXIGÉNICO CON TRICHODERMA EN LAS LOCALIDADES DE SAN MIGUEL CANOA Y SANTA MARÍA TONANZINTLA, PUEBLA.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**Mary Triny Betanzo Pavón**

Director de tesis:

Dr. Ricardo Munguía Pérez



Noviembre 2024



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"*

**BIOCONTROL DE FUSARIUM MICOTOXIGÉNICO CON TRICHODERMA EN LAS LOCALIDADES DE SAN MIGUEL CANOA Y SANTA MARÍA TONANZINTLA, PUEBLA.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**Mary Triny Betanzo Pavón**

Comité tutorial:

Director	Dr. Ricardo Munguía Pérez
Co-Director	Dra. Fabiola Avelino Flores
Tutor	Dra. María Teresa Zayas Pérez
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Elena Ramos Cassellis

Noviembre 2024

## AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad, aprender sus valores y cultura, así como formarme como profesionista y ser humano.

Se extiende el agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) que financió este proyecto durante mi periodo de estudiante de maestría (2022- 2024).

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta Tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

Al Dr. Ricardo Munguía Pérez por su apoyo, experiencia y conocimiento, siempre estaré agradecida.

A la Dra. Fabiola Avelino Flores por su conocimiento y experiencia, así como por confiar en mí.

A las integrantes de mi comité tutorial, Dra. María Elena Ramos Cassellis y Dra. María Teresa Zayas Pérez por su apoyo, paciencia y tiempo dedicado.

Al Dr. Marco Antonio Marín por sus contribuciones e ideas.

Al Dr. J. Santos Zepeda Hernández por sus consejos, correcciones y apoyo.

Al equipo de laboratorio de Micología, especialmente a Karen y Miriam gracias por todo su apoyo y por brindarme momentos amenos.

Al colectivo de San Miguel Canoa y la comunidad de Santa María Tonantzintla especialmente a Miguel y a Julio por ser partícipes de este proyecto, por su tiempo y conocimientos.

A mi amiga Tania por sumarme tanto en tan poco tiempo.

A mis amigos valoro mucho su amistad, deseo encontrarlos más adelante en la vida.

## DEDICATORIA

*A Dios por darme vida, salud y por haber puesto en mi camino a aquellas grandes personas que han sido mi sostén y compañía.*

*A mi madre por ser el pilar esencial en todo lo que soy, cuyo amor incondicional y sabiduría me acompañan cada día.*

*A mi padre (D.E.P) por el tiempo que estuviste conmigo, por todo.*

*A mis hermanos por ser mi fuente de inspiración y motivación.*

*A la niña que fui y que habita en mí por la sonrisa y la fuerza con la que nos conducimos en la vida.*

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
ÍNDICE .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
RESUMEN .....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	5
IV. OBJETIVOS.....	6
V. HIPÓTESIS .....	6
VI. JUSTIFICACIÓN.....	7
VII. ANTECEDENTES .....	9
7.1. Sistema Maíz-Suelo .....	9
7.1.1. Importancia del maíz .....	10
7.1.2. Afectaciones ambientales en los cultivos de maíz.....	12
7.2 Fusarium micotoxigénico.....	13
7.2.1 Micotoxinas como riesgos ambientales y a la salud pública .....	17
7.2.2 Límites permitidos de micotoxinas en alimentos .....	21
7.3 Seguridad alimentaria .....	23
7.4 <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico .....	25
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
8.1 Área de estudio .....	30
8.2 Tipo de estudio.....	31
8.3 Muestreo y aislamiento de cepas .....	32
8.4 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas.....	35
8.5 Determinación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium</i> micotoxigénico.....	36
8.6 Evaluación de la capacidad antagónica.....	37
8.6.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) .....	37
8.6.2 Comparación gráfica de la velocidad de crecimiento .....	37
8.6.3 Grado de micoparasitismo .....	37
8.7 Análisis estadístico.....	38

IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
9.1	Estado del Arte de hongos micotoxigénicos y su biocontrol .....	38
9.2	Muestreo y aislamientos de hongos pertenecientes al género <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> .....	41
9.3	Caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> .....	45
9.4	Caracterización morfológica de <i>Fusarium</i> .....	45
9.5	Diseño de los oligonucleótidos para la identificación del género <i>Fusarium</i> y la presencia de la fumonisina mediante análisis <i>in silico</i> .....	47
9.6	Identificación molecular de cepas micotoxigénicas.....	56
9.7	Evaluación de la capacidad antagonica.....	62
9.7.1	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial .....	62
9.7.2	Grado de micoparasitismo .....	66
9.7.3	Cinética del crecimiento de <i>Fusarium</i> .....	69
9.8	Percepción de la micotoxiosis en la población de las zonas de estudio. ....	71
9.8.1	Características de los Agricultores .....	71
9.8.2	Producción de maíz.....	71
9.8.3	Destino de la Producción de Maíz.....	73
9.8.4	Percepción de la micotoxiosis por las localidades .....	74
9.8.5	Cuadro clínico asociado a la presencia de micotoxiosis en la población .....	77
X.	CONCLUSIONES.....	78
XI.	XI. BIBLIOGRAFÍA .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Fusarium</i> spp en medio PDA. Colonia algodonosa y de color blanquecino-rosado en los primeros estados de desarrollo (A) Conforme el micelio se desarrolló se tornó un color púrpura que se observó por el reverso (B). Características morfológicas de los macroconidios, microconidios y clamidiosporas(C-D-E).....	15
Figura 2.- <i>Fusarium verticillioides</i> . Microconidias de <i>F. verticillioides</i> producidas en esporodoquios (A) y en cadenas (B). Cultivos de <i>F. verticillioides</i> en agar papa-dextrosa (C-D).....	16
Figura 3.- Estructura química de las fumonisinas B1, B2 y B3.....	19
Figura 4.- Objetivos del Desarrollo Sostenible (ONU, 2016) compatibles con la investigación para el biocontrol de <i>Fusarium</i> micotoxigénico de cultivos de maíz.....	25
Figura 5.- Aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp. en agar Sabouraud. a): Crecimiento de micelio. b: Estructuras microscópicas: fiálides, hifas y conidias (40x). Obtenido en: Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias microbiológicas.....	25
Figura 6.- Diagrama experimental de trabajo.....	30
Figura 7.- Mapa de la ubicación de la localidad Santa María Tonantzintla.....	31
Figura 8.- Mapa de la ubicación de San Miguel Canoa.....	31
Figura 9.- Muestreo de suelo agrícola en zigzag de acuerdo con la NOM-021-RECNAC-2000 en San Miguel Canoa.....	33
Figura 10.- Geolocalización de los sitios de muestreo: Santa María Tonantzintla (N 19°1'31'', O 98°19'23'') y San Miguel Canoa (N 19°9'29'', O 98°5'20'').....	34
Figura 11.- Red de palabras más mencionadas y la relación entre estas, se muestra como las investigaciones se han enfocado en <i>Trichoderma harzianum</i> , que han sido mayormente descrito por los autores.....	39
Figura 12.- Fueron analizados un total de 519 documentos, de los cuales 3 destacan por sus numerosas citas que van desde 263-270. Los autores con más artículos citados son Ownley, Gwinn y Vega; sus investigaciones se han basado en describir al género <i>Trichoderma</i> y han realizado pruebas de biocontrol sobre diversos hongos patógenos como lo son los hongos del género <i>Fusarium</i> . .....	40
Figura 13.- Las publicaciones fueron mayores en el año 2019, en la actualidad las investigaciones han ido elevándose.....	40
Figura 14.- Nube de palabras más mencionadas en las publicaciones.....	41
Figura 15.- Diversidad de cepas del género <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> encontradas en las diferentes zonas. SMC: San Miguel Canoa, SMT: Santa María Tonantzintla.....	43
Figura 16.- Cepas del género <i>Fusarium</i> aisladas en muestras de granos de maíz en las zonas de estudio.....	43
Figura 17.- Macromorfología de las cepas <i>Fusarium</i> : A- Morado, algodonoso, pigmentación marrón. B- Morado, algodonoso sin pigmentación. C-Salmón, algodonoso. D-Morado-algodonoso. E-Blanco, liso. F-Blanco, liso. G-Rosaceo, algodonoso. H-Morado, liso.....	46
Figura 18.- Micromorfología de las cepas <i>Fusarium</i> . A-B, macroconidios ligeramente curvos con una septa. C-D, macroconidios rectos ligeramente rectos con 2-3 septas. F, macroconidios largos con curvatura dorso ventral de 3-6 septas. G, microconidios en cadena cortas.....	47
Figura 19.- Software utilizados para el diseño de primers.....	48
Figura 20.- Secuencia en formato FASTA. Se muestra en verde la ubicación de la secuencia del oligonucleótido Fusgen Forward y en rosa la secuencia complementaria del oligonucleótido Fusgen Reverse.....	50
Figura 21.- Secuencia en formato FASTA. Se muestra en verde la ubicación de la secuencia del oligonucleótido Fumonfus Reverse y en rosa la secuencia complementaria.....	50
Figura 22.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen <i>FVEG_11554</i> de cepas del género <i>Fusarium</i> . Tamaño del amplicon 784pb. MPM 100 pb plus DNA Ladder. Línea 1: Control positivo ( <i>Fusarium solani</i> ), línea 2: Cepa tipo ( <i>Fusarium oxysporum</i> , línea 3: Cepa F38, línea 4: Cepa F39, línea 5: Cepa F40, línea 6: Cepa F41, línea 7: Cepa F42, línea 8: Cepa T36, línea 9: Control negativo.....	57

Figura 23.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG_11554 de cepas del género <i>Fusarium</i> . Tamaño del amplicon 784pb. MPM 100 pb plus DNA Ladder. Línea 1: Control positivo (Cepa tipo <i>F. solani</i> ), línea 2: Cepa F37, línea 3: Cepa F42, línea 4: Control negativo.....	58
Figura 24.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM 100 pb plus DNA Ladder. A) Muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG_11554 de cepas del género <i>Fusarium</i> . Tamaño del amplicon 784pb. Línea 1: Control positivo (Cepa tipo <i>F. solani</i> ), línea 2: Cepa F16, línea 3: Cepa F17, línea 4: Cepa F18, línea 5: Control negativo. B) Muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG_11554 de cepas del género <i>Fusarium</i> . Línea 1.- Control positivo (Cepa tipo <i>F. solani</i> ), línea 2.- Cepa F10, línea 3.- Control negativo. ....	59
Figura 25.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG_11554 de cepas del género <i>Fusarium</i> . Tamaño del amplicon 784pb. MPM 100 pb plus DNA Ladder. A) línea 1: Control positivo ( <i>F. solani</i> ), línea 2: Cepa F9, línea 3: Cepa F11, línea 4: Cepa F12, línea 5: Cepa F13, línea 6: Cepa F14, línea 7: Cepa F15, línea 8: Control negativo. B) línea 1.- Control positivo ( <i>F. solani</i> ), línea 2.- Cepa F25, línea 3.- Cepa F28, línea 4.- Control negativo. ....	60
Figura 26.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM 100 pb plus DNA Ladder. ....	61
Figura 27.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial ejercido por las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. de ambas zonas de estudio (Donde SMC corresponde a San Miguel Canoa y SMT a Santa María Tonantzintla) contra <i>F. oxysporum</i> . ....	63
Figura 28.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial ejercido por las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. de ambas zonas de estudio (Donde SMC corresponde a San Miguel Canoa y SMT a Santa María Tonantzintla) contra <i>F. solani</i> , .....	63
Figura 29.- Análisis de varianza entre los PICR de las diferentes zonas usando el software R-4.3.1. ....	65
Figura 30.- Grado de micoparasitismo que ejercieron las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>F. oxysporum</i> . En el control se observa el crecimiento del micelio blanco que corresponde a <i>Fusarium</i> , en los siguientes cinco cultivos <i>in vitro</i> se observan las confrontaciones duales, en cada uno de ellos el disco a la derecha corresponde a <i>Trichoderma</i> y a la izquierda a <i>Fusarium</i> . Se observa como el micelio verde de <i>Trichoderma</i> logra invadir completamente a <i>Fusarium</i> , logrando así la inhibición de su crecimiento....	67
Figura 31.- Grado de micoparasitismo que ejercieron las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>F. solani</i> , durante enfrentamiento de cultivos duales. ....	68
Figura 32.- Curva de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> al enfrentarse a <i>Trichoderma</i> . ....	69
Figura 33.- Curva de crecimiento de <i>F. solani</i> al enfrentarse a <i>Trichoderma</i> . ....	70
Figura 34.- Porcentaje de agricultores que su principal actividad agrícola es el maíz. ....	72
Figura 35.- Tipo de maíz utilizado por los agricultores.....	73
Figura 36.- Destino de la producción de maíz de dos zonas del valle de Puebla.....	74
Figura 37.- Porcentaje de la población de las dos zonas del valle de Puebla que consideran que el manejo y consumo de maíz les puede causar alguna enfermedad. ....	75
Figura 38.- Destino del maíz contaminado en las dos localidades. ....	75
Figura 39.- Tipo de almacenamiento que utilizan las localidades de Puebla.....	76

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Hongos asociados a la presencia de micotoxinas en alimentos.....	17
Cuadro 2.- Niveles de micotoxinas encontradas en alimentos y sus niveles permisibles según la FDA (2004). .....	22
Cuadro 3.- Beneficios de la aplicación de <i>Trichoderma</i> spp.....	27
Cuadro 4.- Se realizaron 2 muestreos por sitio, el primero en temporada seca y segundo en temporada húmeda.....	33
Cuadro 5.- Escala de capacidad antagónica micoparasítica.....	37
Cuadro 6. Análisis micológico del suelo agrícola destinado al cultivo de maíz de los dos sitios de estudio. ..	42
Cuadro 7. Características socioambientales de los sitios muestreados.....	44
Cuadro 8. Características morfológicas de las diferentes especies de <i>Trichoderma</i> aisladas.....	45
Cuadro 9.- Alineación de secuencias para el género <i>Fusarium</i> .....	52
Cuadro 10.- Alineamiento de secuencias para la identificación de especies de <i>Fusarium</i> productoras de micotoxinas.....	53
Cuadro 11.- Se muestran los parámetros utilizados para el diseño de primers.....	54
Cuadro 12.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Forward 5'-ACACCCGTCAGTCCAGTTTC-3'.	54
Cuadro 13.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Reverse 5'- ACGTGGGAATAAGCACTCACC -3'. .....	55
Cuadro 14.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Forward 5'- CTCGTTTCTAGGCGGGTTGT-3'.	55
Cuadro 15.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Reverse 5'- GGCGAGAACAAGTCTGTGGA -3'. .....	56
Cuadro 16.- Cepas identificadas como <i>Fusarium</i> spp.....	62
Cuadro 17. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial que ejercieron las cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de suelos agrícolas de los sitios de estudio.....	64

## RESUMEN

El género *Fusarium* pertenece a los hongos filamentosos que están ampliamente distribuidos a nivel mundial, son fitopatógenos causantes de enfermedades en los cultivos de importancia agrícola como el maíz y algunas especies son productoras de micotoxinas. La contaminación de alimentos con micotoxinas constituye un problema importante para la salud pública, la seguridad alimentaria y la actividad agrícola, debido a que dichas sustancias producen daños a la salud de humanos y animales, desde micotoxicosis hasta carcinogénesis. Es bien sabido que las especies de *Trichoderma* destacan por su capacidad de producir enzimas y su capacidad antagónica contra patógenos. Para ello se evaluó la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz sobre *Fusarium* productor de micotoxinas. El diseño experimental consistió en 40 tratamientos con tres repeticiones. Las pruebas de antagonismo *in vitro* se realizaron mediante la técnica de cultivo dual, posteriormente a los 7 y 10 días de crecimiento se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de inhibición del crecimiento radial, grado de micoparasitismo y comparación gráfica de la velocidad de crecimiento. A partir de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz se lograron aislar 40 cepas nativas del género *Trichoderma*, las cuales fueron enfrentadas con *F. solani* y *F. oxysporum*. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* tuvieron una velocidad de crecimiento superior a las patógenas, expresando una capacidad antagónica alta con valores medios de PICR de 40 a 60. Los resultados de este trabajo brindan nueva evidencia sobre la eficiente capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma*, por lo que son una alternativa como potenciales biocontroladores de *Fusarium* micotoxigénico, ya que presentaron un crecimiento eficaz, con la ventaja de estar adaptadas al ambiente de la región de Puebla, donde existe una alta exposición a este patógeno.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la agricultura tiene el reto de generar una gran cantidad de alimentos para satisfacer las necesidades de la población. A nivel mundial la producción de cereales ha sido la actividad productiva más eficiente, y uno de los cultivos de mayor importancia es el de maíz, debido a la diversidad de usos y a su relevancia gastronómica en la dieta diaria por lo que en 2019 fue el cereal que más se cosecho a nivel mundial, cabe mencionar que México ocupó el séptimo lugar en producción mundial en el mismo año (SADER, 2021).

En México, el cultivo de maíz es el más representativo e importante, no solo es el principal alimento básico, sino también es el producto que mantiene la identidad cultural y la historia del país. En 2021 fue el cereal más consumido de la selección de cereales y granos principales (Statista, 2022).

Puebla se sitúa entre los diez principales estados productores de maíz, contribuyendo con una oferta de 1.08 millones de toneladas, que representa 4.6 % de la producción anual nacional. Sin embargo, a pesar de la alta producción del estado, las estimaciones sobre el consumo estatal aparente indican que existe un fuerte déficit de producción de maíz (SAGARPA, 2017).

Debido a una gran variedad de amenazas, los cultivos y el proceso de producción de maíz se encuentran en riesgo, las causas principales son las alteraciones al ambiente debido al calentamiento global, a las prácticas agrícolas no sustentables, los factores abióticos (sequías, humedad relativa, suelos degradados o escasos en nutrientes) y bióticos; como la presencia de patógenos causantes de enfermedades y productores de micotoxinas, dentro de los cuales destacan los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Figueroa-Rivera *et*

*al.*, 2010). Diferentes micotoxinas de *Fusarium* están relacionadas con ciertos tipos de cereales, en el maíz se presentan las denominadas fumonisinas (FB). La ubicación geográfica de México favorece la infección y síntesis de micotoxinas, ya que la contaminación por estas se presenta especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales, sin embargo, aunque existen diferencias geográficas y climáticas que determinan la presencia y producción de las micotoxinas en los cultivos, la exposición a estas se da a nivel mundial (Kuiper-Goodman, 2004). Los hongos pueden producir micotoxinas desde el crecimiento de la planta o cultivo en el campo y posteriormente aumentan cuando los granos son almacenados por períodos prolongados de tiempo o bajo condiciones idóneas (Chavarri *et al.*, 2017).

El alto consumo de maíz en México (estimado en 74 kg per cápita por año) representa un riesgo para la salud de la población, debido a que la exposición e ingesta elevada de estas micotoxinas generan micotoxicosis en humanos y animales, además se han relacionado con efectos carcinogénicos, daños hepáticos, neurológicos y renales (OMS, 2018). Además de las importantes pérdidas postcosecha del grano, que se han estimado hasta en un 25%; lo que limita la cantidad y calidad del alimento disponible para autoconsumo y reduce las oportunidades de los agricultores de vender su grano (Requena *et al.*, 2005).

Para combatir la presencia de hongos patógenos en los cultivos se han empleado agroquímicos que en su momento han sido efectivos, sin embargo, su abuso ha originado graves problemas ambientales tales como la contaminación de suelos y mantos freáticos, disminución en la biodiversidad, así como una serie de problemas a la salud pública (Gamboa *et al.*, 2018).

En base a lo anterior, la presencia de micotoxinas en los alimentos no solo representa una problemática para la salud pública si no también constituyen un riesgo para la seguridad

alimentaria, la producción agrícola y el medio ambiente, por lo que esta problemática debe abordarse de manera interdisciplinaria. Los esfuerzos se han orientado en la implementación y búsqueda de tecnologías agrícolas nuevas, las cuales puedan garantizar la explotación eficiente de los recursos naturales, para preservar el suelo y el medio ambiente, de igual manera se pueda sostener la productividad y calidad de los cultivos. De esta manera es como surge la agricultura sostenible, cuyos principales objetivos son procurar la seguridad alimentaria mundial, apoyar la gestión sostenible de los recursos naturales, promover ecosistemas saludables, y asimismo satisfacer las necesidades de las generaciones actuales de productos y alimentos, sin comprometer la capacidad de generaciones futuras para hacerlo (Cano *et al.*, 2022).

La agricultura sostenible busca incrementar el rendimiento y la calidad de los cultivos, disminuir la presencia de fitopatógenos y proveer de productos saludables a la población de una manera económicamente viable, lo anterior mediante la minimización del uso de agroquímicos y apoyándose en el uso de recursos biológicos (Cano *et al.*, 2022). La aplicación de agentes de control biológico, como microorganismos antagonistas son una opción para reducir la presencia de hongos patógenos y la contaminación del maíz con micotoxinas de forma sostenible y amigable con el medio ambiente (Álvarez & Vásquez., 2024)

El género *Trichoderma* se ha utilizado como agente de control biológico para controlar hongos patógenos de las plantas debido a su capacidad de rápido crecimiento y desarrollo, y a sus diversos mecanismos que incluyen la competencia por los nutrientes, el hiperparasitismo y la antibiosis de los patógenos como *Fusarium* spp. (Chiriboga *et al.*, 2015).

En este contexto, resulta de interés investigar el efecto antagónico de las cepas nativas de *Trichoderma* sobre *Fusarium* micotoxigénico de maíz, y dar a conocer la prevalencia de micotoxicosis en zonas susceptibles a la exposición de micotoxinas. En el presente proyecto de investigación se llevó a cabo el muestreo de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz y granos almacenados, a partir de los cuales se obtuvieron cepas pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*. Las cepas presuntivas de especies micotoxigénicas fueron previamente caracterizadas fenotípica y genotípicamente. Se evaluó la capacidad antagónica de cepas de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Su importancia radica en proponer una alternativa sostenible de control biológico para reducir y/o eliminar la presencia de hongos productores de micotoxinas en los cultivos de maíz, evitar futuras afectaciones a la salud pública y al medio ambiente, asimismo asegurar la seguridad alimentaria y apoyar a los productores a reducir las pérdidas económicas generadas por estos hongos patógenos.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación de alimentos con micotoxinas representa un problema importante para la salud pública, la seguridad alimentaria y la actividad agrícola. Las micotoxinas se encuentran entre los contaminantes de alimentos más importantes que deben ser controlados con el objetivo de proteger la salud pública y reducir su impacto económico en todo el mundo (Duarte-Vogel & Villamil-Jiménez, 2006). Debido a que dichas sustancias producen micotoxicosis en humanos y animales, que implica un amplio grupo de afectaciones causadas por el contacto directo, la ingesta de alimentos contaminados y la inhalación de micotoxinas presentes en el ambiente.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), el 25% de los cultivos básicos que garantizan la alimentación a nivel mundial se encuentran contaminados por micotoxinas, dentro de estos destaca el cultivo de maíz. Los hongos del género *Fusarium* son el principal patógeno productor de micotoxinas (fumonisinas). Estos colonizan los cultivos de maíz, afectando la calidad del grano y ocasionando daños a la salud pública, así como pérdidas económicas a los productores.

Aunado a esto, el manejo tradicional para contrarrestar los fitopatógenos y reducir las enfermedades en los cultivos incluye la aplicación de agroquímicos y fungicidas, sin embargo, es bien sabido que el uso excesivo o errado de estos ocasiona graves problemas al medio ambiente. Toda esta problemática hace necesaria la búsqueda e implementación de tecnologías que no causen efectos desfavorables a la salud, ni al medio ambiente y que sean económicamente viables. De esta manera el aprovechamiento de microorganismos para el control biológico de hongos patógenos son una alternativa sostenible que permite proveer alimentos inocuos, reducir el impacto que causan los agroquímicos al ambiente y evitar futuras afecciones a la salud pública.

### III. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Las cepas de *Trichoderma* recuperadas del suelo agrícola destinado al cultivo de maíz poseen una capacidad antagónica eficiente sobre *Fusarium* micotoxigénico?
- ¿Cuál es la diversidad del género *Trichoderma* y *Fusarium* en el suelo agrícola destinado al cultivo y granos de maíz?

- ¿Se encuentra presente el gen de la fumonisina (FFUJ\_09643) en las cepas de *Fusarium* recuperadas del suelo destinado al cultivo y los granos de maíz de las zonas de estudio?
- ¿Cuál es la percepción de la micotoxicosis en la población de las zonas de estudio?

#### IV. OBJETIVOS

##### **Objetivo general**

Evaluar el biocontrol de *Fusarium* micotoxigénico con *Trichoderma* perteneciente a las Localidades de San Miguel Canoa y Santa María Tonantzintla, Puebla.

##### **Objetivos específicos**

- Determinar la diversidad del género *Trichoderma* y *Fusarium* en muestras de suelo agrícola y granos de maíz.
- Determinar la presencia de los genes de la fumonisina en las cepas de *Fusarium* recuperadas de maíz y suelo agrícola del estado de Puebla.
- Evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *Fusarium* micotoxigénico.
- Conocer la percepción de micotoxicosis en la población de las zonas de estudio.

#### V. HIPÓTESIS

- Las cepas de *Trichoderma* recuperadas de las localidades de San Miguel Canoa y Santa María Tonantzintla, son una alternativa eficiente para el control biológico de *Fusarium* micotoxigénico.

- Se encuentra una alta diversidad del género *Trichoderma* y *Fusarium* en el suelo agrícola destinado al cultivo de maíz y los granos de las localidades de San Miguel Canoa y Santa María Tonantzintla.
- Las cepas de *Fusarium* recuperadas del suelo destinado al cultivo de maíz y los granos de las zonas de estudio, presentan el gen de la fumonisina (FFUJ\_09643).
- La población de las zonas de estudio se encuentra susceptible a presentar micotoxicosis.

## VI. JUSTIFICACIÓN

En México la productividad del maíz es de suma importancia, constituye gran parte de la base alimenticia como fuente primordial de energía de la dieta, además representa la identidad social y cultural del país, lo que deriva en altos estándares de producción y consumo. Se estima que una familia mexicana campesina de cinco miembros consume aproximadamente 2,500 kg de maíz al año, por lo que se asume que el maíz ha sido garante de la seguridad alimentaria nacional (Damián *et al.*, 2016).

Sin embargo, el proceso de cultivo y producción de maíz se encuentra amenazado por una gran variedad de factores relacionados con el cambio climático, las malas prácticas agrícolas y la presencia de hongos patógenos. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019), las prácticas agrícolas inadecuadas o ineficientes han ocasionado la rápida degradación de hasta un tercio de los suelos, por lo que los cultivos producen alimentos de baja calidad. Aunado a esto la presencia de hongos micotoxigénicos en los cultivos como es el caso de *Fusarium*, constituye una problemática ambiental, que amenaza la seguridad alimentaria a nivel nacional, y provoca riesgos a la salud pública e

impactos económicos. En este contexto, la FAO y la OMS han recomendado que se realicen monitoreos de la presencia de hongos micotoxigénicos en suelos agrícolas y en los alimentos, para prevenir y mitigar la contaminación de estos por micotoxinas.

Cabe destacar que, la ubicación geográfica de México favorece la infección y síntesis de micotoxinas y el alto consumo de maíz por mexicano (estimado en 74kg per cápita por año) representa un riesgo para salud de la población.

Una alternativa para controlar y mitigar la presencia de micotoxinas en los cultivos es mediante la aplicación de prácticas agrícolas sostenibles basadas en el aprovechamiento de los recursos biológicos. La utilización de microorganismos biocontroladores no manifiestan los efectos negativos que presentan las sustancias químicas empleadas en la agricultura. El hongo *Trichoderma*, que se encuentra naturalmente en el suelo y su importancia radica su alta capacidad micoparasítica y de adaptación, su producción de compuestos promotores de crecimiento vegetal y producción de metabolitos, como enzimas, y compuestos volátiles, por lo que es utilizado como agente de biocontrol contra diferentes fitopatógenos.

De esta manera la presente investigación busca implementar métodos de control eficientes para reducir y controlar la presencia de patógenos productores de micotoxinas en los cultivos y alimentos, evitar futuras afectaciones a la salud pública y al medio ambiente. Asimismo, este proyecto está vinculado con cuatro de los objetivos de desarrollo sostenible (ONU, 2016), al favorecer a los sistemas alimentarios para garantizar la seguridad alimentaria, al buscar reducir el impacto ambiental de los agroquímicos y al contribuir en el aprovechamiento de los recursos naturales de una manera viable.

## VII. ANTECEDENTES

### 7.1. Sistema Maíz-Suelo

La teoría general de sistemas es un enfoque interdisciplinario, y, por lo tanto, aplicable a cualquier sistema tanto natural como artificial. En la teoría de Bertalanffy (1986) se resalta de manera importante el concepto de sistema, el cual ha predominado en todos los campos de la ciencia, “Un sistema es un complejo de elementos interactuantes” (Ríos & Santillán, 2016). En 2010, Arras Vota definió sistema como “un todo organizado, integrado por dos o más partes denominadas subsistemas que guardan una relación de interdependencia e interrelación entre sí, se distinguen de su ambiente por medio de una frontera identificable y están inmersos en diversos contextos con los que interactúa” (Domínguez-Ríos & López, 2017).

Con base a lo anterior, un sistema maíz-suelo, se refiere a la relación del suelo agrícola y el cultivo de maíz. Debido a que, en el ciclo del cultivo de maíz, el principal factor para su producción es el suelo, de esta manera al estar estrechamente relacionados, los cultivos de maíz con los factores bióticos y abióticos forman un sistema complejo.

El óptimo crecimiento del cultivo lo determinan las condiciones del suelo, tanto sus propiedades fisicoquímicas como la presencia de comunidades microbianas. Algunos de los principios ecológicos de un ecosistema se mantienen funcionando en el ciclo del cultivo del maíz, desde la diversidad y abundancia de especies en el suelo, las interacciones simbióticas entre plantas y microorganismos, y el aprovechamiento óptimo del espacio, tanto horizontal como verticalmente propicia una mayor eficiencia en la captación de la luz y a la humedad (Maass, 2003).

Los cultivos de maíz pueden adaptarse a todo tipo de suelos, pero sus condiciones más favorables son suelos con pH entre 5.5 a 7.8, en estos se obtiene un mejor desarrollo del cultivo y buenas cosechas. Otro factor importante es el desarrollo en suelos profundos, ricos en materia orgánica, con una adecuada circulación de agua y oxígeno, que no produzcan encharques que provoquen asfixia radicular (Solís & Martínez, 2004).

### **7.1.1. Importancia del maíz**

El cereal que más se produjo a nivel mundial durante los años 2023/2024, fue el maíz. En concreto, la producción de este tipo de cultivo se situó en torno a los 1.224 millones de toneladas métricas en dicha temporada comercial. Por lo que es considerado de gran importancia económica a nivel mundial, en este sentido los países que más consumen el cereal son Estados Unidos, China, la Unión Europea, Brasil y México (Statista, 2024; Orús, 2024).

Se estima que para el 2050, la demanda mundial de maíz, trigo y arroz ascienda a unos 3 300 millones de toneladas anuales, superando por 800 millones de toneladas a la cosecha récord global de 2014. Gran parte de este aumento de producción deberá provenir de los suelos agrícolas existentes, por lo que los agricultores están sometidos a una presión cada vez mayor por parte de otros sectores (Reeves & Ramsay, 2016).

En México, es el cultivo más representativo desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, es considerado como alimento básico para la población. Se utiliza para elaborar una cantidad de preparaciones culinarias tradicionales, además de las tortillas, lo que hace del maíz uno de los elementos fundamentales de la cocina nacional, y además de darnos memoria histórica y ser parte del patrimonio biocultural, ha sido el sustento de miles de familias en zonas rurales (Fernández *et al*, 2013).

Es importante destacar que, en la agricultura, la milpa tiene un uso multifuncional, es decir, puede ser utilizado como alimento para ganado y como fuente de gran variedad de productos industriales como: almidones, forraje para animales, glucosa, dextrosa, fructosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, plantas medicinales y de ornato (Cuevas, 2014). De esta manera el sistema de maíz beneficia a los productores, o familias rurales, ya que les permite asegurar algún tipo de producción (aunque no sean alimentos) en momentos de crisis ambiental o económica. Por lo que, el maíz es un referente y fuente de inspiración para el desarrollo de sistemas de producción de cultivos más sustentables, así como un sistema que contribuye a la seguridad alimentaria y social, debido a que se prioriza la producción agrícola local para alimentar a las pequeñas comunidades (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural).

En el país la producción de maíz ocupa una superficie promedio de 8.35 millones de hectáreas, de los cuales la superficie sembrada de maíz para la mayoría de las regiones del país ocupa menos del 25 %; las regiones en el centro y sur de México ocupa más del 50 % de la superficie para la producción (de, 2014; Centrogeo, 2014). Además, se siembran 64 razas de maíz, casi todas por productores locales a pequeña escala, que representan el 80 por ciento de los productores de este cereal, cabe mencionar que, en el año 2020, la producción de granos de maíz fue de 27 millones 707 mil 775 toneladas, lo que significó un aumento de 1.8 por ciento en comparación con las 27 millones 228 mil 242 toneladas de un año atrás (UV, n. d.).

Los principales estados productores de maíz en México son Sinaloa (22%), Jalisco (14%), CDMX (8%), Michoacán (7%), Guanajuato (6%), Guerrero (5%), Veracruz (5%), Chiapas (5%), Chihuahua (4%), Puebla (4%) y el resto de los Estados representan el (20%) restante.

Cabe mencionar que México ocupa el décimo lugar en producción mundial de maíz, y también el décimo lugar como exportador mundial, ya que en 2017 exportó a 17 países, principalmente a Venezuela, Estados Unidos, Kenia, entre otros (ASERCA, 2018).

En Puebla, más de 500 mil hectáreas están dedicadas al cultivo de maíz, es decir, cerca de 994 mil hectáreas están destinadas a la agricultura, el 60.1% se siembran con cultivos de maíz. En los años 2008/2009 se consumieron aproximadamente 1.74 millones de toneladas de maíz; de las cuales 1,14 millones fueron de maíz blanco y 0.49 millones de maíz amarillo (SAGARPA, 2017).

### **7.1.2 Afectaciones ambientales en los cultivos de maíz**

El cultivo de maíz es susceptible a una gran variedad de patógenos y enfermedades, entre estos se encuentran los hongos micotoxigénicos, que su crecimiento es favorecido por las condiciones bióticas como los suelos degradados o escasos de nutrientes y abióticas como, las altas y bajas temperaturas, las sequías, la salinidad, así como el origen del inóculo, la vulnerabilidad de los genotipos y el manejo de malas prácticas agrícolas, que permiten la infección y multiplicación del patógeno, el cual se desarrolla con mayor frecuencia en las etapas finales del cultivo. Aunque son muchas las enfermedades causadas por hongos, que afectan su desarrollo tanto en calidad como en cantidad, las más estudiadas son aquellas que por su alta frecuencia y severidad se consideran de importancia económica (Varón de Agudelo, Sarria, 2007). Dentro de las afecciones causadas por los hongos patógenos destacan las producidas por el género *Fusarium*, el cual se encuentra de manera natural en el suelo por lo que está asociado a las pudriciones de raíz y tallos de muchos cultivos o plantas (Figueroa-Rivera *et al.*, 2010).

El proceso de contaminación se inicia en el campo, aumenta durante la cosecha, las operaciones de secado y continúan acumulándose durante el almacenamiento. Algunas especies de *Fusarium* se desarrollan durante el almacenamiento cuando la humedad es alta y la temperatura es baja, lo que puede incurrir en la propagación de micotoxinas cuando los granos son almacenados en silos. Hernández-Delgado y colaboradores, determinaron que existe una mayor incidencia de hongos micotoxigénicos en maíz almacenado a comparación del maíz en campo (García *et al.*, 2007).

La temperatura y la humedad son los dos principales factores que influyen en el deterioro del maíz en el almacén. Ambas condiciones favorecen el crecimiento de microorganismos que afectan la calidad del grano, cuyo promedio de daño a nivel nacional se considera del 25%. Las pérdidas globales de maíz durante el periodo de la postcosecha se encuentran entre 10 – 40% afectando principalmente a los agricultores de escasos recursos (García-Lara & Bergvinson, 2007).

## **7.2 Fusarium micotoxigénico**

El género *Fusarium* pertenece a un grupo de hongos filamentosos, con más de 100 especies descritas. Se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y plantas. Es una especie cosmopolita y endémica en todas las regiones productoras de maíz del mundo. Es estudiado por su alta capacidad genética para sintetizar micotoxinas bajo condiciones óptimas de temperatura que oscilan entre los 18 a 30 °C y una humedad relativa del 88 %. Estas son capaces de inducir efectos tóxicos agudos y crónicos que suelen relacionarse con el tipo de micotoxina, el nivel de exposición, las especies animales que se exponen y la edad de estos. Las principales micotoxinas producidas por este género son: tricotecenos (TCT), fumonisinas (FB) y zearalelona (ZEA) (Castro, N. M. C., 2015; Serrano-Coll & Cardona-Castro, 2015).

La taxonomía de este género es bastante compleja, uno de los principales trabajos referente a esta, es el tratado de Wollenweber & Reinking en 1935 en el cual se identificaron 65 especies agrupadas en 16 secciones (Tapia, Amaro., 2014). Todas las especies pertenecientes a este género tienen una característica común que es la producción de macroconidios y microconidios como estructuras de propagación, de diversas formas, generalmente con una sola célula basal en forma de pie, los macroconidios se producen en esporodoquios como en el micelio aéreo (DGSV-CNRF. 2020). Algunas especies forman clamidosporas como estructuras de resistencia y propagación, las cuales pueden presentarse solas en cadena o grupos y también pueden formarse en los conidios. La morfología de los conidios es la principal característica para la identificación de especies de *Fusarium*, aunado a esto la combinación de otras características primarias o secundarias constituyen la base para la taxonomía de este género (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

En el laboratorio clínico la identificación de *Fusarium* spp. se basa en el reconocimiento de características macroscópicas y microscópicas, como la textura y el color micelial, la forma y tamaño de estructuras como los macroconidios, y la disposición, forma y tamaño de los microconidios (Figura 1), sin embargo, estos caracteres morfológicos específicos fácilmente observables son escasos y la morfología por sí sola no es suficiente para diferencia específicamente a las especies dentro del género. La identificación de una cepa de *Fusarium* basada en sus características fenotípicas puede estar errada hasta en el 50% de los casos, por lo que es importante realizar estudios que se complementen como lo es la caracterización genotípica (López-Bautista *et al.*, 2020).

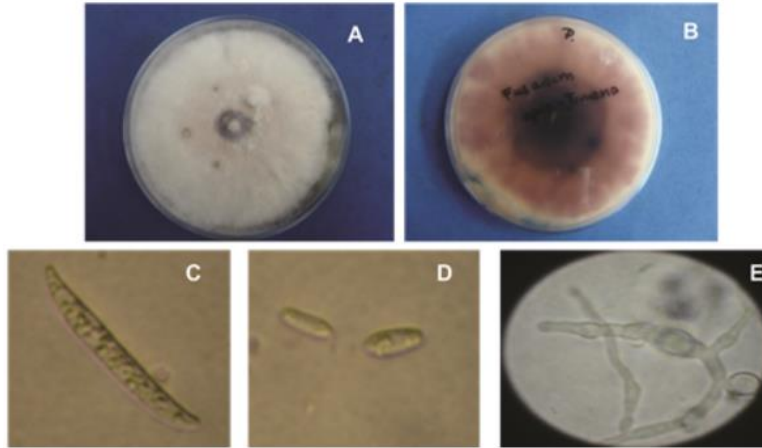


Figura 1.- *Fusarium* spp en medio PDA. Micelio algodonoso y de color blanquecino-rosado en los primeros días de desarrollo (A) Conforme el micelio se ha desarrollado se tornó un color púrpura que se observó por el reverso (B). Características morfológicas de los macroconidios, microconidios y clamidiosporas(C-D-E).

Fuente: Renta *et al.*, 2018

Con anterioridad *Fusarium verticillioides* era conocido como *F. moniliforme* (teleomorfo *Gibberella moniliformis*, de igual manera fue reportado como población de apareamiento A del complejo *G. fujikuroi*). Este patógeno probablemente es el más común de los cultivos de maíz a nivel mundial y puede sobrevivir en los residuos de la mazorca hasta 630 días, incluso en la superficie del suelo y en los tallos enterrados a profundidades de 15 o 30 cm, causando daño en todas las etapas del cultivo, por lo que principalmente provocan pudrición de raíz y mazorca (Xu *et al.*, 2023). En los estados iniciales de la contaminación en las mazorcas por *F. verticillioides* se observa en los granos una coloración blanca sobre la superficie, conforme es hongo se va desarrollando se forma un micelio blanco o se va tornando rosado, que puede ser fácilmente observado sobre o entre los granos. En estados ya avanzados *F. verticillioides* puede ser transmitido por semilla durante la germinación de los granos. Esta colonización es favorecida por alta humedad relativa, deficiencias nutricionales en el suelo, insectos barrenadores, por problemas de punta descubierta, por daño de pájaros, cosecha tardía y el volcamiento (Varón de Agudelo & Sarria, 2007).

En Agar Papa Dextrosa, la macromorfología de *Fusarium verticillioides* (Figura 2) se caracteriza por presentar un micelio blanco en la etapa inicial, posteriormente va formando pigmentos desde una coloración gris a violeta. En algunos cultivos conforme va declinando su desarrollo, la hifa produce melanina que forma unas estructuras denominadas esclerocios. En su micromorfología en estado anamorfo se observan abundantes microconidias con forma ovalada con base plana y agrupadas en cadenas. En algunas otras cepas se pueden observar o desarrollan macroconidias largas y delgadas que van desde los cinco a seis septos (López-Bautista *et al.*, 2020).

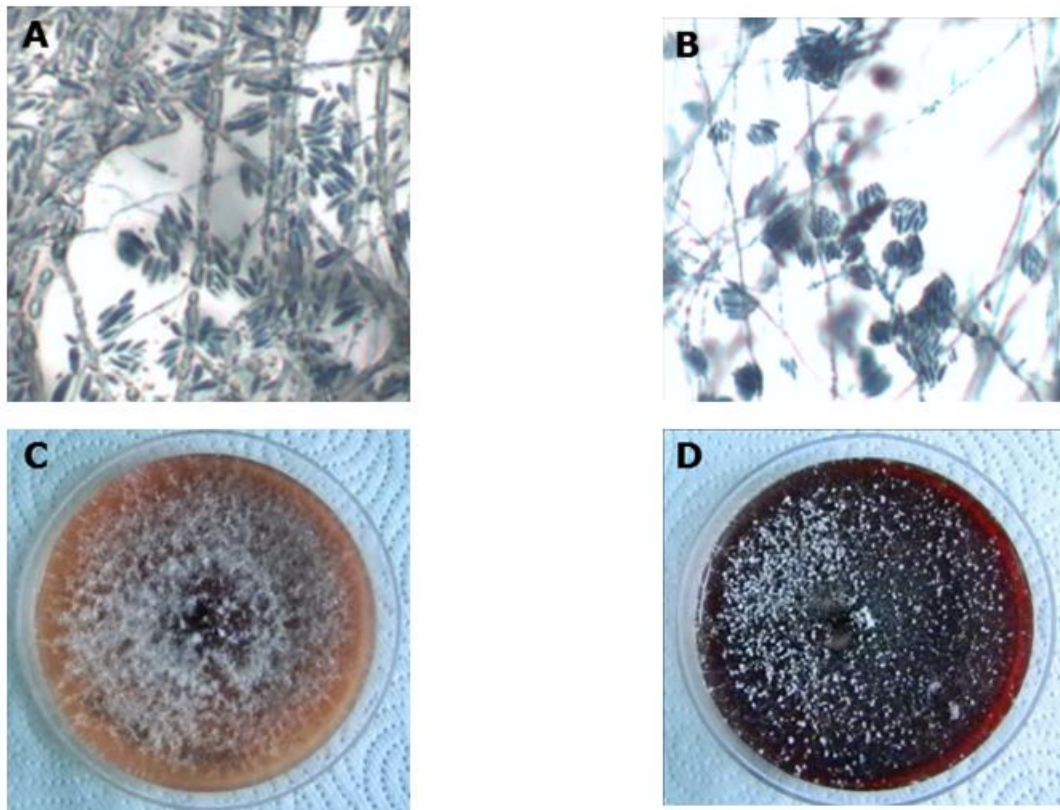


Figura 2.- *Fusarium verticillioides*. Microconidias de *F. verticillioides* producidas en esporodocios (A) y en cadenas (B). Micelios de *F. verticillioides* en PDA (C-D).

Fuente: De la Torre-Hernández *et al.*, 2014.

### 7.2.1 Micotoxinas como riesgos ambientales y a la salud pública

Bennett (1987) definió a las micotoxinas como “compuestos naturales de bajo peso molecular producidos por hongos microscópicos que generan una respuesta tóxica cuando son introducidos en concentraciones bajas en animales por una ruta natural”. Las rutas naturales incluyen la ingestión, el contacto directo con la piel, la inhalación, entre otros (Mendoza *et al.*, 2017).

Estos metabolitos secundarios son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos. Los ácidos grasos son metabolitos primarios utilizados por los mohos como fuente de energía. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Duarte-Vogel & Villamil-Jiménez, 2006).

Desde 1960 con la aparición de la micotoxicología moderna se han podido describir varias micotoxinas, las más importantes por sus afectaciones a la salud pública y animal, su alta incidencia y niveles de ocurrencia son las aflatoxinas (AF), los tricotecenos (TCT), la ocratoxina A (OTA), las fumonisinas (FB) y la zearalenona (ZEA) (Cuadro 1) (Bolet & Socarrás, 2005; Duarte-Vogel & Villamil-Jiménez, 2006).

**Cuadro 1. Hongos asociados a la producción de micotoxinas en alimentos.**

Alimentos y hongos asociados a las micotoxinas		
Micotoxinas	Alimentos	Hongos asociados
Aflatoxinas	Maní, pistacho, nueces, maíz, semilla de algodón y cereales	<i>Aspergillus paraciticus</i> , <i>A. flavus</i>
Fumonisin	Maíz y otros	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F.</i>

	cereales	<i>proliferatum</i>
Ocratoxina	Legumbres, cereales y granos de café	<i>Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus</i>
Tricotecenos	Trigo, maíz	<i>Fusarium tricinctum, F. poae y otras especies de Fusarium</i>

Fuente: Requena *et al.*, 2005.

Las fumonisinas son sintetizadas durante el metabolismo de *Fusarium verticilloides* y *F. proliferatum*, colonizan principalmente maíz, y los factores ambientales son determinantes para su proliferación (Presello *et al.*, 2016).

Se conocen y caracterizan más de 15 homólogos de fumonisinas como fumonisinas A, B, C y P. Además, entre las fumonisinas B, FB1, FB2 y FB3 son las más abundantes, siendo la FB1 la forma más tóxica que puede coexistir con otras formas de fumonisinas, es decir, FB2 y FB3 (conforma más del 75% del total de las fumonisinas) Estas formas (FB1, FB2 y FB3) son los principales contaminantes de los alimentos. Las fumonisinas B contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificados en C-14 y C-15. Estos compuestos difieren por la presencia o la ausencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10. FB1 consta de un diéster con ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (TCA) y 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxileicosano donde los grupos hidroxilo (OH-) en las posiciones C-14 y C-15 involucradas con los grupos carboxilo (-COOH) del TCA para formar un éster. Por otro lado, FB2 y FB3 son en realidad los análogos deshidroxi C-5 y C-10 de FB1(Figura 3) (De la Torre *et al.*, 2014).

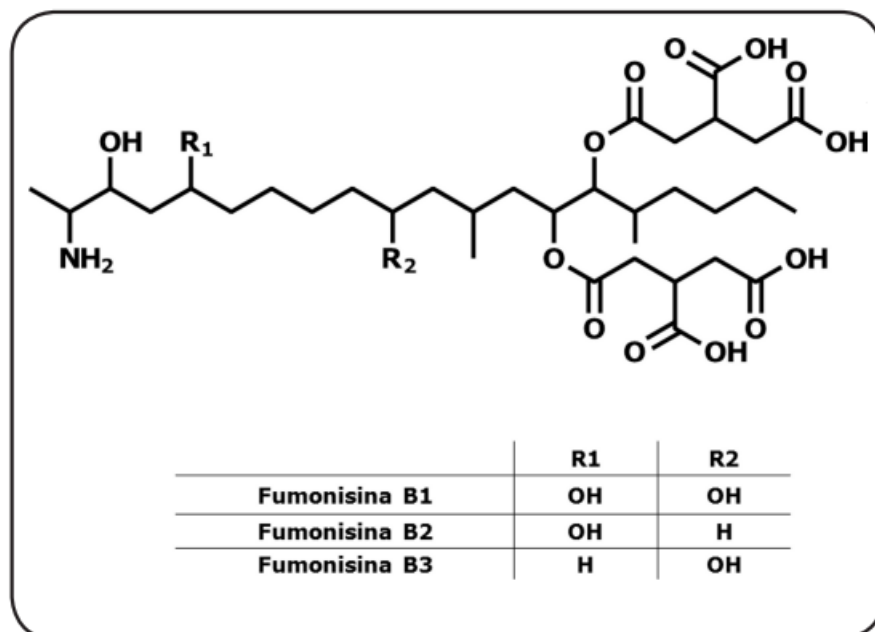


Figura 3.- Estructura química de las fumonisinas B1, B2 y B3.

Fuente: De la Torre *et al.*, 2014.

Los principales factores que tienen influencia sobre el grado de toxicidad de las micotoxinas en los humanos son: la biodisponibilidad, los sinergismos entre ellas, la cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido, la continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado, el peso y la edad del individuo y finalmente su estado fisiológico y de salud (Requena *et al.*, 2005).

Las micotoxinas actúan como "asesinos silenciosos", en el que su consumo en dosis muy pequeñas no induce síntomas clínicos perceptibles, pero con el tiempo puede traer graves consecuencias sobre la calidad y durabilidad de la vida (Requena *et al.*, 2005). La intoxicación causada por la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas metabolizadas por hongos se denomina "micotoxicosis". Los principales síndromes que se presentan son neurotóxicos (leucoencefalomelacia), nefrotóxicos, hepatotóxicos, edema

pulmonar y cerebral, lesiones cardíacas y cáncer de esófago. Los órganos afectados son cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón. Los niños y los jóvenes son más susceptibles a la toxicidad de las micotoxinas debido a una mayor variación del metabolismo basal, ellos pueden no tener suficientes mecanismos bioquímicos para la detoxificación. En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad a las micotoxinas que afecten al sistema nervioso central (Peraica, *et al.*, 2000).

FB1 está implicada en la incidencia de hepatocarcinoma, estimulación y supresión del sistema inmunológico, defectos en el tubo neural, nefrotoxicidad y otras dolencias. Es destacada como promotora del hepatocarcinoma, donde sus interacciones sinérgicas con la aflatoxina B1 (AFB1) han exhibido promoción del cáncer en modelos animales (trucha arcoíris y ratas). La agencia internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) caracterizó al FB1 como un posible carcinógeno humano del grupo 2B (Kamle, *et al.*, 2019).

En el ambiente los dos principales factores que influyen en el crecimiento de hongos y la producción de fumonisinas son la temperatura y el potencial hídrico, por lo tanto, la contaminación de los alimentos por fumonisinas depende de las condiciones agroclimáticas. De esta manera, la ubicación geográfica de México favorece la infección y síntesis de micotoxinas, ya que la contaminación por estas se presenta especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales. Anualmente, el 25% de los cultivos cosechados están contaminados por micotoxinas, lo que provoca enormes pérdidas económicas a los productos agrícolas e industriales. Estas micotoxinas son de naturaleza estable y no se eliminan durante el procesamiento, cocción, horneado, tostado y pasteurización de los alimentos. Las escasas prácticas agrícolas, así como las prácticas poscosecha, como técnicas de secado inadecuadas,

procedimientos de manipulación, materiales y métodos de embalaje y condiciones de almacenamiento y transporte, son responsables del mayor riesgo de crecimiento de hongos y contaminación por fumonisinas (Kamle, *et al.*, 2019).

La infección del maíz por *F. verticillioides* y la proliferación de fumonisinas también está determinada por el daño de los insectos y las características de la planta. La infección de pudrición de la mazorca por *F. verticillioides* ocurre durante la etapa de floración y se ve favorecida por condiciones cálidas y secas; sin embargo, se ha descubierto que las condiciones cálidas y húmedas después de la sedación son favorables para el desarrollo del hongo. Las condiciones climáticas son críticas para la acumulación de toxinas durante la floración y antes de la cosecha. Se ha descubierto que la menor cantidad de precipitaciones con temperaturas máximas de 30 a 35 °C durante la floración induce el desarrollo de patógenos (Kamle, *et al.*, 2019).

### **7.2.2 Límites permitidos de micotoxinas en alimentos**

La OMS, en colaboración con la FAO, es la encargada de evaluar y regular los riesgos para los seres humanos de la contaminación de los alimentos por micotoxinas y asimismo recomendar una protección adecuada. Sin embargo, la reglamentación de micotoxinas permitidas en alimentos varía según las normativas que los países o las comunidades de comercialización internacional a las que pertenecen. Según la FDA los límites establecidos de fumonisinas totales en maíz para consumo humano es de 2-4 ppm (Cuadro 2) y la ingesta diaria máxima tolerable temporal de fumonisinas se ha fijado en 2 µg/kg de peso corporal/día, basándose en la falta de efectos adversos observados de nefrotoxicidad en ratas por parte de

la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud.

En el aspecto sanitario, México cuenta con la norma NOM-247-SSA1-2008 (Diario Oficial de la Federación, 2008) para la regulación del contenido de Aflatoxinas totales en cereales de origen nacional o importado para el consumo humano y animal, sin embargo, en dicha norma, no se considera que los cereales pueden estar contaminados por otras micotoxinas, aunado a esto se desconoce el grado de exposición de los consumidores de maíz a las fumonisinas.

La exposición a micotoxinas debe mantenerse tan baja como sea posible para proteger la salud pública y la seguridad alimentaria, por lo que el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) quienes se han encargado de evaluar a las micotoxinas por diversos años considera que la presencia de hongos y micotoxinas puede reducirse mediante la implementación de diversas medidas preventivas, antes y después de la cosecha, aplicando prácticas agrícolas sostenibles de control de plagas y enfermedades, y buenas prácticas de cosecha, secado y almacenamiento (Requena *et al.*, 2005).

**Cuadro 2.- Niveles de micotoxinas encontradas en alimentos y sus niveles permisibles según la FDA (2004).**

Micotoxina	Alimento	Niveles comunes ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Niveles con episodios tóxicos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Niveles permisibles de la FDA
Aflatoxinas	Maní	2-6	30-125	20 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en alimentos; 0,5 ppb aflatoxina M1 en leche
	Mantequilla de maní	10	14-213	
	Maní azucarado	20	30-230	
	Maíz	>10		
Fumonisina	Productos de	1-12	>20,000	2 ppm en germen seco de

	maíz			maíz molido; 3 ppm en el maíz para las cotufas; 4 ppm en entero de los productos del maíz, del salvado del maíz y de masa parcialmente desgerminada
	Maíz (de varios países)	30-2.000		
Ocratoxina A	Cebada	<3	>25 (Riñón del cerdo)	Ningún nivel es permisible
	Trigo	210-2.900 la harina del pan (trazas)	3.800 (cebada en la República Checa)	
	Maíz			
Patulina	Jugo de manzana	9-146	1.000	50 ppb (µg/kg) En jugo de manzana o alimento que contienen jugo de manzana como un ingrediente
Tricotecenos	Harina de trigo	170-400	38.000	1 ppm para el deoxynivalenol en productos terminados de trigo.
	Harina de maíz	100-400	84,000 (en importaciones)	
	Palomitas de maíz	80		
	Pan			

Fuente: Requena *et al.*, 2005.

### 7.3 Seguridad alimentaria

En la actualidad acceder a una alimentación saludable es una realidad que no está al alcance de todos, aunado a esto la creciente preocupación por el ambiente y la conservación y preservación de los recursos naturales, son una problemática de gran relevancia. En septiembre de 2015 se llevó a cabo la Asamblea General de las Naciones Unidas, en donde los dirigentes mundiales de 193 países (incluido México) participaron activamente en la aprobación de la Agenda 2030, la cual consta de 17 Objetivos del Desarrollo Sostenible (ODS), donde se establece un plan para intensificar los esfuerzos de los próximos 15 años con el propósito de poner fin a la pobreza en todas sus formas, reducir la desigualdad y luchar contra el cambio climático (ONU, 2016).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (1996) se hizo referencia al término “Seguridad Alimentaria” para aludir al derecho de las personas al acceso físico, social y económico de alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfarán sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para una vida sana y activa. Cuando alguna de estas características no se cumple, ya sea por un periodo corto, las personas, hogares o grupos de población se encuentran en inseguridad alimentaria. En situaciones de emergencia y crisis económicas, se ha profundizado sobre la inseguridad alimentaria entre la población más vulnerable, principalmente en los hogares que una gran parte de sus ingresos es destinado a la compra de alimentos; ya que aumentan el consumo de alimentos de baja calidad nutricional, altos en grasa, sal azúcar y disminuyen el consumo de alimentos saludables, como los de origen animal, verduras y frutas, que en algunos casos son más costosos (Huato *et al.*, 2016).

Para lograr alcanzar los ODS (Figura 4) es importante mejorar los sistemas agrícolas, implementar prácticas agrícolas y sistemas alimentarios sostenibles desde una perspectiva integrada y multidisciplinaria. El aprovechamiento de los recursos biológicos es un insumo clave para tener suelos sanos, aumentar el rendimiento de las tierras agrícolas existentes, detener su degradación y controlar las plagas en los cultivos de alimentos (ONU, 2016).



Figura 4.- Objetivos del Desarrollo Sostenible (ONU, 2016) compatibles con la investigación para el biocontrol de *Fusarium* micotoxigénico de cultivos de maíz.

#### 7.4 *Trichoderma* como agente de control biológico

El género *Trichoderma* se describió por Persoon en 1794. Posteriormente, Rifai en 1969 propuso nueve especies, las cuales se identificaron mediante las diferencias morfológicas y fisiológicas; sin embargo, con la taxonomía establecida sobre caracteres morfológicos no se diferencian específicamente las especies en el género. Las colonias de los aislamientos de *Trichoderma* presentan rápido crecimiento, poseen color blanco y se tornan verde oscuro con abundante esporulación. En general, en medio PDA, este hongo no presenta micelio aéreo y su pigmentación puede variar desde verde oscuro hasta verde claro y, en ocasiones, tornarse amarillento (Figura 5). Durante su desarrollo y crecimiento producen hifas de 5 -10 $\mu$ m de ancho que conforman el micelio septado, con paredes compuestas por quitina y glucano (Martínez *et al.*, 2015).

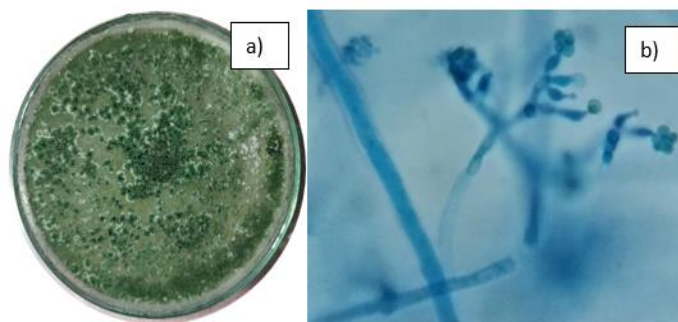


Figura 5.- Aislamiento de *Trichoderma* sp. en agar Sabouraud. a): Crecimiento de micelio. b): Estructuras microscópicas: fiálides, hifas y conidias (40x). Obtenido en: Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias microbiológicas.

Fuente: Propia, 2023

Los hongos pertenecientes a este género son saprofitos de crecimiento muy rápido. Las especies se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición como madera y hojarasca. A nivel mundial son de importancia económica ya que son capaces de producir enzimas de interés biotecnológico y son reconocidos como excelentes agentes de control biológico, debido a diferentes modos de acción, y a sus mecanismos promotores de crecimiento en las plantas (Chiriboga *et al.*, 2015; Maniscalco & Dorta, 2015).

El género *Trichoderma* destaca por su empleo en el biocontrol de hongos fitopatógenos, debido a sus mecanismos de acción, enzimas y capacidades antagonistas variables (Cuadro 3), que dependen de la especificidad de cada cepa. Las cepas nativas son más efectivas que las importadas ya que presentan un rápido crecimiento, una amplia capacidad de esporulación y adaptación a diferentes tipos de suelos agrícolas. Dentro de los mecanismos responsables de su capacidad antagonista presentan: antibiosis, competencia (espacio-nutrientes), micoparasitismo, desactivación de enzimas de los patógenos y otros (Martínez *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el *Trichoderma* spp. actúa contra una gran variedad de hongos fitopatógenos transmitidos por aire y suelo. Diferentes especies se han utilizado contra infecciones y pudriciones causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*; y patógenos formadores de esclerocios como *Sclerotinia* y *Sclerotium* (Chiriboga, *et al.*, 2015)

Existen trabajos sobre *Fusarium* spp., Tarazona *et al.*, (2014) en su trabajo “Capacidad Antagonista de Hongos Celulolíticos frente a *Fusarium* spp. y *Macrophomina* spp.”; mencionan que las especies de *Fusarium* están descritas como hongos de campo, pero además están presentes en los almacenamientos postcosecha, cuando existen factores

favorables como la disponibilidad de agua y bajas temperaturas. De esta manera están estrechamente relacionados con en el desarrollo de distintas fitopatologías, podredumbres de raíces y los tallos, los mohos rosados y blancos de las enfermedades de postcosecha.

En relación con la presencia y disminución de las micotoxinas producidas por *Fusarium* en maíz, Guevara, *et al.* (2016) evaluaron el efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma* sp., sobre *Fusarium* sp., en plantas de tomate cultivadas en invernadero; además de comparar la acción biocontroladora de la cepa de *Trichoderma* sp. con una alternativa química de control dada por el fungicida Benomilo y con una formulación comercial de *T. viride*. La cepa de *T. viride* presentó una alta eficiencia protectora, con un 90% de sobrevivencia de plantas, la cual fue siempre superior a la cepa de *Trichoderma* sp, que alcanzó al 70% de sobrevivencia, por lo que *Trichoderma* sp. es un agente de biocontrol potencial contra *Fusarium* (Chiriboga *et al.*, 2015)

Debido a lo anterior las cepas de *Trichoderma* son una alternativa sostenible para el control biológico de fitopatógenos por su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera y su eficiencia para el control contra hongos fitopatógenos, su alta promoción del crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa. Las diferentes especies se caracterizan por presentar un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo (Ríos, 2014).

### **Cuadro 3.- Beneficios de la aplicación de *Trichoderma* spp.**

Ofrece un control eficaz de enfermedades de las plantas.
--

Posee un amplio rango de acción.
Se propaga en el suelo, aumentando su población y ejerciendo control duradero en el tiempo, sobre hongos fitopatógenos.
Con el uso de microorganismos en los cultivos, las plagas no generan resistencia como sucede cuando se utilizan agroquímicos.
Ayuda a descomponer la materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para la planta, por lo tanto, tiene un efecto indirecto en la nutrición del cultivo.
Estimula el crecimiento de los cultivos, porque posee metabolitos que promueven los procesos de desarrollo en las plantas.
Puede ser aplicado en compostaje o materia orgánica en descomposición, para acelerar el proceso de maduración de estos materiales, los cuales a su vez contienen el hongo cumpliendo también función de biofungicida.
Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagónicos.
Preserva el ambiente al disminuir el uso de fungicidas.
Al reemplazar agroquímicos sintéticos por microorganismos benéficos, el productor ahorra en sus costos de producción.
Ataca patógenos de la raíz ( <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> ) y del follaje ( <i>Botritis</i> y <i>Mildu</i> ) antes que puedan ser detectados; y evita el ataque de ( <i>Phytophthora</i> ).
Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje de las plantas.
Promueve el crecimiento de pelos absorbentes y raíces alimenticias, mejorando la nutrición y la absorción de agua.
No se ha registrado ningún efecto fitotóxico, a consecuencia de su aplicación.

Fuente: Chiriboga *et al.*, 2015

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el siguiente diagrama experimental para lograr los objetivos establecidos (Figura 6).

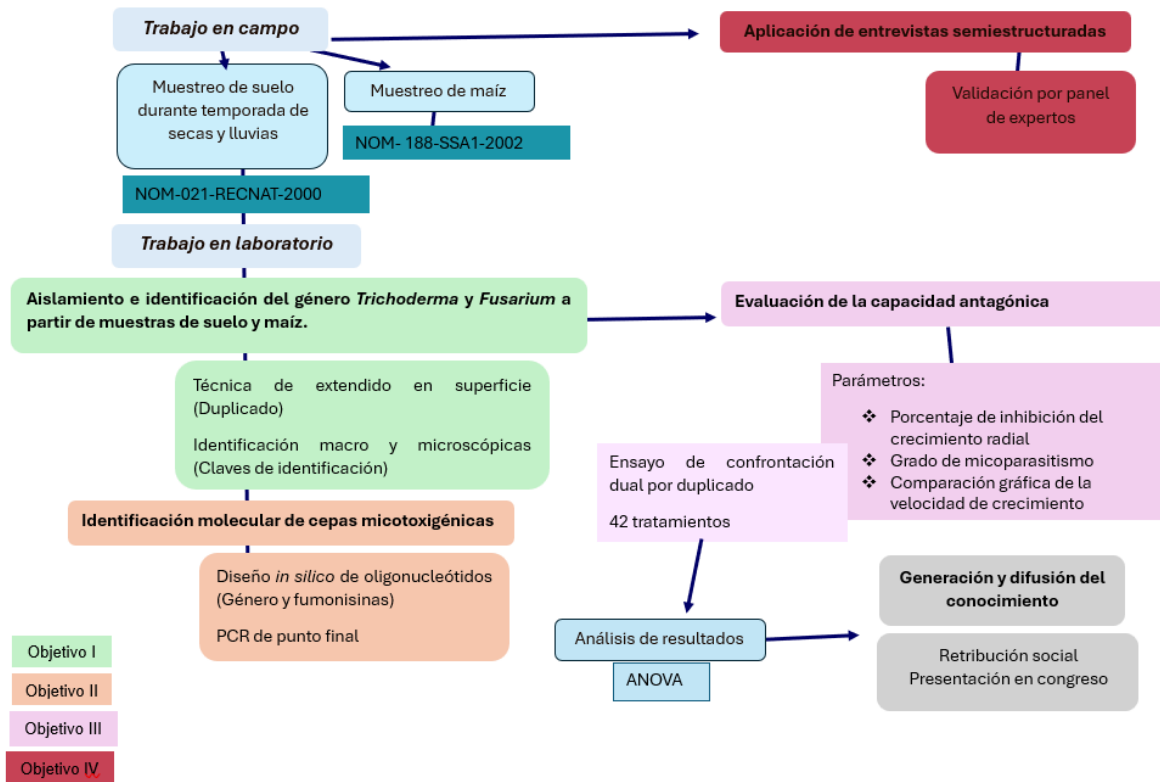


Figura 6.- Diagrama experimental de trabajo

## 8.1 Área de estudio

La investigación se realizará en dos localidades, la primera Santa María Tonantzintla (SMT) perteneciente al municipio de San Andrés Cholula (Figura 7) y la segunda San Miguel Canoa (SMC), una junta auxiliar perteneciente al municipio de Puebla (Figura 8).

La localidad de Santa María Tonantzintla se encuentra entre los paralelos 19° 02' y 16° 67' de latitud norte; los meridianos -98° 32' y 30° 56' de longitud oeste; y se encuentra a una mediana altura de 2080 msnm (metros sobre el nivel del mar). Con respecto al grado de rezago social, la localidad se ubica en la categoría de muy alto, aunado a esto, el porcentaje de población en situación de pobreza

es de 89.1% y de población en situación de pobreza extrema de 49.7% (CONEVAL, 2015).

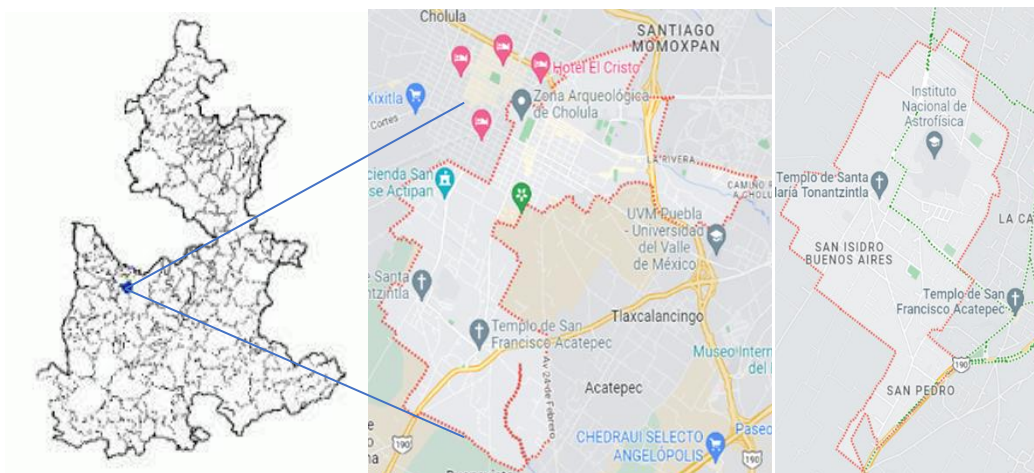


Figura 7.- Mapa de la ubicación de la localidad Santa María Tonantzintla.

Fuente: Google Maps

San Miguel Canoa se encuentra ubicado a una distancia de 12 kilómetros al noreste de la ciudad de Puebla de Zaragoza, capital del Estado y se encuentra en las faldas del Volcán Malintzi. Sus coordenadas geográficas son 19°09'07"N 98°06'11"O y con respecto a la población total expone un total 15,070 habitantes (INEGI, 2010).

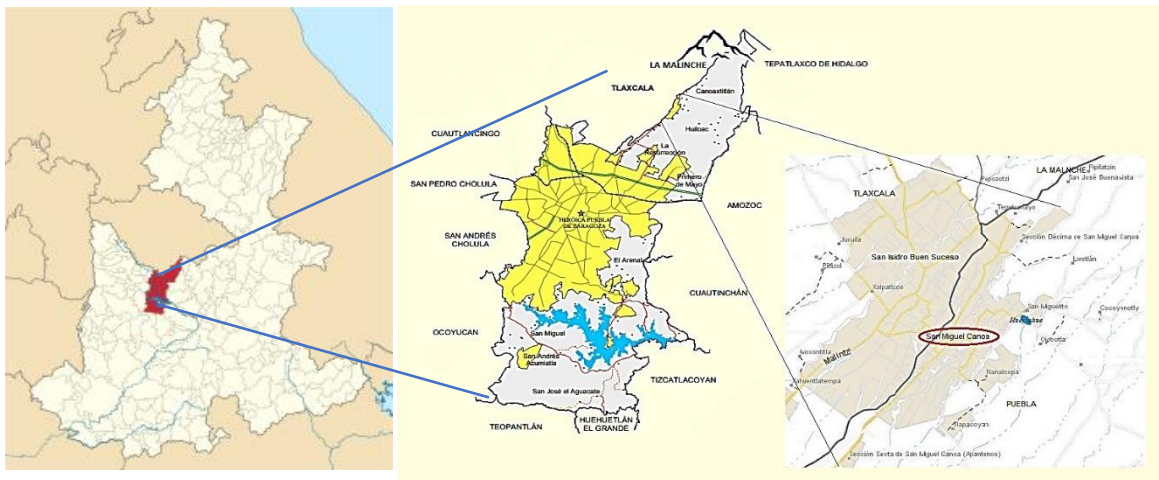


Figura 8.- Mapa de la ubicación de San Miguel Canoa

Fuente: Google Maps

## 8.2 Tipo de estudio

En el laboratorio de micología se llevó a cabo la identificación de los aislamientos de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* micotoxigénico, a través de un enfoque polifásico que consistió en la identificación micromorfológica y macromorfológica, asimismo su caracterización molecular.

Es un estudio de tipo transversal, de sistemas complejos con un enfoque epistemológico de tipo hipotético-deductivo, en el cual la fase de laboratorio se llevó a cabo en el laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas- ICUAP, en colaboración con el laboratorio del Departamento de Patogenicidad Microbiana, igual perteneciente al ICUAP.

### **8.3 Muestreo y aislamiento de cepas**

Se realizó trabajo en campo en dos temporadas del año (húmeda y seca) en las parcelas pertenecientes a cultivos de maíz de los sitios: Santa María Tonantzintla (SMT) y San Miguel Canoas (SMC) (Figura 9). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 se realizó un muestreo representativo de suelo agrícola, donde se recolectaron 50 submuestras de suelo de 200g por cada temporada por cada sitio de muestreo (Cuadro 4).



Figura 9.- Muestreo de suelo agrícola en zigzag de acuerdo con la NOM-021-RECNAC-2000 en San Miguel Canoa.

Fuente: Propia.

**Cuadro 4.- Se realizaron 2 muestreos por sitio, el primero en temporada seca y segundo en temporada húmeda.**

Sitio	Temporada de Secas	Temporada de lluvias
San Miguel Canoa (SMC)	50 submuestras	50 submuestras
Santa María Tonantzintla (SMT)	50 submuestras	50 submuestras
Total: 200 submuestras		

El muestreo de maíz cosechado y almacenado se realizó con base a la NOM-188-SSA1-2002. Estas muestras se colocaron en bolsas de polietileno para transportarlas y procesarlas en el laboratorio de Micología del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

En la Figura 10, se puede observar una amplificación de los sitios donde se llevó a cabo el muestreo en el valle de Puebla (SMT y SMC). Ambas zonas pertenecen al grupo de vegetación de tipo agricultura temporal, a pesar de que se encuentran cercanas a zonas urbanizadas.

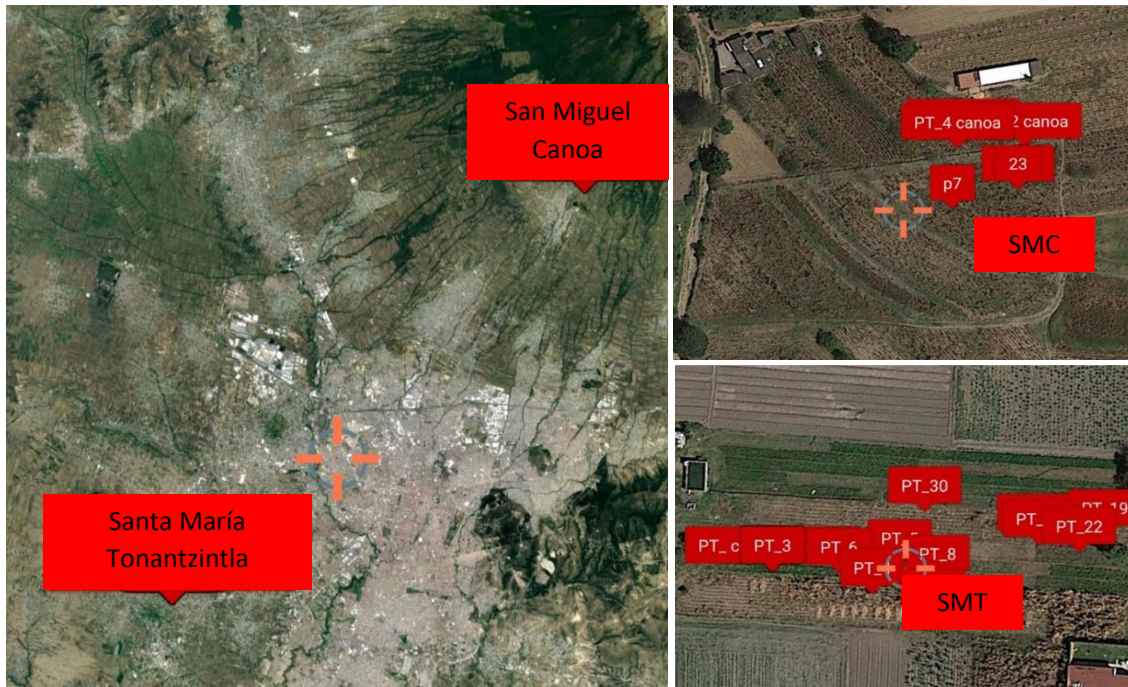


Figura 10.- Geolocalización de los sitios de muestreo: Santa María Tonantzintla (N 19°1'31'', O 98°19'23'') y San Miguel Canoa (N 19°9'29'', O 98°5'20'')

Fuente: UTM Geo Map

A partir de muestras de suelo se obtuvieron los aislamientos de cepas presuntivas de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* micotoxigénico. Mediante la técnica de extendido en superficie por duplicado. Se realizaron diluciones seriadas, que consisten en pesar 1g de suelo por muestra, posteriormente se agregar agua destilada estéril hasta 10 mL, obteniendo la primera dilución de  $10^{-1}$ , hasta la dilución seriada  $10^{-4}$ . Posteriormente en cajas Petri con agar dextrosa Sabouraud, PDA y Agar arroz se depositó 100  $\mu$ L de dilución  $10^{-4}$  y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días o hasta la aparición de colonias fungosas.

Posteriormente se seleccionaron las cepas que presentaron características propias del género de *Trichoderma* spp y *Fusarium* spp, y se realizaron cultivos axénicos, los cuales se sembraron en tubos con agar Sabouraud y PDA, incubados a la misma temperatura óptima y durante el mismo período. Una vez obtenidos los cultivos axénicos se les realizó la técnica

de microcultivos, la cual permite la correcta identificación microscópica de estructuras fúngicas. (Rippon & Castañeda, 1992; Gams, 1998; Cepero *et al.*, 2012; Bonifaz, 2015).

Se identificaron las características macroscópicas (patrón de crecimiento, color, forma y consistencia de su micelio) y microscópicas mediante microcultivos (hifas, esporas y clamidosporas). Las características macro y microscópicas fueron cotejadas con las claves de identificación de géneros de Deuteromycetes (Gams, 1998).

#### **8.4 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas**

La caracterización molecular de las cepas obtenidas identificadas como potencialmente micotoxigénicas se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas- ICUAP.

Para la caracterización molecular de las cepas micotoxigénicas, se realizaron cultivos monospóricos de estas. Su importancia radica en que los cultivos monospóricos establecen una colección confiable libre de contaminación, que garantiza autenticidad y permiten contar con aislados genéticamente homogéneos, con una mayor estabilidad en todas sus propiedades (Ames de Icochea, 2004).

Posteriormente los cultivos monospóricos se sembraron en medio Sabouraud, del micelio desarrollado se realiza la extracción de DNA mediante el kit Zymo Resech. El material genético de las cepas presuntivas será amplificado usando PCR.

Una vez obtenido el ADN de la cepa se amplificó usando los primers diseñados Fusgen F (5'- (ACACCCGTCAGTCCAGTTTC-3') y Fusgen R (5'- ACGTGGGAATAAGCACTCACC-3') para la caracterización del género, y los primers Fumonfus F (5'-CTCGTTTCTAGGCGGGTTGT-3') y Fumonsfus R

(5'GGCGAGAACAAGTCTGTGGA-3') para la identificación de la micotoxina Fumonisina de cepas de *Fusarium* micotoxigénico.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se corrieron reacciones de volumen final de 25  $\mu$ L, se emplearon: 10 ng de ADN genómico, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dNTPs (Applied Biosystems Inc.), 1 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 30 pmol de cada oligonucleótido.

La amplificación se realizó en un termociclador, usando el programa: 950C por 8 min, 35 ciclos de 950C por 15 s, 580C por 20 s y 720C por 1 min, y un ciclo de 720C por 5 min. El análisis de los productos de amplificación se realizará por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TAE 1X. Como marcador de pares de bases se usará Ladder de 100 pb. Las capturas de las imágenes de los geles se realizaron en un fotodocumentador.

### **8.5 Determinación de la actividad antagonica *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium* micotoxigénico**

Las pruebas de antagonismo *in vitro* se realizaron utilizando la técnica de cultivo dual en placas Petri de 90 mm de diámetro con agar Sabouraud, con tres repeticiones. Se colocaron 2 discos de papel filtro de 5 mm de diámetro en los extremos opuestos de la placa separados entre ellos a 5 cm y separados del borde a 2 cm. Se inocularon 20  $\mu$ L de la suspensión de conidios ajustados a la concentración deseada de cada cepa a enfrentar en cada disco de papel filtro. Para el control se inoculó por separado cada cepa de *Fusarium* y se incubaron a 28°C.

## 8.6 Evaluación de la capacidad antagónica

Se evaluó la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma*, mediante los siguientes parámetros:

### 8.6.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Se calculó el crecimiento radial de la cepa de *Fusarium* en los ensayos de enfrentamiento en cultivo dual y del cultivo control al séptimo día de incubación y se utiliza la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Donde: **R1**= Radio del control

**R2**= Radio del ensayo de enfrentamiento

### 8.6.2 Comparación gráfica de la velocidad de crecimiento

Se calculó el crecimiento radial de las cepas de *Fusarium* de los cultivos duales cada 24 h a partir de las 48 h de incubación y se comparó gráficamente con el crecimiento observado en los cultivos control.

### 8.6.3 Grado de micoparasitismo

Para determinar el micoparasitismo como posible mecanismo de acción se realizó la observación macroscópica de los cultivos duales al día 10 de incubación tomando como índice de micoparasitismo la invasión de las cepas de *Trichoderma* sobre la superficie del micelio de las cepas de *Fusarium* tomando en cuenta la escala del Cuadro 5.

#### Cuadro 5.- Escala de capacidad antagónica micoparasítica.

GRADO	CAPACIDAD ANTAGÓNICA
0	Ninguna invasión de la superficie del hongo patógeno
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.

<b>4</b>	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno con esporulación sobre ella.
----------	---

Fuente: Ezziyyani *et al.*, 2004.

## 8.7 Análisis estadístico

El experimento se realizó con un arreglo completamente al azar con tres repeticiones, posteriormente se realizó un análisis estadístico, empleando un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de T student ( $p \leq 0.05$ ).

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Estado del Arte de hongos micotoxigénicos y su biocontrol

A partir de las siguientes palabras clave: biocontrol, antagonism, *Trichoderma*, mycotoxins, *Fusarium*, y maize, se realizaron diferentes análisis bibliométricos con los programas VOSviewer y Bibliometrix, con la finalidad de constituir una actualización sobre los aspectos principales orientados al control biológico de hongos patógenos. Se obtuvo una base de datos en Scopus mediante la siguiente ecuación de búsqueda:

*Biocontrol AND Trichoderma AND mycotoxin AND Fusarium AND maize.*

Las áreas de estudio seleccionadas fueron: salud, ciencias ambientales, micología y agricultura.

Al realizar el análisis en el programa VOSviewer version 1.6.15, obtenemos la siguiente red de datos (figura 11) con la relación entre las palabras más mencionadas en los artículos. En esta figura se pueden visualizar los principales hongos utilizados en control biológico y micotoxigénicos, factores ambientales y compuestos químicos.



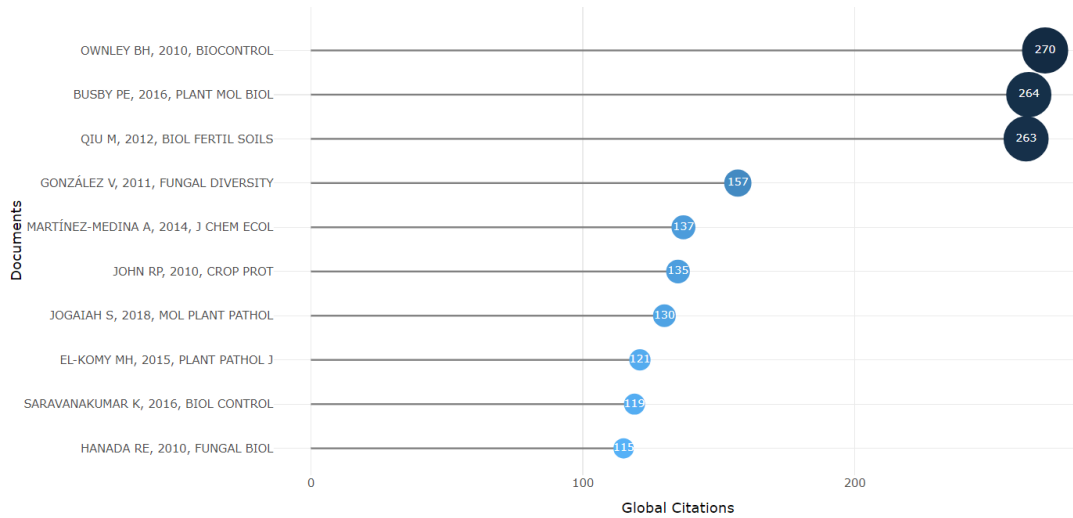


Figura 12.- Fueron analizados un total de 519 documentos, de los cuales 3 destacan por sus numerosas citas que van desde 263-270. Los autores con más artículos citados son Ownley, Gwinn y Vega; sus investigaciones se han basado en describir al género *Trichoderma* y han realizado pruebas de biocontrol sobre diversos hongos patógenos como lo son los hongos del género *Fusarium*.

Obtenida de Bibliometrix.

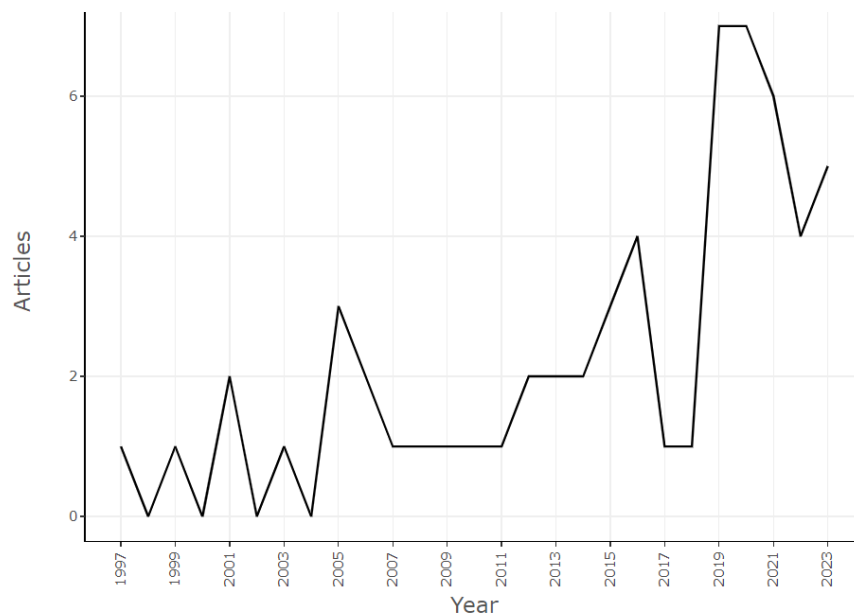


Figura 13.- Las publicaciones fueron mayores en el año 2019, en la actualidad las investigaciones han ido elevándose.

Obtenida de Bibliometrix.



La presencia de hongos benéficos en los suelos, mejora su calidad de esta manera permite tener cultivos eficientes, ya que mejoran la absorción de agua y nutrientes, aumenta la resistencia de los cultivos a enfermedades y plagas, mejora la calidad y cantidad de la producción agrícola y reduce la necesidad de fertilizantes químicos, sin embargo, si en los suelos se encuentra una mayor cantidad de hongos patógenos, estos pueden llegar a colonizar la producción agrícola y por lo tanto ser un riesgo para la salud humana y animal.

**Cuadro 6. Análisis micológico del suelo agrícola destinado al cultivo de maíz de los dos sitios de estudio.**

<b>Hongos</b>			
<b>UFC g<sup>-1</sup> de suelo</b>			
<b>SMT</b>		<b>SMC</b>	
<b>Temporada seca</b>	<b>Temporada húmeda</b>	<b>Temporada seca</b>	<b>Temporada húmeda</b>
6.0*10 <sup>5</sup> ± 47.14*10 <sup>3</sup>	10.33*10 <sup>5</sup> ± 43.140*10 <sup>3</sup>	9.6*10 <sup>5</sup> ± 47.140*10 <sup>3</sup>	9.5*10 <sup>5</sup> ± 70.710*10 <sup>3</sup>

En el muestreo de suelo se obtuvieron un total de 40 cepas pertenecientes al género *Trichoderma* y 38 cepas pertenecientes al género *Fusarium* (figura 15), además se encontró un mayor número de cepas de *Trichoderma* en la zona de San Miguel Canoa, a diferencia de Santa María Tonantzintla donde se encontró una mayor cantidad de cepas de *Fusarium*. De acuerdo con Samaniego-Gaxiola *et al.*, en 2007 el uso de agroquímicos y las malas prácticas agrícolas limitan el crecimiento de hongos benéficos, permitiendo el desarrollo de fitopatógenos. En contraste, el suministro de fertilizantes, agua, restos de parte de los cultivos y condiciones de humedad favorecen la actividad metabólica de los microorganismos del suelo.

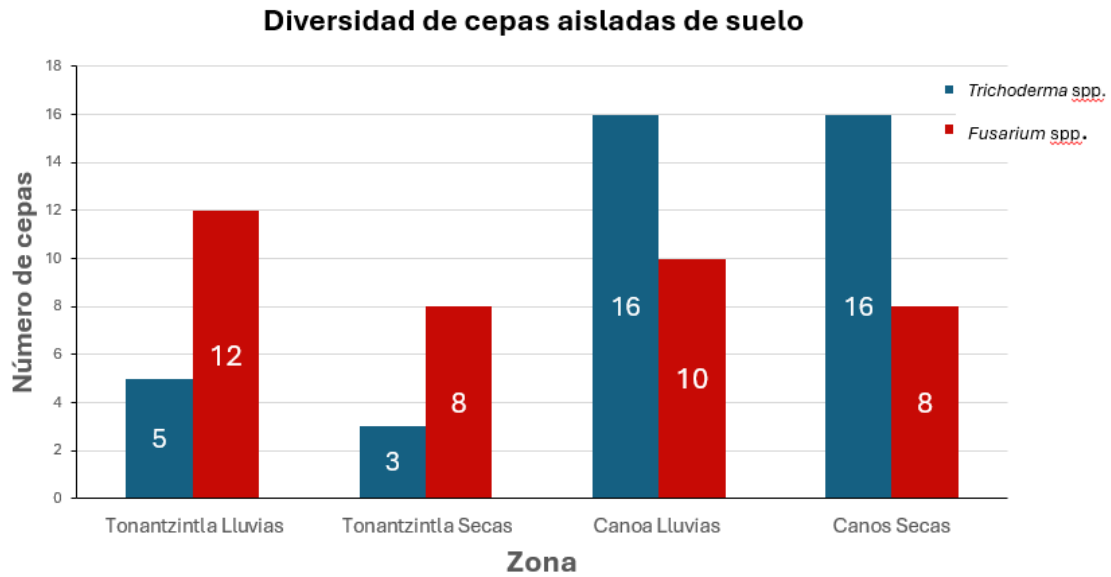


Figura 15.- Diversidad de cepas del género *Trichoderma* y *Fusarium* encontradas en las diferentes zonas. SMC: San Miguel Canoa, SMT: Santa María Tonantzintla.

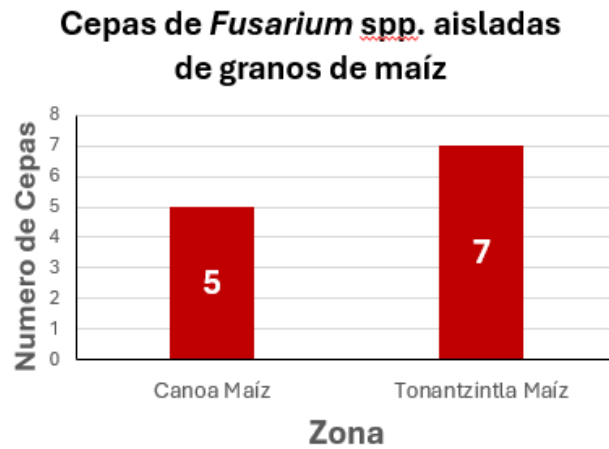


Figura 16.- Cepas del género *Fusarium* aisladas en muestras de granos de maíz en las zonas de estudio.

También se identificaron las características socioambientales de las zonas de muestreo con la finalidad de conocer las similitudes o diferencias de estos datos entre los sitios y debido a la importancia que tienen las condiciones socioambientales en la producción del cultivo de maíz que se realiza en pequeñas superficies. Como se puede observar en el cuadro 7, las

características socioambientales de los sitios de estudio muestran que ambos comparten el mismo clima y los rangos de temperatura y precipitación no son tan diferentes, además de ser zonas rurales. Es fundamental mencionar que la temperatura, la humedad y la precipitación son parámetros importantes que favorecen la presencia y distribución de hongos micotoxigénicos.

El cultivo de maíz temporal es la actividad agrícola más importante de los municipios de la zona Valle de Puebla. Según Osorio- García., *et al* (2015) en su trabajo, la totalidad de los agricultores entrevistados declaró tener como actividad agrícola principal la producción de maíz de temporal, y a su vez la función principal de la producción de maíz es asegurar el abasto de alimentos para la familia campesina, por lo que, sí los granos de maíz se encuentran contaminados con micotoxinas, las familias son más susceptibles a la exposición o ingesta, afectando gravemente su salud.

**Cuadro 7. Características socioambientales de los sitios muestreados.**

CARACTERÍSTICAS SOCIO-AMBIENTALES	SANTA MARÍA TONANTZINTLA	SAN MIGUEL CANOA
TIPO DE SUELO	Vertisol, Regosol y Arenoso	Acrisol
CLIMA	Templado subhúmedo	Templado subhúmedo
RANGO DE TEMPERATURA	14°-18°C	18 ° - 23°C
HUMEDAD	84-95%	80-95%
RANGO DE PRECIPITACIÓN	800- 1000 mm	1100 mm
ZONA	Rural	Rural
GRADO DE MARGINACIÓN	Bajo	Bajo
ALTITUD (MSNM)	2,137	2600
pH DEL SUELO	7.7 (seca) / 7.5 (húmeda)	7.3 (Secas)/ 7.0 (Húmeda)

Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2023)

### 9.3 Caracterización morfológica de *Trichoderma*

Se obtuvieron 40 aislados del género *Trichoderma*, agrupados en 4 especies de acuerdo con sus características morfológicas: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. hamatum* y *T. viride* (Cuadro 8).

La presencia de estas especies en diferentes sitios de muestreos puede representar posibles biotipos resistentes a múltiples factores ambientales. De acuerdo con Bononi *et al.* (2020), rápido crecimiento de *Trichoderma* spp. y su resistencia para crecer en diferentes sustratos, ha permitido su aislamiento en diversos suelos alrededor del mundo.

**Cuadro 8. Características morfológicas de las diferentes especies de *Trichoderma* aisladas.**

Especie	Colonia	Micelio	No. anillos	Conidias	Fiálides
<i>T. asperellum</i>	Verde oscuro	Plano	1	Elipsoidal	Agrupadas en 2-3 verticilos
<i>T. harzianum</i>	Verde oscuro	Algodonoso	2	Elipsoidal	Solitarias
<i>T. viride</i>	Verde oscuro	Algodonoso	3	Globosa	Agrupadas en 2-3 verticilos
<i>T. hamatum</i>	Verde ligero a azul verdozo	Algodonoso	1	Elipsoidal	Agrupadas en 2-3 verticilos
<i>Trichoderma</i> sp.	Verde ligero	Algodonoso	2	Sub-globosa	Agrupadas en 2-3 verticilos

Fuente: Savín-Molina *et al.*, 2021

### 9.4 Caracterización morfológica de *Fusarium*

Se obtuvieron un total de 50 cepas de *Fusarium*, 38 cepas provenientes de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz y 12 cepas recuperadas de granos de maíz. Las cepas mostraron diferencias en textura micelial: lisa y algodonosa. Por colorimetría se diferenciaron: blanco, morado, rosáceo y salmón (Figura 17). Presentaron macroconidios característicos del género: ovalados, curvos sin septas, con una septa y tres septas (Figura 18).

Tomando en cuenta sus características morfológicas se encontraron especies presuntivas de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*, posteriormente para confirmar que estos aislados sean pertenecientes a esas especies y sean productores de micotoxinas, se realizará amplificación por PCR.

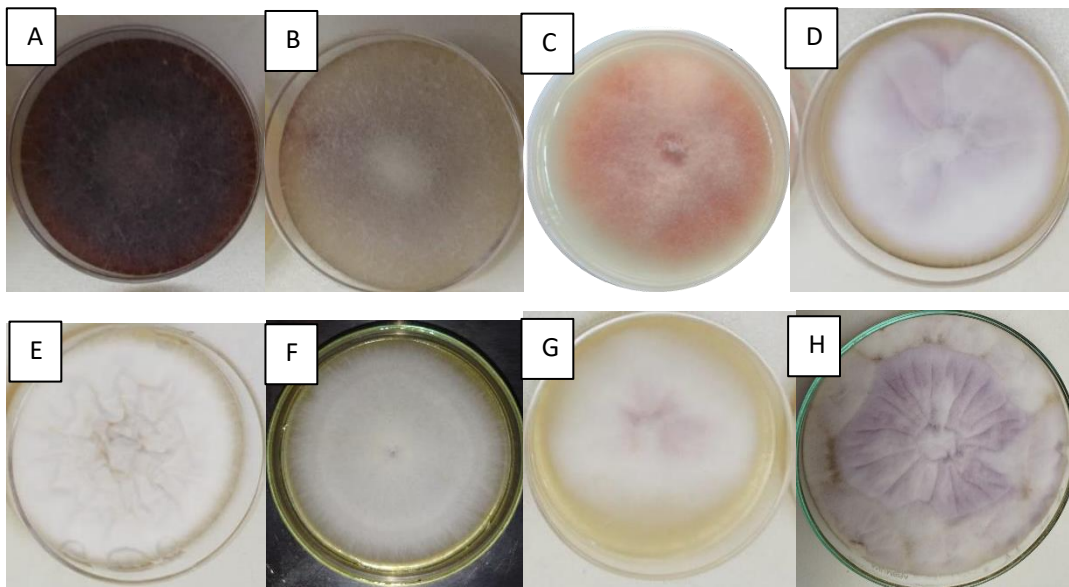


Figura 17.- Macromorfología de las cepas *Fusarium*: A- Morado, algodónoso, pigmentación marrón. B- Morado, algodónoso sin pigmentación. C-Salmón, algodónoso. D-Morado-algodonoso. E-Blanco, liso. F-Blanco, liso. G-Rosáceo, algodónoso. H-Morado, liso.

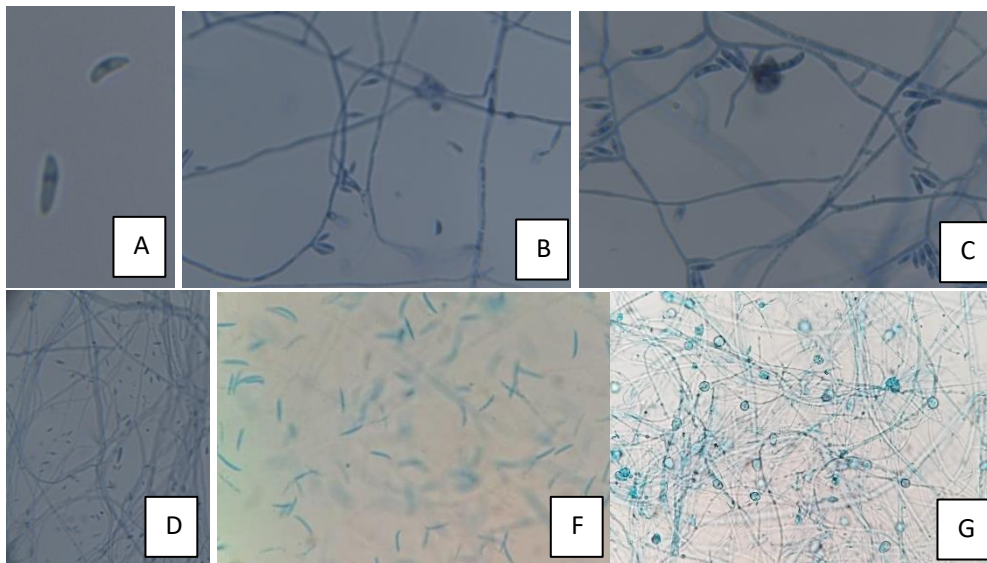


Figura 18.- Micromorfología de las cepas *Fusarium*. A-B, macroconidios ligeramente curvos con una septa. C-D, macroconidios rectos ligeramente rectos con 2-3 septas. F, macroconidios largos con curvatura dorso ventral de 3-6 septas. G, microconidios en cadena cortas.

De acuerdo con da Rosa *et al.*, (2021), la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium* en el laboratorio incluye características macroscópicas y microscópicas, como el color de la colonia en anverso y reverso, la longitud, forma y disposición de los macroconidios y microconidios. Sin embargo, la morfología por sí sola no siempre es suficiente para caracterizar y descartar especies crípticas, por lo que la identificación de una cepa de *Fusarium* por su fenotipo puede ser errónea hasta en el 50% de los casos, por lo que es importante llevar a cabo estudios complementarios como lo es la caracterización genotípica.

### **9.5 Diseño de los oligonucleótidos para la identificación del género *Fusarium* y la presencia de la fumonisina mediante análisis *in silico***

La construcción de bases de datos primarios, como el GenBank para almacenar y catalogar secuencias de ADN y proteínas han permitido a los investigadores contar con una amplia colección de datos para el uso y aplicación del genoma. El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), es una de las bases de datos de mayor importancia, contiene una amplia colección de información biológica incluyendo genomas, genes y proteínas de organismos y microorganismos.

Se diseñaron dos pares de primers específicos, uno para la caracterización del género *Fusarium* y el segundo para la identificación de especies de *Fusarium* productoras de micotoxinas (Fumonisin FB) utilizando el software del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), posteriormente se analizaron las secuencias de los

oligonucleótidos con el software Oligo Analyzer, (Figura 19). Las secuencias obtenidas fueron descargadas en formato FNA (nucleótidos). Se eliminaron los espacios de los interlineados en la secuencia original y se realizó un proceso de edición en los encabezados, donde finalmente fueron clasificadas con su respectivo identificador locus tag y convertidas a formato FASTA para su posterior análisis (Figura 20 y 21).

Los identificadores locus tag se aplican sistemáticamente a cada gen en un determinado genoma. Estas etiquetas se han convertido en nombres de identificación de importante utilidad para la clasificación de las secuencias de diferentes microorganismos.

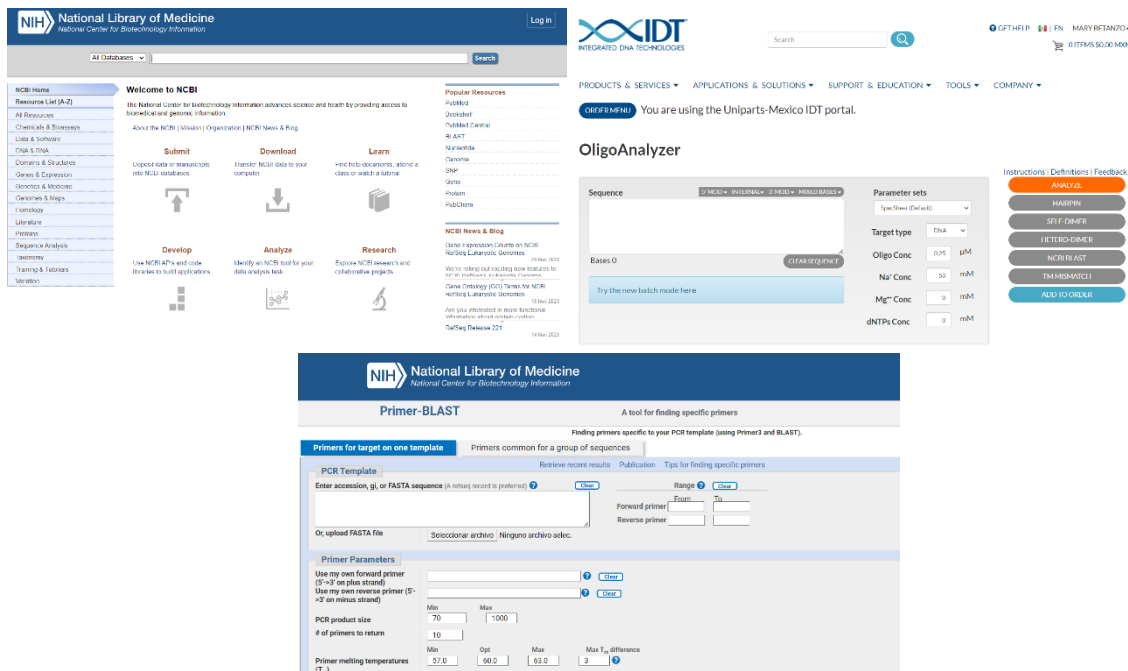


Figura 19.- Software utilizados para el diseño de primers.

Posteriormente del procesamiento de las secuencias se formaron las bases de datos BLAST a partir de archivos FASTA.

El programa BLAST se utiliza habitualmente para comparar secuencias dadas contra una base de datos de secuencias ya existentes, la cual produce alineamientos locales entre dos secuencias obtenidas. Además, genera un valor esperado, que estima el número de coincidencias entre las secuencias. En los cuadros 9 y 10 se pueden observar las alineaciones de las secuencias y como estas corresponden a las especies de *Fusarium*, además los hits están ordenados por el E-value, de menor a mayor.

Habiendo procesado las secuencias y tomado en cuenta los factores de similitud y homología entre ellas, se realizó una comparación y obtención de los K-meros compartidos entre estas, obteniendo así información de las zonas más conservadas entre una secuencia y otra, permitiendo el diseño de oligonucleótidos específicos que se unan a estas zonas y permitan su caracterización e identificación.

El diseño de oligonucleótidos específicos para una familia de genes se basa no solo en la similitud de los K-meros compartidos entre secuencias, sino también debe de tomarse en cuenta parámetros específicos que puedan influir en la identificación y caracterización de las zonas deseadas, estos parámetros consolidan la especificidad de los oligonucleótidos utilizados y mejoran la probabilidad de éxito en su obtención.

## >Fusgen\_Consenso\_784pb

```
CCATCATCCATCTTCAACCTTTTGGCTATCTTTCCCATCTTAGCATAAAAACCCACATCCCACAGTACTATCTTTATTTTACTCCCTTGACATCTCT  
CGGGCAAACCTACATAGGGCACCATACCAACCCAGAGGATCCGTAGCTTCTAAGGATATCGGAACCTTGGCGTGGAGTCTACCTACATCTACCGGCT  
GCCGCTTTTCGAAACCGTTGCACAACCTACAGCTATAGCCGCTACAGCACGGTCAGGCTGGTCTACTACTCTAGGTGTTACACACCCGTCAGTCCAGTT  
CTGTGTCTTTGAAACCCCTGTTGACTACACTAGCTTGGTCGCCCTAAAGTTAGATCGAAACAGCTCGATTTTGGTCAACTCTGTTGCACATGCGCGCAC  
ACGATCACATCCCTCACTCTCAGCGCAATCCCTGGATATCATCCACAGCCAGCGTCTCGTCATCATCGTTTGGTGCACCCCAAAATAGTCAACCAACT  
GGTTAAATCGATGCTGTTTCAACCAACCGCAGACACAACATCCACGCTCTCGCATTGAGAGGGGAATCAGCAGGCACGCGATCGCAGCTTTCGTCTAC  
TTGTTGAACCTCCCTCAACAACTCACACGCCCCCTCCATTCTCCGTTCTCCATCTCCAAGGCTCGGGAGTCTGCCCTCTCTCCGTTCTCTCCCGCT  
CGAGGGACCTACCAGTACGGTACCTACGCTCTGGTAAATTTATCAGTACCTACCGTACCTCACGCAGCGACTTGGCCATCTCGGATAGCACTACTCGCAC  
CTCGTGGGTGATTTAACTCCTCGTTTGGCCCGTGAGAAAGTTGGTGGCCCTCATCGCCGTACACCACCATCGTCCCTCCGTTCCGGCAAGACA  
TCATCAGAGCATCTACCTACCTATTACCAACAGCTCTTTGAGGAAACAGACTCCAGTCTGCGAGTGCAGGTTCAAGGTTCAAAATGGAACCAAGCGG  
CATGCACATCCCTGAAGATGCGTGTGTCAGTACGAATATATGACCCCAATTGGTGAAGTCTTATCCACGTTCTTCTCCAACCGATCAGCCCCGTGG  
TCTAATGCCGCGCTGTCGTTGGTGGCCGCGCTTAAAGCTCCGTCGCGGCGGGTCCCGTGGCGCCCGCTTTTCCCGTCCGGGACAAGTTCCG  
TCCATATTTCACTTGCACCTTCTTTTACAATTCATGGAGCCGAGGGCATCCACATCCACGTCAAATATCAGTCCCAATTTAGCCCTACAGACGGCTTC  
CACTTTGGTCAATGACAGACAGTTGATCATAGTCTCATGTTCAACGGTTCGCAATCTTGGTGTCTGTCGTCGAAGGATCAATGCCACTATCAATTCAT  
TAGCACTCCTAGCTCGCTTACGCTCTGCTCACAAAGTGTGGGTATGATCTCGACTTCAACAAACCTATGTCGCTCTTGAAGCATGCCAATTTGGCTTAT  
TCCTTGGTGTATTCACAGGTTTATGTCTAAGGACCATTCATCCCTTGAATTCATGATTGGCAAGGCCACTCCTGGCCCTCGATGTTTCTAGCTCAG  
TGTGTCGTTGCTCTTATGTAAGACCCGATAAAGGTCACAAACGATGACATTTTATGTCATATGATAAGGATAGCAGGGCAGCTTCAGG  
GTTTATGATACTATACAGACGTCAGATATCATTTGGTCAATTTCTCTTCTGCTTTACATGACTTCGCTTTTACTCCCCACGCATAATCTCCATTC  
GTTGACATCTCAGAAAACACTACCCCAACAATATCGTTTGTGCTTCTCTTCCACCGAATGCTGACTGATGCTTAGGATACTTCAAAATCATCAAGA  
TGGGTTACTGTGGGAAACGTGACAAGAGTCAGTCAAACGTAATTGAGCCCTGCACCTCCAGTACCTTTTGGCCACCCCAAGACTCGCATACACCT  
GCGTCACGAGACACCCGTTGATCCACAGCCGTTGTCATCGATGGTGTCTTGAAGTTCAGATTGACCCTTCGTATAAGCACTTGGAGTACACCGGTCCT  
TGAACATAAGGCTAATAGTACGTTGGGTTATAGGCTACGCTTACCACGCGAGTGGCAAATTTTGGTTCCTTATCAAACTCTCCTTGTATAGA  
TATTGGAGACGTTTCCGACTCTCATGACCCGATCAACGTCGGTTCATGTTGCCACACTATACTATTGCTTTGATTCTAGCTGTTCAAGCCA  
TCCAGAGATCAACGGCAGACCGTCAATCGTTTCAACAAGTATATCATGGGAGAGACTTACATGAAAGAAAGCGGCTCGCCTGTATCCCAAGTCGCGTGT  
GAGGCCAAGAAACGGGATAAACATTTGATCTCGTCAACCGGTTTACGAGGCTGAAGAGGCTAACCTGAAGAATCCCGCTGAGGCTGCCATAAACTC  
GTCGTGACTCTAGAGCATGATGATTTGACGGATGAGAAGTTTGGCTGTTTACCAGAACTACCAGCGGTAGTTTCAAGGAGTCTCCGGATGAAATACC  
AAGACCGGATTCAGACGCTTCCCTTGTGACTCGCTTTGAGGAGAGAAACAATGGTGACACCCGATGGGCGTAAACGTCGCTGGGTTCTGATACCCAA  
TGTTACAGACTGGATGGCAAGCTAGTTGCCATTGGAGTGTGACCTTTCGCGGAGTGTGAAGCTCAGTATACTTTCTTTACCATGAAAGCATTCAC  
CAGCATTCGCCAGGGAAGCTTGGTGCACCTGTATGAGATTGCTCTATPCCATCGAAGAGGGCTATGGCTGGTGGTACCAGGCTATATATACACAACCTC  
CCCAAGATGTGTACAGATTGATTAATCGCTCAGTATGTTTACCCTGTGCTTTGACATGGGACCCGCTGGATCGAACTGTGTTGACCTCCTC  
GACAAAAGCCGTACGTGAGCCCTTTCGCTTGAAGAGGAGCAGGCTCTCGCGAGATCGAACAAGGTTTGGCTCGCCTACCGAGGATCCAAACAGAGT  
GACAAAAGGGGGGACAAAGGTTCCGACTCTGCAGCATCCGATGAAGATGACAGCAACTGGTGTGTTGCAACCGGGATGCCCGGATATACCTCCGATCT  
ACGGTCTGCTGAGTGGGATATGGATCATATCGCTTTGAAGATATCCCGAAAGCCCAATTATACGAAACCTCTGATCTCGTCACTGGGAGGAAAAGGGG  
CTCGAGGAATATCCAGGAATGAGAGCTGGTGTGCTGAGCTCATCGCGCAATTTGGCCCTGACTTGTGAGGACCGGATTTGCCTGGACTTTTCCCGGAGA  
CCCTAAACGGATATATCAGGACTGGGATGGTAATAAGTATCAAGATGATTTCTGCTCCATCTTGTGGCGAAATCTTAAGGATCGGTTCAAAGTCCGA  
CACATTTCACTGCTCAACATATTTATCATGTCTAATGAAAGAACGTCATATGTAGAGGATGTTATTTAAAGTCTGAAGAATGAATACATGTCTCGATG
```

Figura 20.- Secuencia en formato FASTA. Se muestra en verde la ubicación de la secuencia del oligonucleótido Fusgen Forward y en rosa la secuencia complementaria del oligonucleótido Fusgen Reverse.

Obtenido del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

```
ATGCCACCAACGGAAATAAAGTCAATGGCATCATGGTGGAAACATGGACACACCCGCTTTTCAAATAATCTCGCCTCTTCTCTGATGCCTTCGGAACCTTTGCTCTCAGAAAAGCCA  
CCAAAGAAAGACTACCCCTAGCTCGAGATATCAAGGAAAACGTACCTGTTTACAACCTTTCAACTTTTCAACTCTACCAGAAAACCAAAAGTCCGCTCTCAAAGACGAATGGTACAAA  
GTCCTTTGATGGCCCGGGTGTTTTGTACGGCTGGTCTTACACCAACTTGGATGGTCAACAAGTCAACAGCTGCCTTCAATGATATCATAAAAGGAGAGCCAGGGTACCAA  
AACAGCAGGCGATCACTTTGCAAGTGTGTAATAAACGATCGAATTTGAACTCGTTCGTAACACCGCTTCAAGACCCAGACTCCTTCTCAACTACTTTTGAATCCCTACCTCGA  
CCTCATCTCTCATGGCTTGTCCAGGGATCGCATCACTCAAGTCAACAACGTCGCGCTGGAGGGCAGCTCAAGTTTCCACCCGATATCACTGGGTTTCATGTCTGTCT  
GAGACTTGTGAAAGATCCAGAGCAATGCAAGTTGCAAGCAATGCTTACCACTGCAAGGTTGATAGCATATTTGACGATGTTGACGTAACCTCGAGAGCGGTTTACCGTT  
CAGTCAGGCAATTTGCACCTGGCTACATGGCGTATCGTCTGCTGAGTGTAAATGAGTTCTTTGGACAATTATCTCACTCCGTTAAAAAGGGCAGGCTTATGGTTCAATCTGCTC  
TTTTCCATGCAGCAGGCGAGAACAAGTCTGGAATCAATCGCTTGTCAACCTCGTCCAGATCAGCAGTGCATTTGTAACCGATGGAACAATGACGCTTTGGCACTTGTGGAG  
AGTACGTGGGACGCTCTGACTACTGCATACAGAGCGAGGCTCAGTGACGAATCCAGATGTTTATCGTCTATTGAGAAAGGCTACCTTTCCGACAAATCTGGACAACAACCC  
GCCTAGAAAACGAGAACATGGCCGAGATTCCGAGCAAGACATTTCAAGTTGCATTGATAACGGGAAGAGTAGAGAGGAAGTTTGGCTGATTTGAAGGCTCCGACAAAAGAGT  
CAGAGCTTAG
```

## >Fumonfus\_Consenso\_237pb

Figura 21.- Secuencia en formato FASTA. Se muestra en verde la ubicación de la secuencia del oligonucleótido Fumonfus Reverse y en rosa la secuencia complementaria.

Obtenido del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Para el diseño de estos oligonucleótidos se tomaron en cuenta los parámetros esenciales como que la longitud del oligonucleótido estuviera entre 17 y 28 pb, que la temperatura de fusión ( $T_m$ , estuviera entre los 55-80°C, que el tamaño de los amplicones generados estuvieran lo suficientemente separados para observar la diferencia en el gel, que el contenido de GC presentes fuera entre 50-60% (Pinzón *et al.*, 2007).

Es importante cuidar que la  $T_m$  no sea demasiado alta ya que puede llevar a un rendimiento muy bajo reduciendo la probabilidad de acoplamiento del primer y que el par de primers elegidos no debe tener  $T_m$  demasiado diferentes, ya que es muy probable obtener amplificaciones asimétricas. De igual manera una  $T_m$  demasiado baja puede llevar a eventos de inespecificidad de los primers utilizados, y lleguen a acoplarse en secuencias diferentes a la que se quieren amplificar (Pinzón *et al.*, 2007) (Cuadro 11).

## Cuadro 9.- Alineación de secuencias para el género *Fusarium*.

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 51 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides strain 7600 chromosome 7</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	6582	6582	100%	0.0	100.00%	3305356	<a href="#">CP114047.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides isolate ITEM 10027 chromosome 7</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	6436	6436	100%	0.0	99.27%	3398504	<a href="#">CP079910.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium oxysporum isolate 170 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium oxysporum</a>	4687	4687	99%	0.0	90.76%	3734784	<a href="#">CP052891.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum isolate ME23 chromosome 7</a>	<a href="#">Fusarium oxysporu...</a>	4682	4682	99%	0.0	90.72%	3457129	<a href="#">CP130303.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. cubense strain race 4 chromosome 8</a>	<a href="#">Fusarium oxysporu...</a>	4660	4660	99%	0.0	90.61%	3455209	<a href="#">CP115882.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium oxysporum Fo47 chromosome VIII</a>	<a href="#">Fusarium oxysporu...</a>	4650	4650	99%	0.0	90.55%	3716460	<a href="#">CP052045.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium oxysporum strain Fo5176 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium oxysporum</a>	4650	4650	99%	0.0	90.55%	3884330	<a href="#">CP128290.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium fujikuroi strain Augusto2 chromosome VII</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi</a>	4499	4499	99%	0.0	89.72%	3298124	<a href="#">CP023095.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium fujikuroi strain CSV1 chromosome VII</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi</a>	4499	4499	99%	0.0	89.72%	3298383	<a href="#">CP023083.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium fujikuroi IMI 58289 draft genome, chromosome FFEUJ_chr07</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi l...</a>	4499	4499	99%	0.0	89.72%	3307243	<a href="#">HF679029.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. koae isolate 44 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium oxysporu...</a>	3993	4753	99%	0.0	90.49%	3467990	<a href="#">CP052903.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	3805	5736	87%	0.0	100.00%	3102	<a href="#">XM_018900850.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	3142	5071	77%	0.0	100.00%	2743	<a href="#">XM_018900853.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2680	4562	69%	0.0	100.00%	2463	<a href="#">XM_018900847.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2680	4725	71%	0.0	100.00%	2554	<a href="#">XM_018900846.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2676	4297	65%	0.0	100.00%	2325	<a href="#">XM_018900854.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2676	5380	81%	0.0	100.00%	2908	<a href="#">XM_018900851.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2675	4273	64%	0.0	100.00%	2312	<a href="#">XM_018900855.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2675	5356	81%	0.0	100.00%	2895	<a href="#">XM_018900852.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2675	4534	68%	0.0	100.00%	2448	<a href="#">XM_018900849.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Fusarium verticillioides 7600 arginine-tRNA-protein transferase (FVEG_11554). mRNA</a>	<a href="#">Fusarium verticillioj...</a>	2675	4697	71%	0.0	100.00%	2539	<a href="#">XM_018900848.1</a>

**Cuadro 10.- Alineamiento de secuencias para la identificación de especies de *Fusarium* productoras de micotoxinas.**

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
select all 41 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium fujikuroi IMI 58289 related to protein involved in biosynthesis of mitomycin antibiotics/polypeptid...</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi...</a>	2228	2228	100%	0.0	100.00%	1206	<a href="#">XM_023588432.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium fujikuroi IMI 58289 draft genome, chromosome FFUJ chr09</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi...</a>	2228	2228	100%	0.0	100.00%	2984819	<a href="#">HF679031.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium fujikuroi strain Augusto2 chromosome IX</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi...</a>	2217	2217	100%	0.0	99.83%	2971268	<a href="#">CP023097.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium fujikuroi strain CSV1 chromosome IX</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi...</a>	2217	2217	100%	0.0	99.83%	2976125	<a href="#">CP023085.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium fujikuroi strain I1-3 chromosome IX</a>	<a href="#">Fusarium fujikuroi...</a>	2213	2213	100%	0.0	99.75%	3033512	<a href="#">CP023109.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium mangiferae uncharacterized protein (FMAN_12816), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium mangi...</a>	2073	2073	100%	0.0	97.66%	1206	<a href="#">XM_041623079.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium proliferatum ET1 uncharacterized protein (FPRO_13194), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium proflie...</a>	2034	2034	100%	0.0	97.10%	1206	<a href="#">XM_031222620.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium proliferatum strain NRRL62905 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium proflie...</a>	2034	2034	100%	0.0	97.10%	2981051	<a href="#">CP128308.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium odoratissimum NRRL 54006 uncharacterized protein (FOIG_04235), mRNA</a>	<a href="#">Fusarium odora...</a>	1740	1740	100%	0.0	92.70%	2367	<a href="#">XM_031202378.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. vasinefectum isolate ME23 chromosome 8</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1740	1740	100%	0.0	92.70%	3203796	<a href="#">CP130304.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. cubense strain race 4 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1740	1740	100%	0.0	92.70%	3290400	<a href="#">CP115883.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum isolate 170 chromosome 10</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1735	1735	100%	0.0	92.62%	3202866	<a href="#">CP052892.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. koae isolate 44 chromosome 10</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1729	1729	100%	0.0	92.54%	3091882	<a href="#">CP052904.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum Fo47 chromosome IX</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1724	1724	100%	0.0	92.45%	3277645	<a href="#">CP052046.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum strain Fo5176 chromosome 8</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1724	1724	100%	0.0	92.45%	3168980	<a href="#">CP128289.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287 uncharacterized protein (FOXG_11435), mRNA</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1712	1712	100%	0.0	92.29%	2367	<a href="#">XM_016391051.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 4287.23S rRNA (N6), methyltransferase (FOXG_20534), mRNA</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1712	1712	100%	0.0	92.29%	3103	<a href="#">XM_018400817.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium subglutinans uncharacterized protein (FSUBG_307Z), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium subgl...</a>	1690	1690	100%	0.0	91.96%	1206	<a href="#">XM_036687551.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium tjeetaba uncharacterized protein (FTJAE_7873), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium tjeeta...</a>	1635	1635	100%	0.0	91.13%	1206	<a href="#">XM_037354631.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium verticillioides 7600 hypothetical protein (FVEG_10385), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium vertic...</a>	1629	1629	100%	0.0	91.04%	1206	<a href="#">XM_016899528.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium verticillioides strain 7600 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium vertic...</a>	1629	1629	100%	0.0	91.04%	2800883	<a href="#">CP114049.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium musae uncharacterized protein (JM337_011660), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium musae...</a>	1624	1624	100%	0.0	90.96%	1206	<a href="#">XM_044829196.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium verticillioides isolate ITEM_10027 chromosome 9</a>	<a href="#">Fusarium vertic...</a>	1604	1604	100%	0.0	90.71%	2921499	<a href="#">CP079912.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium redolens uncharacterized protein (BKAS5QRAFT_112497), mRNA</a>	<a href="#">Fusarium redol...</a>	1496	1496	100%	0.0	89.05%	1660	<a href="#">XM_046184728.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum Fo47 uncharacterized protein (FOBCDRAFT_253000), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	1382	1382	79%	0.0	92.61%	1017	<a href="#">XM_059611019.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium pseudograminearum strain Fo22-2 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium pseud...</a>	571	571	91%	2e-157	76.15%	9006544	<a href="#">CP102998.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium pseudograminearum CS3096 uncharacterized protein (FPSE_10401), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium pseud...</a>	571	571	91%	2e-157	76.15%	1203	<a href="#">XM_009263518.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium culmorum genome assembly, chromosome 11</a>	<a href="#">Fusarium culmo...</a>	566	566	90%	7e-156	76.26%	9183391	<a href="#">LT598680.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium asiaticum strain KCTC 16664 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium asiati...</a>	566	566	91%	7e-156	76.13%	9004718	<a href="#">CP088258.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium pseudograminearum strain Class2-1C chromosome 1</a>	<a href="#">Fusarium pseud...</a>	560	560	91%	3e-154	75.97%	9153420	<a href="#">CP064753.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium culmorum strain Class2-1B chromosome 1</a>	<a href="#">Fusarium culmo...</a>	560	560	90%	3e-154	76.16%	9630554	<a href="#">CP064747.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium vorosii strain RN1 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium vorosi...</a>	555	555	91%	2e-152	75.95%	9182361	<a href="#">CP104286.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium meridionale strain JX16-4 contig 2</a>	<a href="#">Fusarium meridi...</a>	555	555	91%	2e-152	75.99%	9172131	<a href="#">CP126885.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium vorosii strain W15A1 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium vorosi...</a>	549	549	91%	7e-151	75.86%	9062861	<a href="#">CP104260.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium graminearum strain KSU23522 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium grami...</a>	544	544	91%	3e-149	75.77%	9010877	<a href="#">CP147678.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium graminearum strain FG-12 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium grami...</a>	542	542	83%	1e-148	76.53%	8894400	<a href="#">CP079829.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium graminearum strain KSU23473 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium grami...</a>	538	538	91%	2e-147	75.66%	9045406	<a href="#">CP147673.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium graminearum chromosome 2, complete genome</a>	<a href="#">Fusarium grami...</a>	538	538	91%	2e-147	75.66%	8997558	<a href="#">HG970333.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium graminearum strain PH-1 chromosome 2</a>	<a href="#">Fusarium grami...</a>	538	538	91%	2e-147	75.66%	8996191	<a href="#">CP067872.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium graminearum PH-1 uncharacterized protein (FGSG_0419Z), partial mRNA</a>	<a href="#">Fusarium grami...</a>	538	538	91%	2e-147	75.66%	1185	<a href="#">XM_011323130.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Fusarium oxysporum Fo47 uncharacterized protein (FOBCDRAFT_252999), mRNA</a>	<a href="#">Fusarium oxysp...</a>	213	213	11%	1e-49	94.24%	2656	<a href="#">XM_059611018.1</a>

**Cuadro 11.- Se muestran los parámetros utilizados para el diseño de primers.**

Especie Objetivo	Primers	Gen blanco	Secuencia (5'- 3')	Tm (°C)	Tamaño (bp)	GC%	Escala	Compleme- ntariedad	Extremos 3'
<i>Fusarium spp</i>	Fusgen F	FVEG_11554	5'- ACACCCGTCAGTCCAGTTTC -3'	59.89	20	55.00	200 nmol	2.00	0.00
<i>Fusarium spp</i>	Fusgen R	FVEG_11554	5'- ACGTGGGAATAAGCACTCA CC-3'	60.34	21	52.38	200nm ol	4.00	0.00
<i>Fusarium productor de micotoxinas</i>	Fumonfus F	FFUJ_09643	5'- CTCGTTTCTAGCGGGTTGT -3'	60.04	20	55.00	200nm ol	4.00	0.00
<i>Fusarium productor de micotoxinas</i>	Fumonfus R	FFUJ_09643	5'GCGGAGAACAAGTCTGT GGA-3'	59.97	20	55.00	200nm ol	3.00	0.00

**Cuadro 12.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Forward 5'-  
ACACCCGTCAGTCCAGTTTC-3'.**

SEQUENCE	5'- ACA CCC GTC AGT CCA GTT TC -3'
COMPLEMENT	5'- GAA ACT GGA CTG ACG GGT GT -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	55 %
MELT TEMP	57.2 °C
MOLECULAR WEIGHT	6012.9 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	184000 L/(mole·cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	5.43
µg/OD <sub>260</sub> :	32.68

Obtenido de OligoAnalyzer.

**Cuadro 13.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Reverse 5'-ACGTGGGAATAAGCACTCACC -3'.**

SEQUENCE	5'- ACG TGG GAA TAA GCA CTC ACC -3'
COMPLEMENT	5'- GGT GAG TGC TTA TTC CCA CGT -3'
LENGTH	21
GC CONTENT	52.4 %
MELT TEMP	57.2 °C
MOLECULAR WEIGHT	6424.2 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	208000 L/(mole·cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	4.81
µg/OD <sub>260</sub> :	30.89

Obtenido de OligoAnalyzer.

**Cuadro 14.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Forward 5'-CTCGTTTCTAGGCGGGTTGT-3'.**

SEQUENCE	5'- CTC GTT TCT AGG CGG GTT GT -3'
COMPLEMENT	5'- ACA ACC CGC CTA GAA ACG AG -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	55 %
MELT TEMP	57.2 °C
MOLECULAR WEIGHT	6146 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	180000 L/(mole·cm)
nmole/OD <sub>260</sub> :	5.56
µg/OD <sub>260</sub> :	34.14

Obtenido de OligoAnalyzer.

**Cuadro 15.- Parámetros obtenidos del análisis del primer Reverse 5'-GGCGAGAACAAGTCTGTGGA -3'.**

SEQUENCE	5'- GGC GAG AAC AAG TCT GTG GA -3'
COMPLEMENT	5'- TCC.ACA GAC TTG TTC TCG.CC -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	55 %
MELT TEMP	57.2 °C
MOLECULAR WEIGHT	6231.1 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	205200 L/(mole-cm)
nmole/OD <sub>260</sub>	4.87
µg/OD <sub>260</sub>	30.37

Obtenido de OligoAnalyzer.

### 9.6 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas

Mediante la técnica de PCR de punto final se realizó la identificación molecular de cepas presuntivas

de *Fusarium*. En las siguientes figuras se puede observar el corrimiento electroforético de las cepas caracterizadas F9, F10, F11, F12, F13, F14, F15, F25, F28, F37, F38, F39, F40, F41 y F42. Estas cepas de *Fusarium* se amplificaron utilizando el gen *FVEG\_11554*, por lo que queda demostrado que el gen *FVEG\_11554* es un marcador de amplificación adecuado del género *Fusarium* (Figura 22, 23, 24, 25 y 26). Se observaron amplificaciones en diferentes pb por lo que se puede inferir que es debido a que son diferentes especies de *Fusarium*.

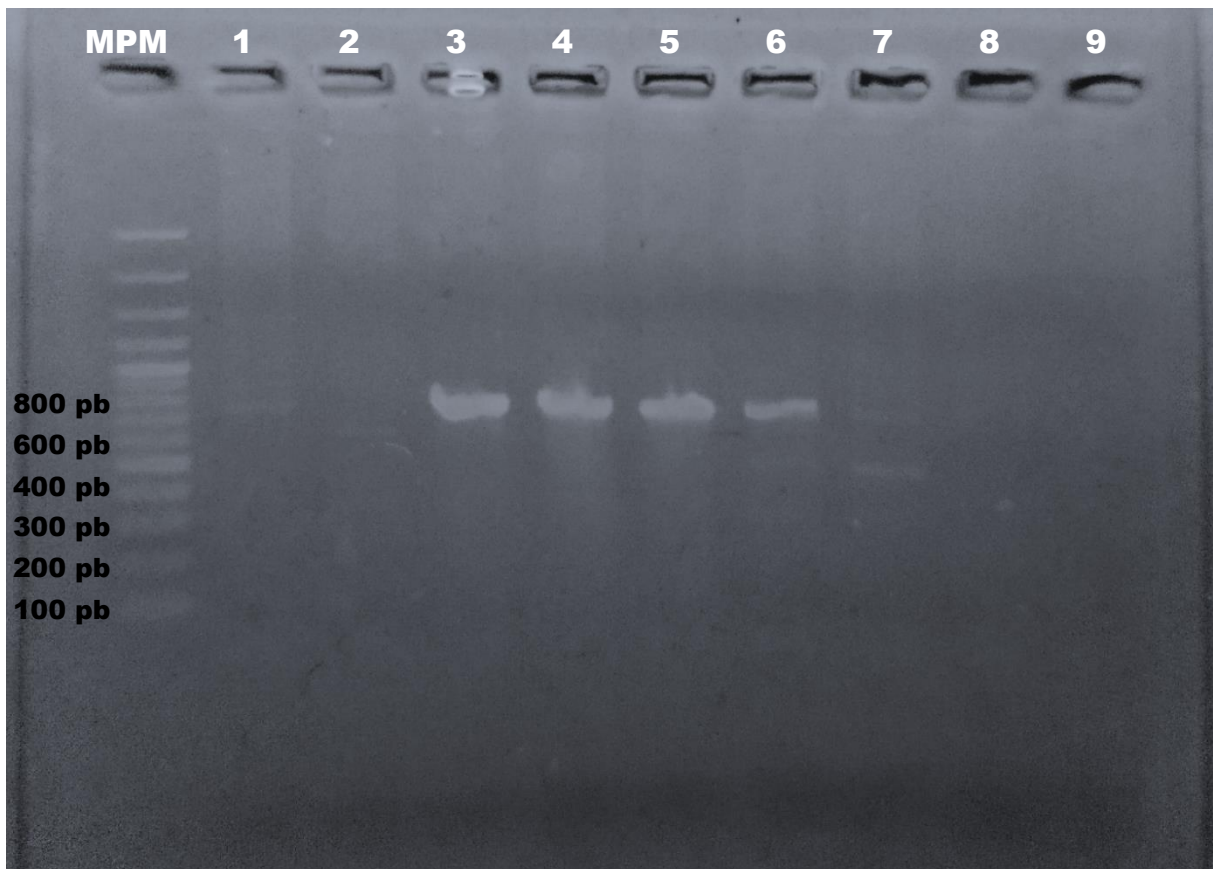


Figura 22.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen *FVEG\_11554* de cepas del género *Fusarium*. Tamaño del amplicon 784pb. MPM 100 pb plus DNA Ladder. Línea 1: Control positivo (*Fusarium solani*), línea 2: Cepa tipo (*Fusarium oxysporum*, línea 3: Cepa F38, línea 4: Cepa F39, línea 5: Cepa F40, línea 6: Cepa F41, línea 7: Cepa F42, línea 8: Cepa T36, línea 9: Control negativo.

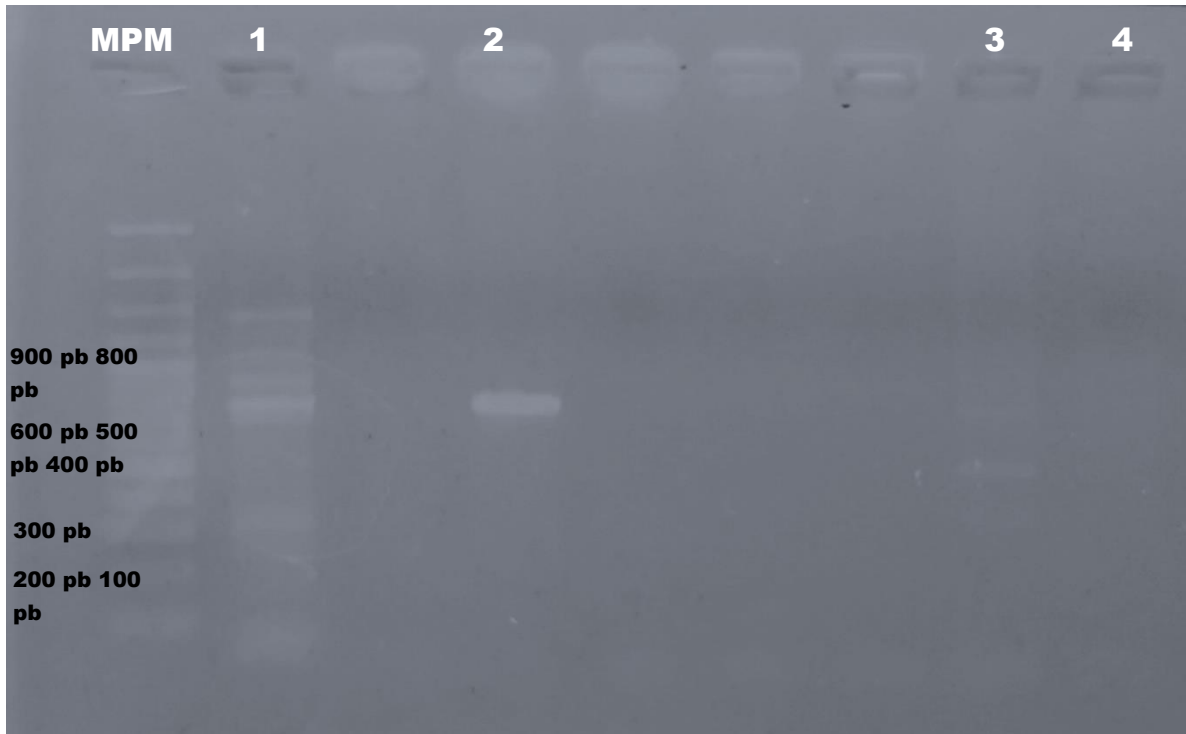


Figura 23.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG\_11554 de cepas del género *Fusarium*. Tamaño del amplicon 784pb. MPM 100 pb plus DNA Ladder. Línea 1: Control positivo (Cepa tipo *F. solani*), línea 2: Cepa F37, línea 3: Cepa F42, línea 4: Control negativo.

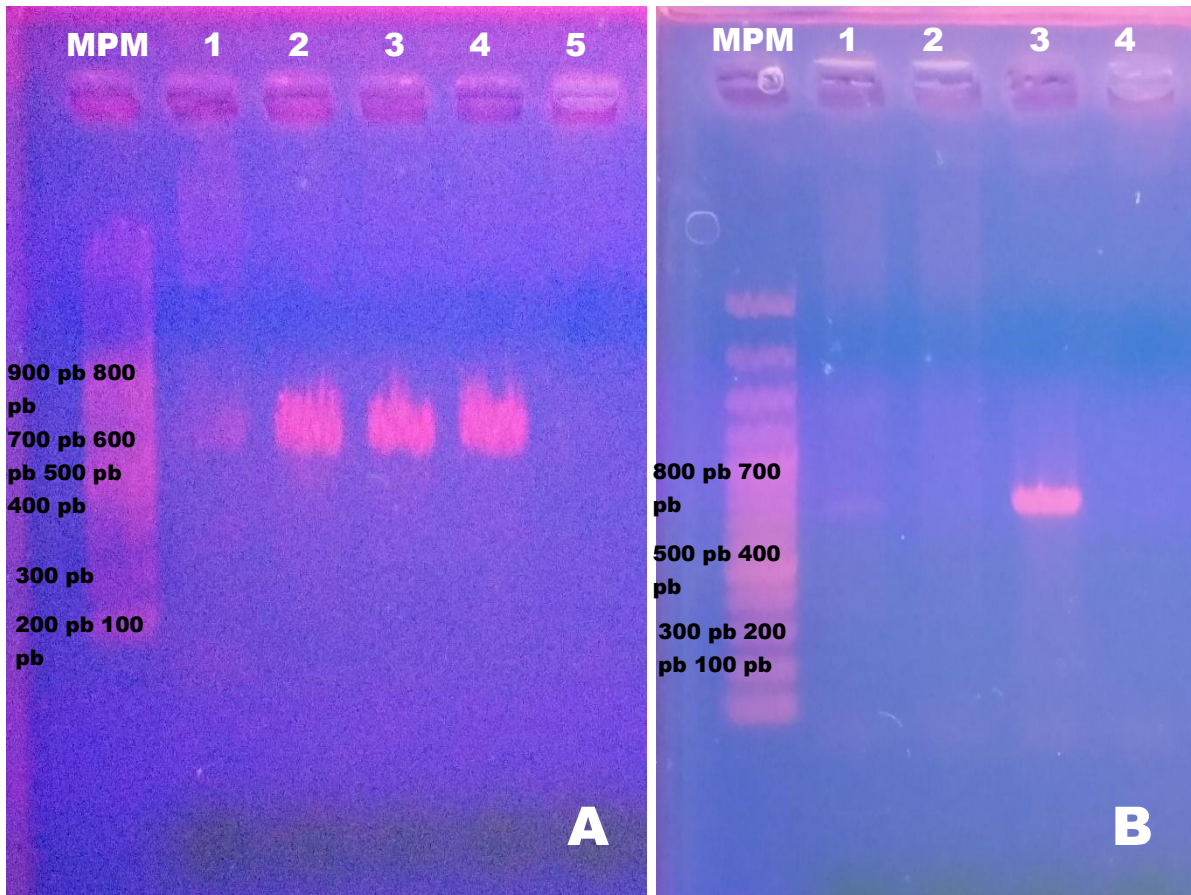


Figura 24.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM 100 pb plus DNA Ladder. A) Muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG\_11554 de cepas del género *Fusarium*. Tamaño del amplicon 784pb. Línea 1: Control positivo (Cepa tipo *F. solani*), línea 2: Cepa F16, línea 3: Cepa F17, línea 4: Cepa F18, línea 5: Control negativo. B) Muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG\_11554 de cepas del género *Fusarium*. Línea 1.- Control positivo (Cepa tipo *F. solani*), línea 2.- Cepa F10, línea 3.- Control negativo.

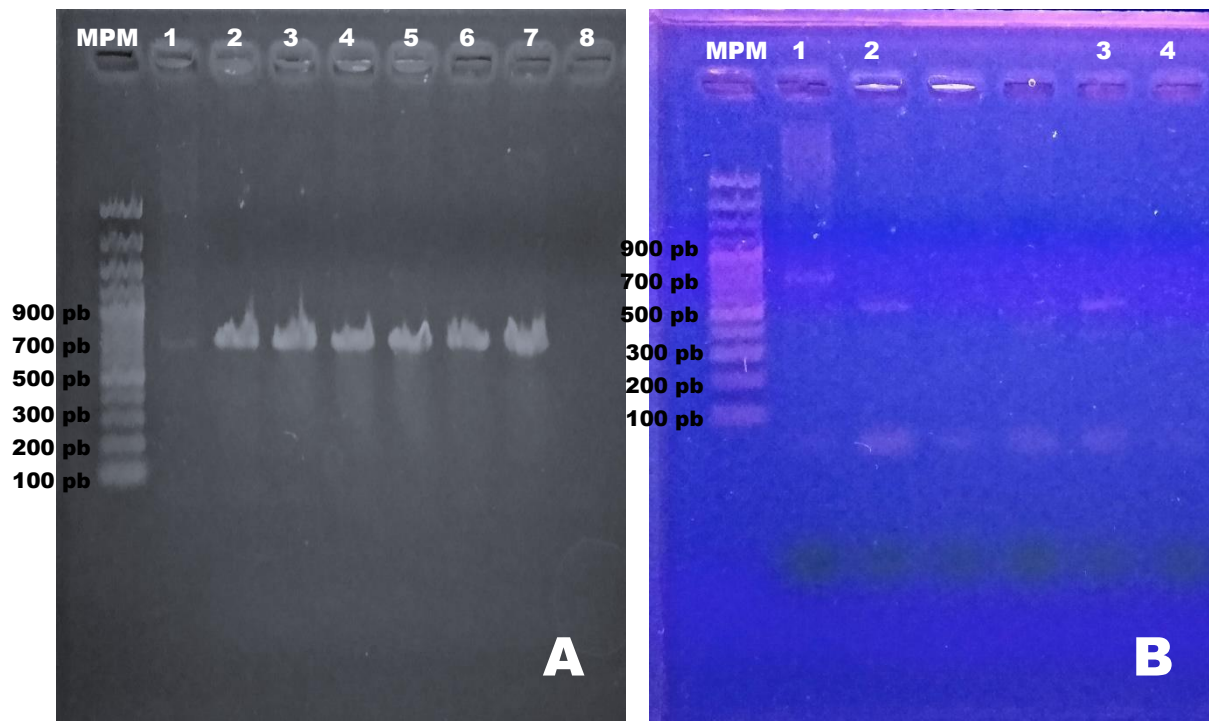


Figura 25.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FVEG\_11554 de cepas del género *Fusarium*. Tamaño del amplicon 784pb. MPM 100 pb plus DNA Ladder. A) línea 1: Control positivo (*F. solani*), línea 2: Cepa F9, línea 3: Cepa F11, línea 4: Cepa F12, línea 5: Cepa F13, línea 6: Cepa F14, línea 7: Cepa F15, línea 8: Control negativo. B) línea 1.- Control positivo (*F. solani*), línea 2.- Cepa F25, línea 3.- Cepa F28, línea 4.- Control negativo.

En un estudio realizado por, (Deepa y Screenivasa, 2019) reportan que, el PCR del gen ITS-4 es una herramienta económica con la cual se pueden diferenciar especies de *Fusarium* de una manera confiable y rápida. Además, se evidencia que se realizó de manera correcta el diseño de los oligonucleótidos *in silico*.

Es de suma importancia realizar una correcta identificación de cepas de *Fusarium*, a través de un enfoque polifásico, debido a la aparición de especies crípticas. De esta manera estos estudios nos permiten tener certeza de las especies implicadas.

Mediante la amplificación del Gen FFUJ\_09643 se identificaron cepas de *Fusarium* productoras de micotoxinas (Figura 23).

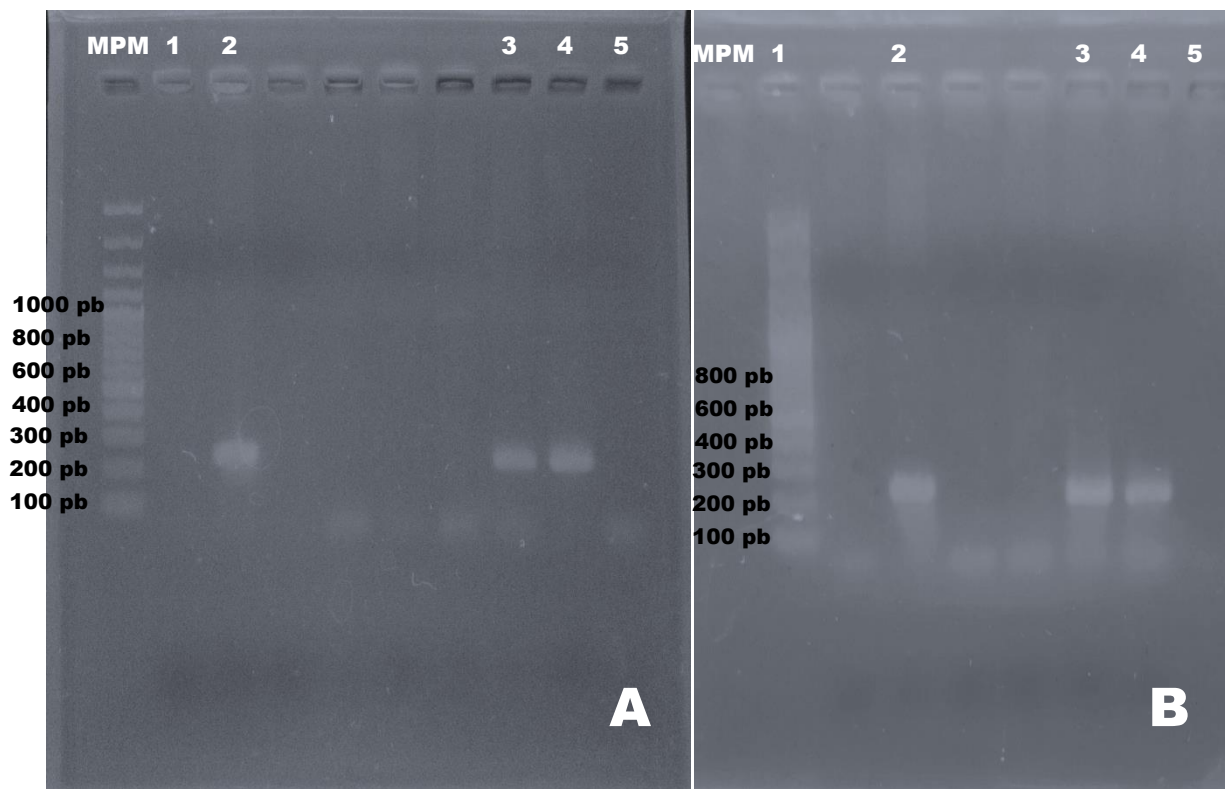


Figura 26.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. MPM 100 pb plus DNA Ladder.

Muestra el resultado de la PCR de punto final para la amplificación de la secuencia parcial del gen FFUJ\_09643 para la identificación de especies de *Fusarium* productoras de micotoxinas (fumonisinas). Tamaño del amplicon 237 pb. A) línea 1: Control positivo (*Fusarium oxysporum*), línea 2: Cepa F41, línea 3: Cepa F42, línea 4: Control negativo. B) línea 1.- Control positivo (*F. oxysporum*), línea 2.- Cepa F25, línea 3.- Cepa F.28.

La mayoría de las especies de *Fusarium* fueron aisladas de los granos de maíz de San Miguel Canoa, sin embargo, se evidencio la presencia de cepas productoras de micotoxinas en ambos sitios de estudio (Cuadro 16).

**Cuadro 16.- Cepas identificadas como *Fusarium* spp.**

Muestra	Origen de las cepas de <i>Fusarium</i>	Productoras de <u>Fumonisina</u>
25	Suelo Canoa 2 m7	✓
28	Suelo Canoa1 f37	✓
41	Maíz Tonantzintla1 F30	✓
42	Maíz Tonantzintla 1 F6	✓

El haber confirmado la presencia de especies de *Fusarium* productoras de micotoxinas en muestras de maíz y suelo agrícola destinado al cultivo de este, evidencia el riesgo latente de la contaminación de los alimentos. Asimismo, las malas prácticas agrícolas y el incorrecto almacenamiento de los granos conllevan a la proliferación y aumento de las micotoxinas en los granos de maíz.

La presencia de *Fusarium* en los suelos agrícolas y granos de maíz en los sitios de estudio puede implicar la producción y distribución de micotoxinas, que pone en riesgo la salud de los individuos de las zonas de estudio por su alto consumo y producción de maíz.

## **9.7 Evaluación de la capacidad antagónica**

### **9.7.1 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial**

Las cepas de *Trichoderma* evaluadas mediante la técnica de cultivo dual ejercieron antagonismo hacia *F. solani* y *F. oxysporum*, ya que inhibieron significativamente el crecimiento radial de las colonias micotoxigénicas. La mayoría de los tratamientos lograron superar el 50% de inhibición del crecimiento radial del patógeno, a diferencia de la cepa M19R que presentó un porcentaje de inhibición menor al 10% (Figura 27 y 28). La cepa con mayor porcentaje de inhibición contra *F. solani* fue la caracterizada como SMC1 47.1,

mientras que la cepa SMC1 M19 presentó mayor inhibición contra *F. oxysporum*, ambas cepas fueron presuntamente identificadas como *T. harzianum* aisladas del suelo agrícola de San Miguel Canoa (Cuadro 17).

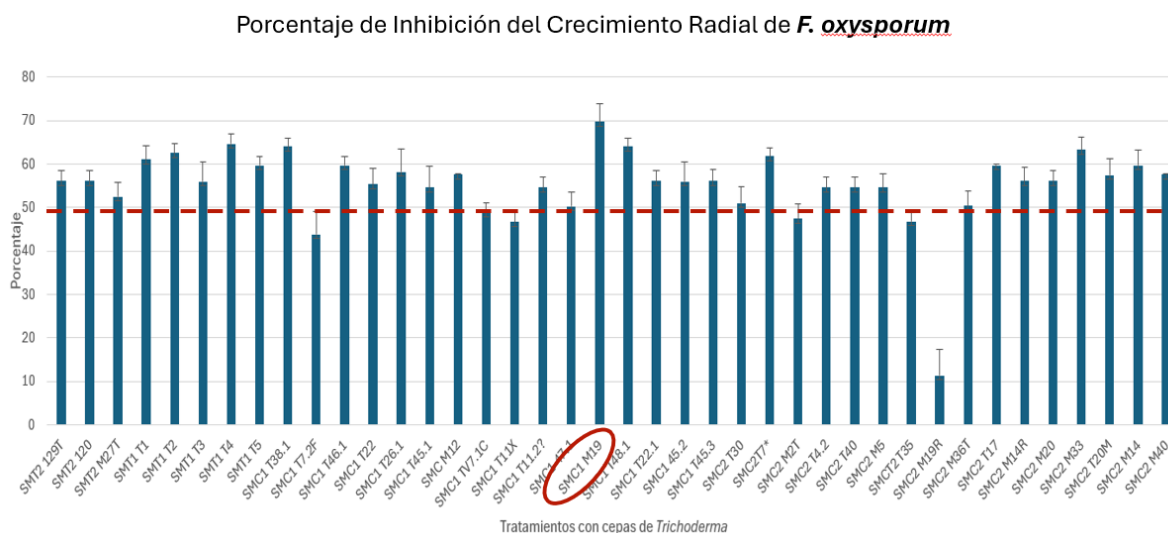


Figura 27.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial ejercido por las cepas de *Trichoderma* spp. de ambas zonas de estudio (Donde SMC corresponde a San Miguel Canoa y SMT a Santa María Tonantzintla) contra *F. oxysporum*.

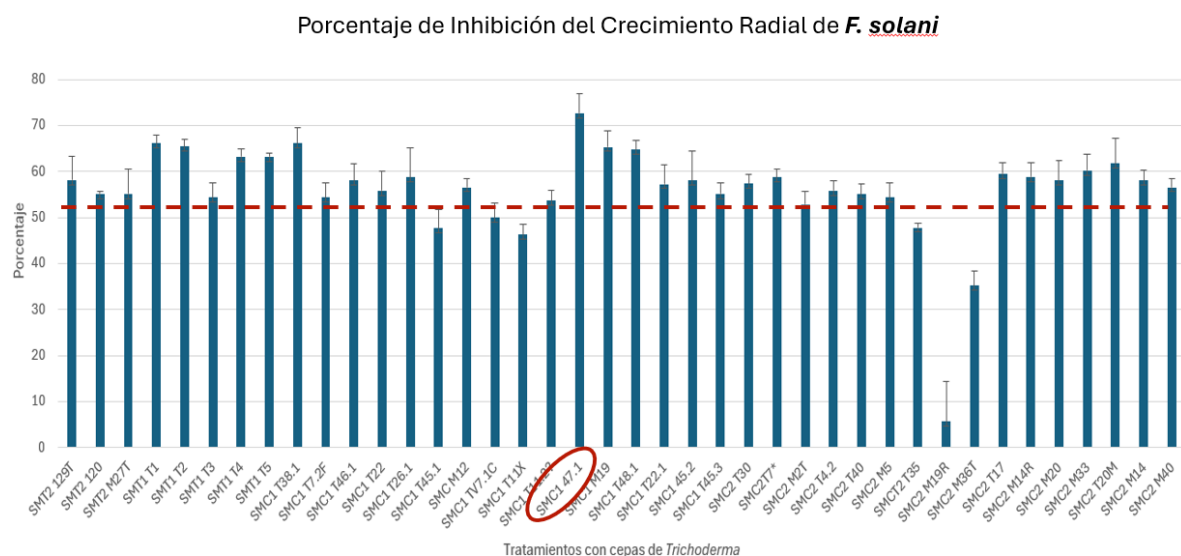


Figura 28.- Porcentaje de inhibición del crecimiento radial ejercido por las cepas de *Trichoderma* spp. de ambas zonas de estudio (Donde SMC corresponde a San Miguel Canoa y SMT a Santa María Tonantzintla) contra *F. solani*,

**Cuadro 17. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial que ejercieron las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos agrícolas de los sitios de estudio.**

Zona	Época	Tratamientos	<i>F.oxysporum</i> PICR	<i>F. solani</i> PICR
Tonantzintla	Seca	SMT2 129T	56 ± 2.3	58 ± 5.1
Tonantzintla	Seca	SMT2 120	56 ± 2.3	55 ± 0.5
Tonantzintla	Seca	SMT2 M27T	52 ± 3.2	55 ± 5.4
Tonantzintla	Húmeda	SMT1 T1	61 ± 3	66 ± 1.8
Tonantzintla	Húmeda	SMT1 T2	62 ± 2.2	65 ± 1.5
Tonantzintla	Húmeda	SMT1 T3	56 ± 4.4	54 ± 3.1
Tonantzintla	Húmeda	SMT1 T4	64 ± 2.1	63 ± 1.6
Tonantzintla	Húmeda	SMT1 T5	60 ± 1.9	63 ± 0.8
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T38.1	64 ± 1.8	66 ± 3.4
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T7.2F	43 ± 5.2	54 ± 3.1
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T46.1	59 ± 1.9	58 ± 3.5
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T22	55 ± 3.6	55 ± 4.3
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T26.1	58 ± 5.2	58 ± 6.5
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T45.1	54 ± 4.9	47 ± 4
San Miguel Canoa	Seca	SMC M12	57 ± 0.19	56 ± 1.7
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 TV7.1C	52 ± 4.4	49 ± 3.2
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T11X	46 ± 2.2	46 ± 2.3
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T11.2?	54 ± 2.4	53 ± 2.2
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 47.1	50 ± 3.3	72 ± 4.2
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 M19	69 ± 4.1	65 ± 3.5
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T48.1	64 ± 1.8	64 ± 2.1
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T22.1	56 ± 2.3	57 ± 4.2
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 45.2	56 ± 4.4	58 ± 6.4
San Miguel Canoa	Seca	SMC1 T45.3	56 ± 2.5	55 ± 2.3
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 T30	51 ± 3.7	57 ± 2
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2T7*	61 ± 1.9	58 ± 1.7
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M2T	47 ± 3.3	52 ± 2.6
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 T4.2	54 ± 2.4	55 ± 2.2
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 T40	54 ± 2.4	55 ± 2.1
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M5	54 ± 3.2	54 ± 3.1
San Miguel Canoa	Húmeda	SMCT2 T35	46 ± 2.1	47 ± 1
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M19R	11 ± 6	5 ± 8.6
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M36T	50 ± 3.3	35 ± 3
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 T17	59 ± 0.2	59 ± 2.4
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M14R	56 ± 3.2	58 ± 2.9
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M20	56 ± 2.3	58 ± 4.2
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M33	63 ± 3	60 ± 3.5
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 T20M	57 ± 3.6	61 ± 5.4
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M14	59 ± 3.5	58 ± 2.1
San Miguel Canoa	Húmeda	SMC2 M40	57 ± 0.19	56 ± 1.7

A partir de los resultados anteriores se realizó un ANOVA usando el software R-comander (versión R-4.3.1). Como se puede observar para el tratamiento contra *F. oxysporum* el valor de p es menor que el nivel de significancia de 0,05 (0.0279) por lo que existe una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos de las diferentes zonas. Sin embargo, para los tratamientos de *F. solani* el valor de p es de 0.124, por lo que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos de ambas zonas.

```
>
> # ANOVA para FO
> anova_FO <- aov(Crecimiento ~ Zona, data = datos_FO)
> summary(anova_FO)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Zona    1   1.59   1.5870   4.952 0.0279 *
Residuals 121 38.78   0.3205
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

>
> # ANOVA para FS
> anova_FS <- aov(Crecimiento ~ Zona, data = datos_FS)
> summary(anova_FS)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Zona    1   0.90   0.9017   2.402 0.124
Residuals 121 45.42   0.3754

>
```

Figura 29.- Análisis de varianza entre los PICR de las diferentes zonas usando el software R-4.3.1.

En un estudio realizado por (Galletti *et al.*, 2020), determinaron el antagonismo de *Trichoderma* contra *Fusarium* mediante la técnica de cultivo dual. Obteniendo como resultado que, las cepas de *Trichoderma* ejercieron antagonismo contra *Fusarium*, ya que inhibieron significativamente el crecimiento radial de las colonias patógenas. Sus valores de inhibición oscilaron entre 20 y 70%, y la especie con mayor porcentaje de inhibición correspondió a *T. harzianum*.

Estos resultados coinciden con lo reportado en el presente trabajo de investigación. Ya que la actividad antagónica de la mayoría de las cepas de *Trichoderma* oscilaron entre 30 y 60%. De igual manera la cepa con mayor porcentaje de inhibición fue identificada como *T. harzianum*.

Debido a la importancia de las especies de *Fusarium*, a nivel económico, ambiental y de salud pública, es que existen extensos estudios encaminados a inhibir el crecimiento de hongos patógenos e indirectamente disminuir la producción de micotoxinas. Esto a través de métodos amigables con el medio ambiente como lo es el aprovechamiento de microorganismos que son enemigos naturales.

De igual manera, (Galletti *et al.*, 2020), no solo reportaron la capacidad de las especies de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *Fusarium*, sino también su capacidad como promotor de crecimiento vegetal y como inductor de mecanismo de resistencia sistémica mediante la activación de genes, asimismo su capacidad para degradar o reducir la producción de micotoxinas, sin embargo, se necesitan más estudios para comprender este último mecanismo.

### **9.7.2 Grado de micoparasitismo**

En la confrontación dual, los resultados de crecimiento por parte de *Trichoderma* fueron mayor en comparación con *Fusarium*. De acuerdo con la escala descrita por Ezziyyani *et al.*, (2004), se observan en las figuras 30 y 31 los tratamientos que presentaron un grado de micoparasitismo 4, es decir, que *Trichoderma* invadió completamente la superficie del patógeno, se logra observar el característico micelio verde de *Trichoderma* sobre *Fusarium*. En las primeras 72 horas las cepas de *Trichoderma* mostraron un crecimiento acelerado que

propicia el encuentro con el patógeno en menor tiempo y es un indicativo que el antagonista creció o cubrió más superficie en cultivo *in vitro*.

Las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos y enzimas (p-1,3- glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) degradadores de la pared celular que juegan un importante papel en el micoparasitismo (Ríos, 2014).

La evaluación del grado de micoparasitismo de *Trichoderma* contra *F. oxysporum* y *F. solani* evidenció un mayor crecimiento por parte del antagonista en comparación con el patógeno, denotando hiperparasitismo, resultado similar obtuvo Andrade-Hoyos *et al.*, (2019) en el que observaron que *Trichoderma* spp., es un antagonista eficaz para el control de *Fusarium*, inhibiendo este patógeno hasta 48%.

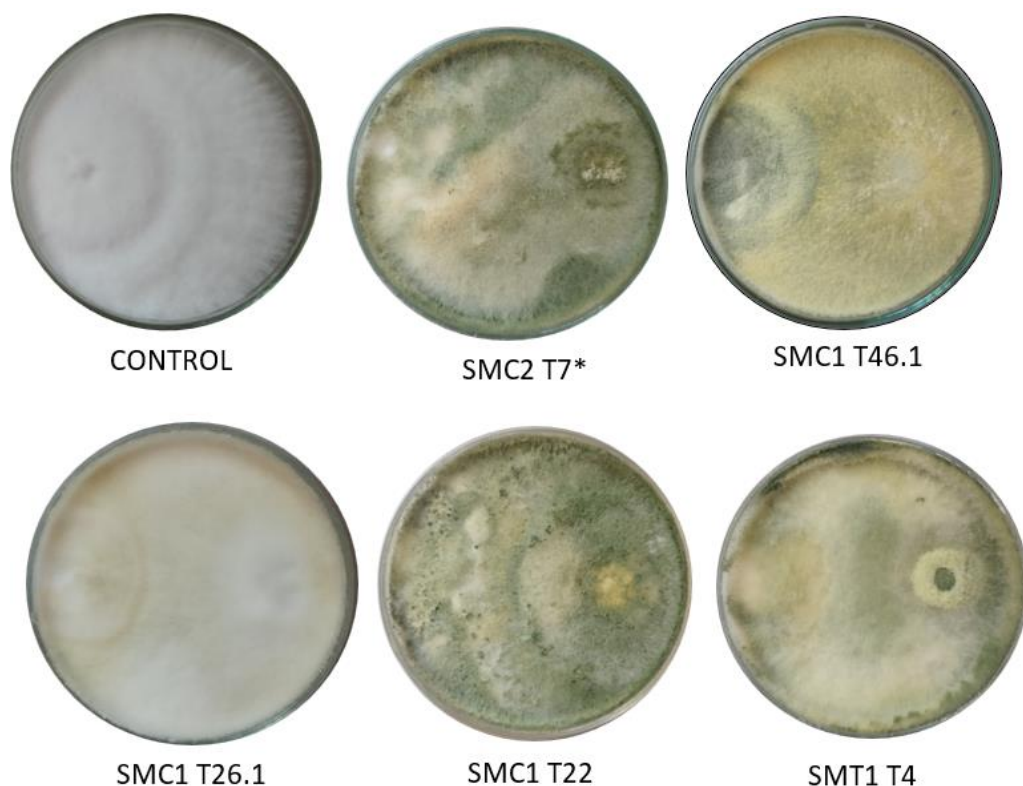


Figura 30.- Grado de micoparasitismo que ejercieron las cepas de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum*. En el control se observa el crecimiento del micelio blanco que corresponde a *Fusarium*, en los siguientes cinco cultivos *in vitro* se observan las confrontaciones duales, en cada uno de ellos el disco a la derecha corresponde

a *Trichoderma* y a la izquierda a *Fusarium*. Se observa como el micelio verde de *Trichoderma* logra invadir completamente a *Fusarium*, logrando así la inhibición de su crecimiento.

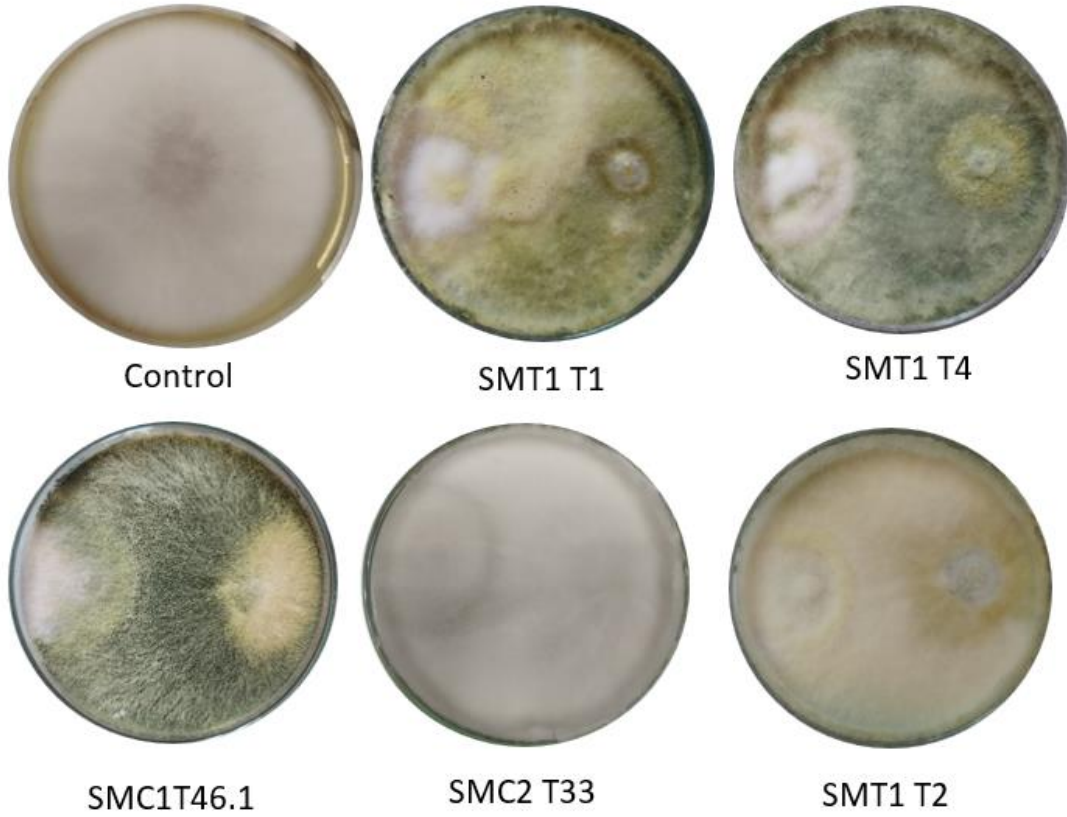


Figura 31.- Grado de micoparasitismo que ejercieron las cepas de *Trichoderma* sobre *F. solani*, durante enfrentamiento de cultivos duales.

### 9.7.3 Cinética del crecimiento de *Fusarium*

En la figura 32 y 33 se pueden observar las curvas de crecimiento de *F. oxysporum* y *F. solani* al confrontarse con *Trichoderma* en los cultivos duales. El crecimiento de *Fusarium* disminuyó al tercer y cuarto día debido al contacto con *Trichoderma*.

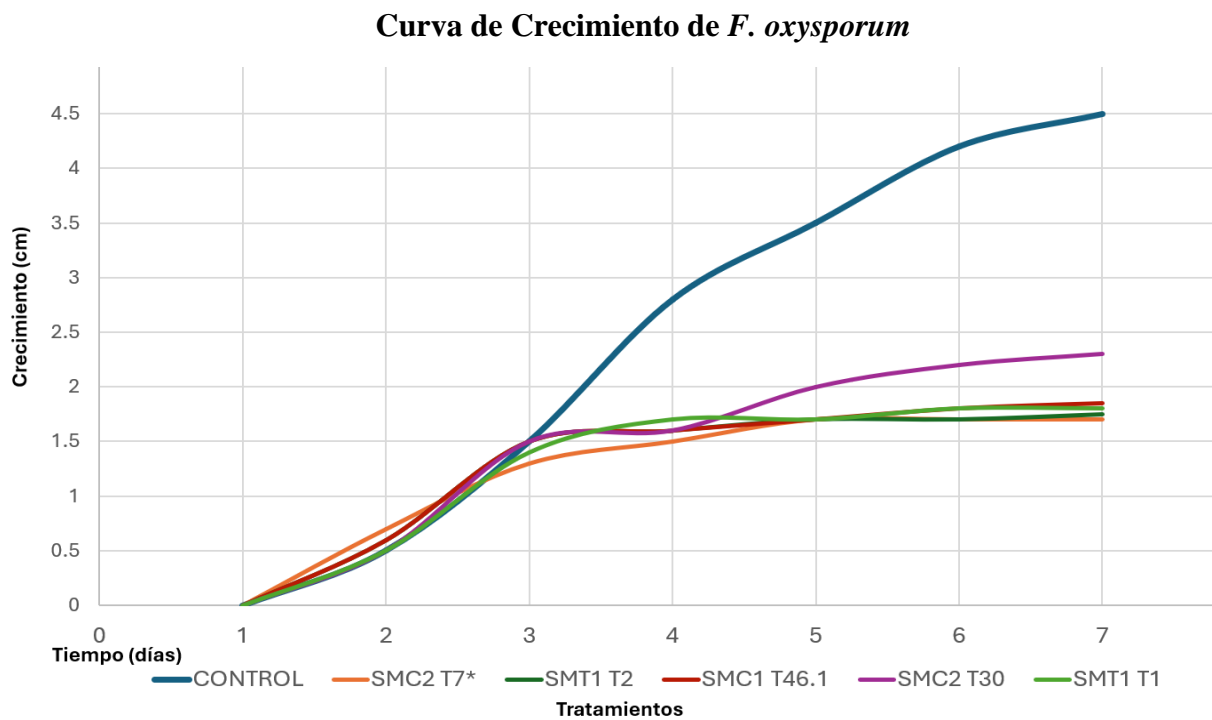


Figura 32.- Curva de crecimiento de *F. oxysporum* al enfrentarse a *Trichoderma*.

### Curva de Crecimiento de *F. solani*

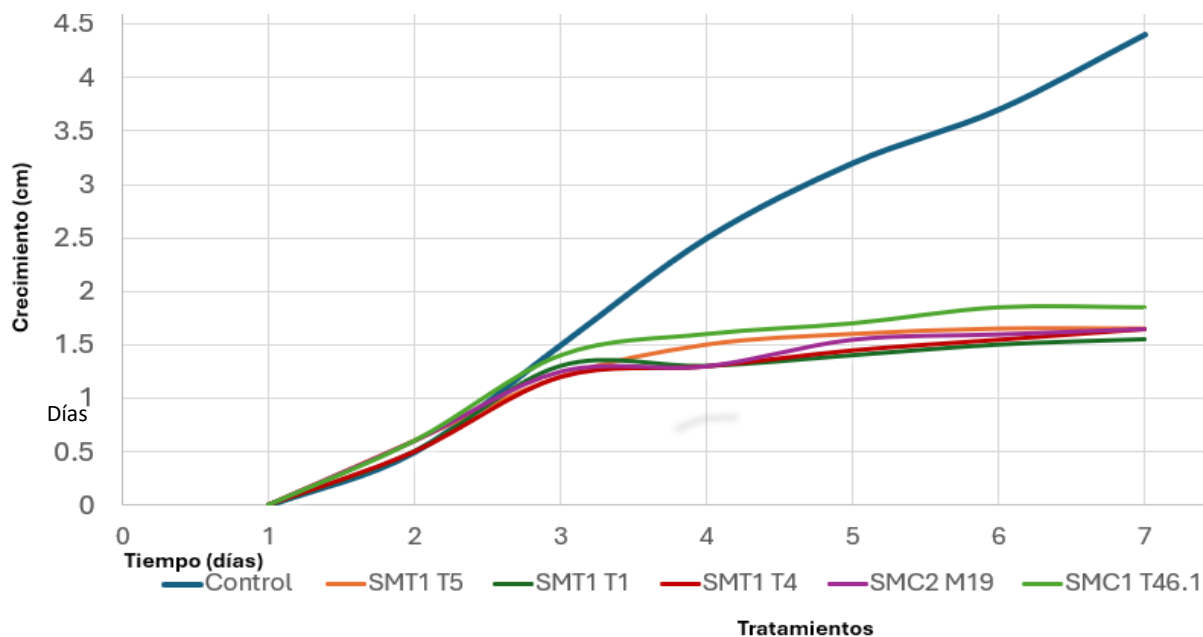


Figura 33.- Curva de crecimiento de *F. solani* al enfrentarse a *Trichoderma*.

Según Martínez-Martínez *et al.*, (2021) una característica principal en la elección de cepas de *Trichoderma* para emplearse en el control biológico es la agresividad para micoparasitar y la velocidad de crecimiento, esta debe superar a la del patógeno a controlar. La invasión del micelio que ejerció *Trichoderma* confirmó su efecto hiperparásitico que redujo el desarrollo de los patógenos como *Fusarium* micotoxigénico.

De acuerdo con los resultados de esta investigación las cepas de *Trichoderma* presentaron potencial para emplearse en el control de *Fusarium* patógeno del cultivo de maíz y de manera indirecta disminuir o eliminar la producción de aflatoxinas. Aunque, cabe mencionar que no todas las cepas de *Fusarium* producen micotoxinas, estas pueden persistir en el ambiente o alimento contaminado.

## **9.8 Percepción de la micotoxiosis en la población de las zonas de estudio.**

Se aplicaron entrevistas semiestructuradas de salud ambiental para reunir información sobre la percepción de micotoxiosis en la población de las zonas de estudio.

### **9.8.1 Características de los Agricultores**

La edad de los agricultores entrevistados fluctuó entre los 33 y 70 años, esto refleja que la mayoría de los agricultores son adultos mayores. Cabe mencionar que el 25% de los entrevistados fueron mujeres, lo cual muestra que en el Valle de Puebla la mujer está pasando a formar parte importante como responsable de las actividades agrícolas.

### **9.8.2 Producción de maíz**

La producción de maíz bajo condiciones de temporal tiene una gran dependencia no solo de las condiciones ambientales como el clima, suelo, flora y fauna, si no, también de condiciones económicas, políticas, culturales y sociales, que influyen en cierta medida en los rendimientos y calidad de los cultivos.

De acuerdo con Osorio-García *et al*, 2015, en los hogares rurales de la zona del valle de Puebla la producción de maíz es una de las principales actividades agrícolas, que permiten generar alimento e ingreso a las familias, muestra de ello (Fig. 34) la totalidad de los entrevistados en San Miguel Canoa declararon tener como actividad agrícola principal la producción de maíz, y también realizan otras actividades, lo que ha sido conocido como pluriactividad, que permite que las familias campesinas puedan seguir cultivando maíz. El 60% de la población entrevistada de Tonantzintla declaró que el maíz no es su principal actividad agrícola, sin embargo, se dedican a cultivarlo y a utilizarlo de autoconsumo. Los entrevistados mencionaron sembrar frijol, alfalfa, haba, calabaza, además de otras actividades agropecuarias, entre las que destacan la ganadería de traspatio, la cosecha, la venta de granos y frutas, incluso venta de tortillas. Cabe mencionar que la siembra de

variedades criollas predominó ampliamente sobre la de semillas mejoradas. El bajo uso de semillas híbridas en el Valle de Puebla coincide con las tendencias a nivel nacional, donde el empleo de semillas mejoradas es bajo, con apenas 6 % (Osorio-García *et al*, 2015).

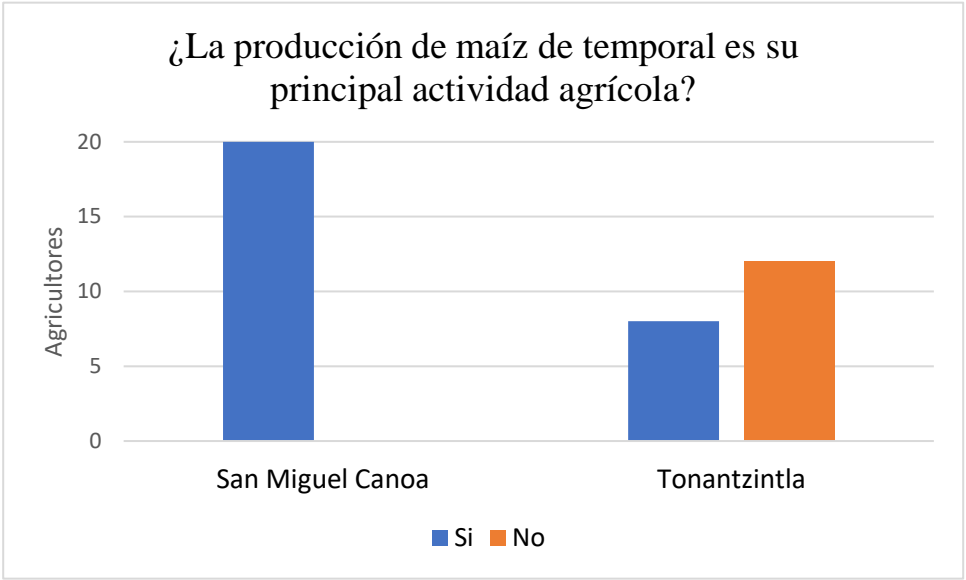


Figura 34.- Porcentaje de agricultores que su principal actividad agrícola es el maíz.

Con relación a los tipos de maíz criollo sembrados, sobresalió el maíz blanco (figura 35). Los agricultores del Valle de Puebla emplean en sus siembras mayormente el maíz blanco seguido del maíz azul y en menor proporción otros colores, lo que puede atribuirse al mejor precio en el mercado del maíz blanco, así como a los usos tradicionales (Osorio-García *et al*, 205). También quedó evidenciado que cuando se presentan condiciones desfavorables como heladas atípicas o retraso de las lluvias que los afectan severamente, los productores emplean sus semillas nativas de colores como amarillo, morado y azul, debido a que presentan mayor resistencia a las variaciones climáticas, y no les representan mayores gastos puesto que los obtienen por intercambio o de su cosecha anterior.

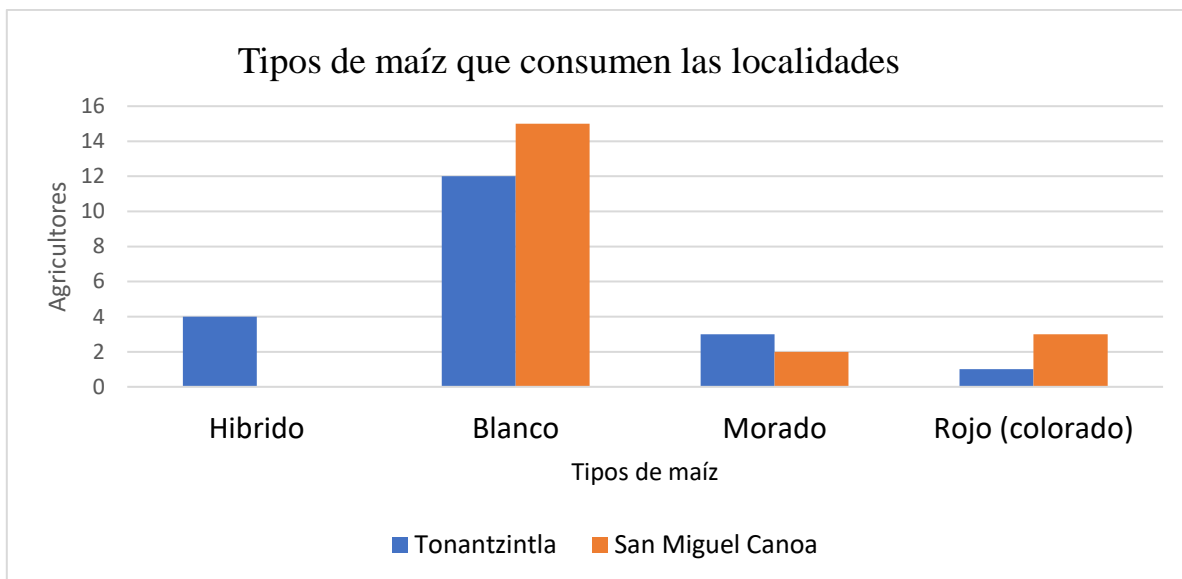


Figura 35.- Tipo de maíz utilizado por los agricultores.

### 9.8.3 Destino de la Producción de Maíz

Los resultados muestran que el 100% de los agricultores utilizan el maíz para la alimentación de la familia, que un 40% lo emplea también para la alimentación de sus animales y un 30% vende parte de la producción (Figura 36), lo cual coincide con lo reportado de Osorio-García *et al*, 2015, quienes encontraron que además del autoconsumo, un 37.8 % lo empleó también para la alimentación de sus animales y que el 26.1 % lo utilizó para venderlo, y mencionan que de esta forma la unidad doméstica campesina se articula de manera consistente la agricultura con la ganadería.

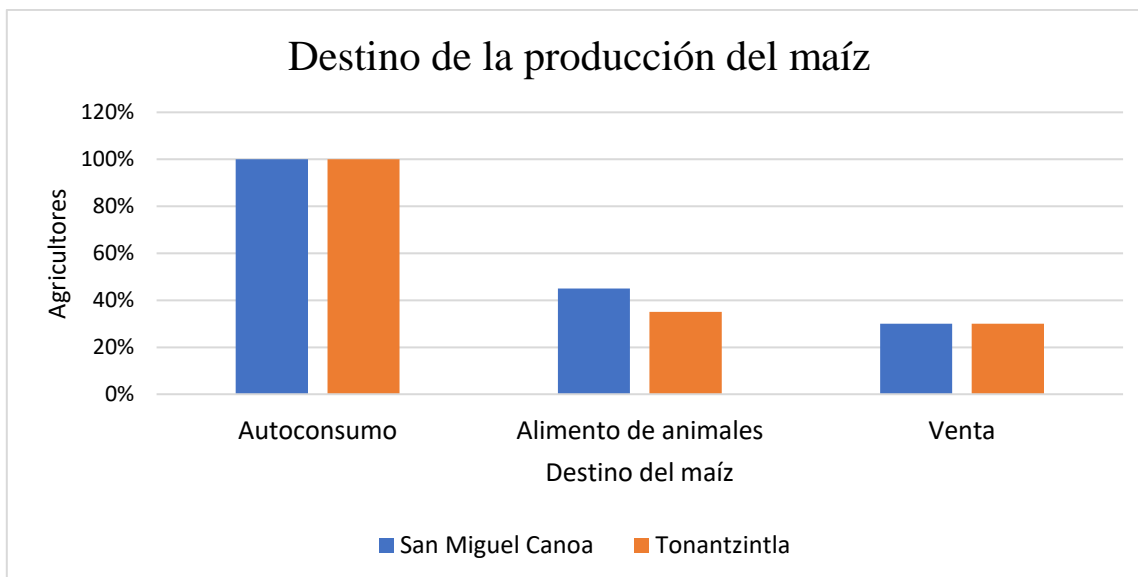


Figura 36.- Destino de la producción de maíz de dos zonas del valle de Puebla.

#### 9.8.4 Percepción de la micotoxicosis por las localidades

De acuerdo con la información obtenida, la totalidad de los entrevistados en San Miguel Canoa declararon que el manejo y consumo del maíz les puede ocasionar alguna enfermedad (Figura 37), algunas de las causas que mencionaron fueron debido a los agroquímicos, al deterioro del suelo, y un 30% mencionó la presencia de hongos/mohos. Cabe mencionar que en su totalidad los entrevistados desconocen la existencia o presencia de micotoxinas en los cultivos de maíz.

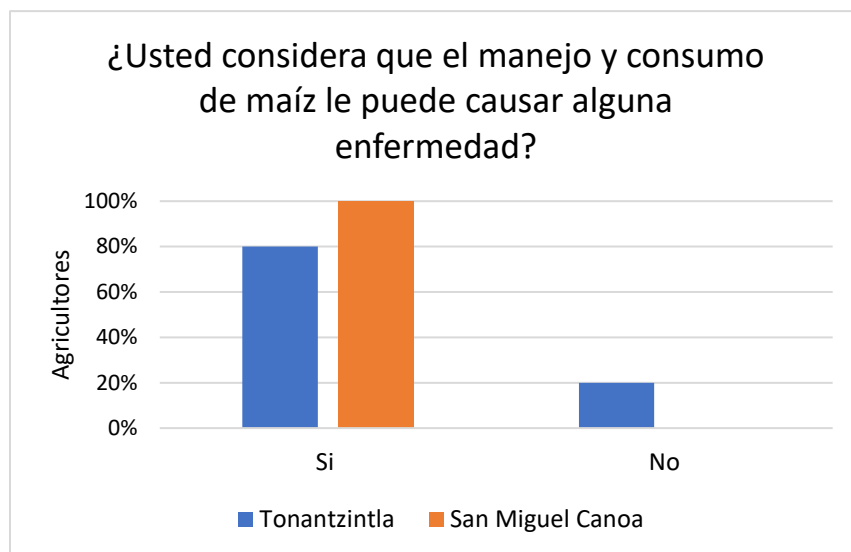


Figura 37.- Porcentaje de la población de las dos zonas del valle de Puebla que consideran que el manejo y consumo de maíz les puede causar alguna enfermedad.

En su totalidad los agricultores desgranar y almacenan el maíz, y al observar mazorcas defectuosas o dañadas las separan. Los entrevistados mencionaron que al observar moho en su maíz el principal uso que le dan es como alimento para los animales, también lo ocupan como abono y algunos lo desechan (Figura 38).

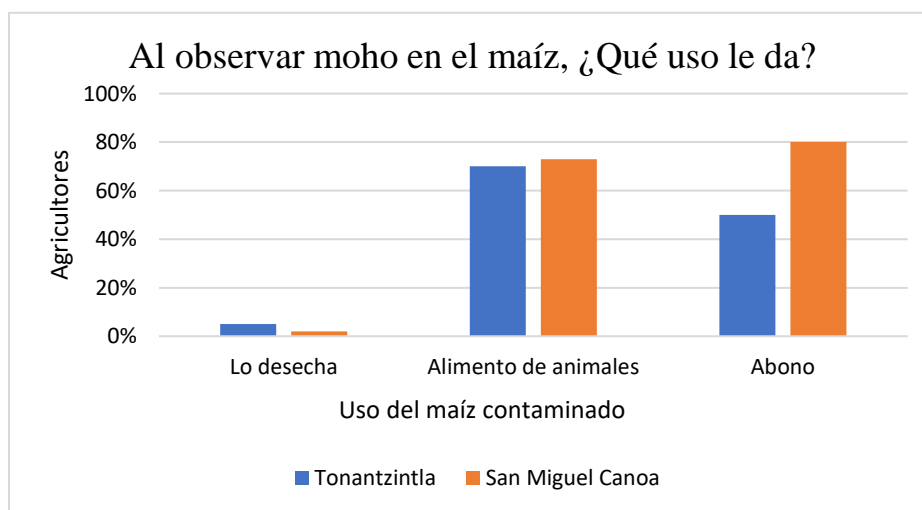


Figura 38.- Destino del maíz contaminado en las dos localidades.

Una buena estructura del almacenamiento debe tener las propiedades de contener granos por largos periodos de tiempo con la mínima pérdida de calidad y cantidad de maíz. El almacenamiento utilizado por los agricultores varía, el 75% de los agricultores en San Miguel Canoa utilizan costales, y un 73% en Tonantzintla como se observa en la siguiente figura.

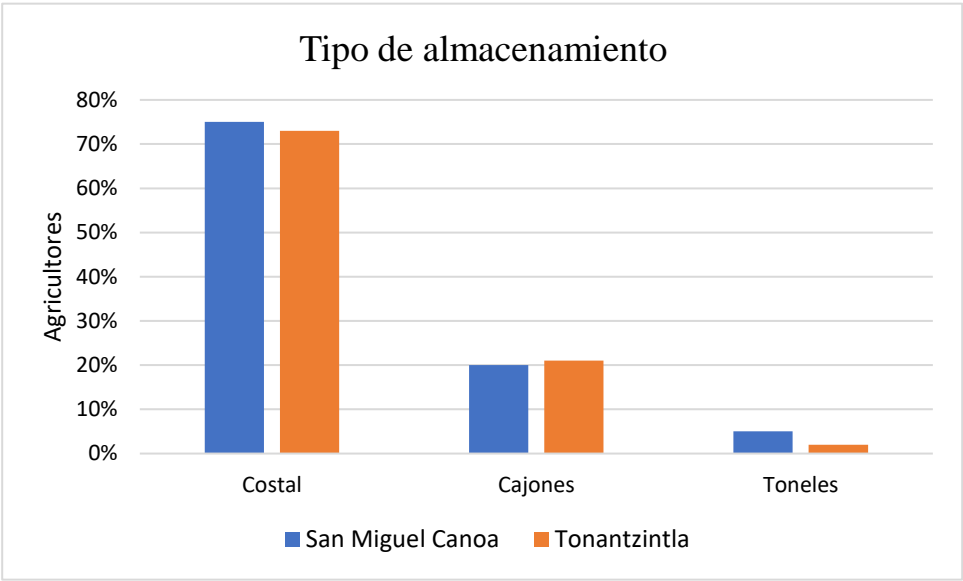


Figura 39.- Tipo de almacenamiento que utilizan las localidades de Puebla.

El 75% de los entrevistados no cuentan con un lugar de almacenamiento con las condiciones adecuadas lo que puede comprometer la inocuidad del maíz, y aunque el 100% los entrevistados en ambos sitios mencionaron que nixtamalizan su maíz. Si bien las micotoxinas pueden controlarse mediante la nixtamalización, y los métodos de procesamiento pueden ayudar a reducir la contaminación, garantizar la inocuidad de los productos a base de maíz debe depender principalmente del uso de granos libres de micotoxinas en su totalidad (Schaarschmidt & Fauhl-Hassek, 2019).

### **9.8.5 Cuadro clínico asociado a la presencia de micotoxicosis en la población**

El 8% de los entrevistados mencionaron presentar al menos una vez al año dolor de cabeza o vómitos, sin embargo, también mencionaron que no asisten a clínica por lo que no se les hace un diagnóstico médico. Debido a lo anterior la información es muy escasa para inferir que la población presente o haya presentado micotoxicosis. Es importante tener en cuenta que las micotoxinas son consideradas “asesinos silenciosos” ya que su consumo en pequeñas dosis no induce síntomas clínicos evidentes (Requena *et al*, 2005).

La actividad agrícola más importante para los agricultores de las dos zonas del valle de Puebla sigue siendo la producción de maíz, sin embargo, ésta se realiza en condiciones de temporal, por lo que su rendimiento depende de las condiciones ambientales. La producción se realiza en pequeñas superficies, expuesta a afectaciones por las condiciones climáticas, aunado a esto las ineficientes condiciones de almacenamiento ponen en riesgo la calidad de los granos de maíz, exponiéndose a la contaminación por hongos patógenos y a su vez a la presencia de micotoxinas. Aunado a esto, la población destina el maíz contaminado como alimento para los animales, por lo que la ingesta de micotoxinas puede darse de manera indirecta a través del consumo animal.

## X. CONCLUSIONES

El análisis de redes del presente trabajo de investigación, evidencia que el tema de las micotoxinas, el biocontrol de hongos patógenos y la producción de maíz depende no solo de las condiciones ambientales como el clima, suelo, y los microorganismos, sino también de condiciones económicas, políticas, culturales y sociales, por lo que esta investigación se aborda desde un enfoque multidisciplinario, que involucra diversas áreas.

Se encontró una cantidad importante de cepas pertenecientes al género *Trichoderma* en ambas zonas, lo que infiere que pueden ser utilizadas como indicadoras de salud del suelo y dada su la importancia biotecnológica, es necesario evaluar y preservar cepas que posean características eficientes como antagonistas de patógenos.

El correcto diseño *in silico* de primers específicos permitió la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium* y asimismo se evidenció la contaminación por *Fusarium* productor de micotoxinas en los suelos agrícolas y los granos de maíz de ambas zonas de estudio.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. son potenciales biocontroladores de *Fusarium* micotoxigénico, ya que presentaron un efecto antagónico de manera eficiente, con la ventaja de estar adaptadas al ambiente de la región de Puebla, donde existe alta incidencia de este patógeno.

La actividad agrícola mas importante para los agricultores de las dos zonas del valle de Puebla sigue siendo la producción de maíz, sin embargo, está expuesta a afectaciones por las condiciones climáticas y los ineficientes métodos de almacenamiento ponen en riesgo la calidad de los granos de maíz, exponiéndose a la contaminación por hongos patógenos y a la ingesta de micotoxinas.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos tropicales*, 30(2), 00-00.
2. Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios (ASERCA). 2018. Maíz grano cultivo representativo de México. Recuperado en 01 de octubre de 2022, de <https://www.gob.mx/aserca/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-demexico?idiom=es>.
3. Alvarez Romero, P. I., & Vásquez Guillén, J. J. (2024). *Estudio In Vitro de Microorganismos Caracterizados desde el Aislamiento de Frutos de Cacao como Potenciales Antagonistas de Monilophthora Roreri HC Evans* (Master's thesis).
4. Ames de Icochea, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. International Potato Center.
5. Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., & Barrales-Cureño, H. J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1259-1272.
6. Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*. 100(1), 3-5.
7. Bonifaz, J. (2015). *Micología médica básica*. México: McGraw Hill.
8. Bononi L, Chiaramonte JB, Pansa CC, Moitinho MA and Melo IS. 2020. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Scientific Reports* 10: 2858. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8>.
9. Cano, B. M., Martín, G., & Zarazúa, S. (2022). Microorganismos benéficos o agroquímicos. *Elementos*, 128, 57-63.
10. Castro, N. M. C. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Medicina*, 29(1), 152-152.
11. Chavarri, M., Barroyeta, J., Ochoa, Y., Rumbos, N., Alezones, J. (2017). Detección de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en granos de maíz blanco

- provenientes de los estados Yaracuy y Guárico, Venezuela. *Revista Nova Scientia*, 19-9(2): 173-184.
12. Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. (2015). *Trichoderma* spp. para el control biológico de enfermedades. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Paraguay*.
  13. Corallo, B. (2012). Selección de cepas de *Trichoderma* sp. antagonistas del patógeno de sorgo *Fusarium nygamai*.
  14. Cubillos, C. Á., Ramírez, M. G., & Toledo, R. L. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 1(1), 15-20.
  15. Cuevas Mejía, J. D. J. (2014). Maíz: Alimento fundamental en las tradiciones y costumbres mexicanas.
  16. Damián Huato, M. A., Romero-Arenas, O., Sangerman-Jarquín, D. M., Reyes-Muro, L., Parraguirre Lezama, C., & Orozco Cirilo, S. (2016). Maíz, potencial productivo y seguridad alimentaria: el caso de San Nicolás de Los Ranchos, Puebla-México. *Nova scientia*, 8(16), 352-370.
  17. da Rosa, P. D., Aquino, V., Fuentesfria, A. M., & Goldani, L. Z. (2021). Diversity of *Fusarium* species causing invasive and disseminated infections. *Journal of Medical Mycology*, 31(3), 101137. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101137>
  18. de Agricultura y Desarrollo Rural, S. (s/f). Milpa: el corazón de la agricultura mexicana. gob.mx. Recuperado el 16 de noviembre de 2023, de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/milpa-el-corazon-de-la-agricultura-mexicana?idiom=es>
  19. De la Torre-Hernández, M.E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E. y Plasencia de la Parra, J. (2014). Fumonisin—síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1):77-91.
  20. Díaz-Gutiérrez, C., Arroyave, C., Llugany, M., Poschenrieder, C., Martos, S., & Peláez, C. (2021). *Trichoderma asperellum* as a preventive and curative agent to control *Fusarium* wilt in *Stevia rebaudiana*. *Biological Control*, 155, 104537.

21. Domínguez Ríos, V. A., & López Santillán, M. Ángel. (2017). Teoría General de Sistemas, un enfoque práctico: General Systems Theory, a practical approach. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 10(3), 125-132. <https://doi.org/10.54167/tch.v10i3.174>
22. Duarte-Vogel, S., & Villamil-Jiménez, L. C. (2006). Micotoxinas en la salud pública. *Revista de Salud Pública*, 8(suppl 1), 129-135.
23. Elika. (2018). Las micotoxinas en alimentos. Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria.
24. Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Sid, A. A., Requena, M. E., & Candela, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum L.*). *Anales de biología*, 26, 35- 45.
25. Fernández Suárez, Rocío, Morales Chávez, Luis A., & Gálvez Mariscal, Amanda. (2013). Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional: Una revisión indispensable. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(Supl. 3-a), 275-283.
26. Fernández, S.R., Morales, C.L.A., Gálvez, M.A. (2013). Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3-A): 275-283.
27. Figueroa-Rivera, M.G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B.Z., González-Chavira, M.M., Pons-Hernández, J.L., Jiménez-Bremont, J.F., Ramírez-Pimentel, J.G., Andrio-Enríquez, E. y Mendoza-Elos, M. (2010). Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28:124- 134.
28. Galletti, S., Paris, R., & Cianchetta, S. (2020). Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. *Microbiological research*, 233, 126406.
29. Gamboa, G. G., Servín, M. S., Cota, F. P., Pereyra, J. G., Martínez, G. A., & Villalobos, S. S. (2018). Plaguicidas en la agricultura mexicana y potenciales alternativas sustentables para su sustitución. *Revista biológico agropecuaria Tuxpan*, 6(1), 61-75.
30. Gams, W. y J. Bissett. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*.

- Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. London: Taylor and Francis.
31. García Leños, M. D. L., Aguirre Gómez, J. A., Narro Sánchez, J., Cortés Baheza, E., & Rivera Reyes, J. G. (2007). Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en Guanajuato, México. *Agricultura técnica en México*, 33(3), 231-239.
  32. García-Lara, Silverio, & Bergvinson, David J.. (2007). Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. *Agricultura técnica en México*, 33(2), 181-189. Recuperado en 01 de diciembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0568251720070002000008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568251720070002000008&lng=es&tlng=es).
  33. Gil-Muñoz, A., López, P. A., Muñoz-Orozco, A., & López-Sánchez, H. (2004). Variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) en el estado de Puebla, México: diversidad y utilización. *Manejo de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia*, 18-25.
  34. Guevara, C. A. L. M., Rojas, L. M. C., López, J. W. G., & Vásquez, J. M. V. (2016). Efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma sp* sobre *Fusarium sp*. En planta de tomate Río Grande (*Solanum lycopersicum*). UCV-HACER. *Revista de Investigación y Cultura*, 5(1), 64-68.
  35. Hernández-Delgado, Sanjuana, Reyes-López, Miguel Ángel, García-Olivares, Jesús Gerardo, Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl, & Reyes-Méndez, César Augusto. (2007). Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(2), 127-133.
  36. Kamle, M., Mahato, D. K., Devi, S., Lee, K. E., Kang, S. G., & Kumar, P. (2019). Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*, 11(6), 328.
  37. Kuiper-Goodman, T. (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. En N. Magan, y M. Olsen (eds.), *Mycotoxins in food. Detection and control* (pp. 3-31). Reino Unido: Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
  38. López-Bautista, Viridiana, Mora-Aguilera, Gustavo, Gutiérrez-Espinosa, María

- Alejandra, Mendoza-Ramos, Coral, Martínez-Bustamante, Verónica Inés, Coria-Contreras, Juan José, Acevedo-Sánchez, Gerardo, & Santana-Peñaloza, Baldemar. (2020). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociados a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 79-106.
39. Maniscalco, D. P., & Dorta, B. (2015). Diversidad del hongo *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela. *Interciencia*, 40(1), 23-31.
40. Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30.
41. Martínez-Martínez, T. O., Guerrero-Aguilar, B. Z., Pecina-Quintero, V., Rivas-Valencia, P., González-Pérez, E., & Angeles-Núñez, J. G. (2020). Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(5), 1135-1147.
42. Mendoza, R. S., Alvarado, G. R., Pavía, S. P. F., Marrufo, G. V., Castro, J. C. M., & Malvido, J. B. (2017). Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública?. *Revista Digital Universitaria*, 18(6).
43. Meza, N. L. T., Pazmiño, D. E. Z., & Zambrano, S. M. V. (2014). CAPACIDAD ANTAGONISTA DE HONGOS CELULOLÍTICOS FRENTE A *Fusarium* sp. Y *Macrophomina* sp. *Revista ESPAMCIENCIA ISSN 1390-8103*, 5(2), 119-126.
44. Osorio-García, N., López-Sánchez, H., Ramírez-Valverde, B., Gil-Muñoz, A., & Gutiérrez-Rangel, N. (2015). Producción de maíz y pluriactividad de los campesinos en el Valle de Puebla, México. *Nova scientia*, 7(14), 577-600.
45. Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., & Pavlovic, M. (2000). Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud: la revista internacional de salud pública: recopilación de artículos 2000*; 2: 80-92.
46. Presello, D.A., Oviedo, M.S., Fernández, M., Iglesias, J., Copia, P.A. (2016). Resistencia a podredumbres de espiga y acumulación de micotoxinas en maíz. *RTA*. 10(32): 29-32.
47. Regalado, J. G., Rivers, A., & Verhulst, N. (2017). El sistema POSCOSECHA DE MAÍZ en México. *The Broadbalk Wheat Experiment*, 42.
48. Requena, Fanny, Saume, Elsy, & León, Alicia. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23(4), 393-410.
49. Ríos, E. L. V. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que

- aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2(1).
50. Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J., & Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma spp.* antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3).
51. Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, F. H., & Romero-Bastidas, M. (2021). Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 435-451.
52. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural SADER (14 de octubre de 2021). *Maíz, frijol, arroz y trigo, los granos básicos de México*. Recuperado en 20 de noviembre de 2022, de <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-frijol-arroz-y-trigo-los-granos-basicos-de-mexico>
53. Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxiosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Ces Medicina*, 29(1), 143-151.
54. Solís, J. D. Á., & Martínez, M. D. J. A. (2004). Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. *Agrociencia*, 38(1), 13-22.
55. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA (2017). Planeación agrícola nacional 2017-2030 maíz grano blanco y amarillo mexicano; Primera Edición.
56. Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxiosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Ces Medicina*, 29(1), 143-151.
57. Statista 2022. Consumo anual per cápita de algunos granos y cereales en México en 2020, por tipo (en kilogramos). Recuperado en 14 de octubre de 2022, de <https://es.statista.com/estadisticas/592154/consumo-aparente-de-los-principales-cultivos-basicos-en-mexico/>.
58. Tapia, Cecilia, & Amaro, José. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.

59. Tecnología, P. (2021). PRINCIPALES PLAGAS EN EL CULTIVO DE MAÍZ EN MÉXICO. *ProainShop*. Recuperado el 10 de noviembre de 2022, de <https://proain.com/blogs/notas-tecnicas/principales-plagas-en-el-cultivo-de-maiz-en-mexico>
60. Torres-Sánchez, L., & López-Carrillo, L. (2010). Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud pública de México*, 52(5), 461-467.
61. Varón de Agudelo, F., & Sarria Villa, G. A. (2007). *Enfermedades del maíz y su manejo: compendio ilustrado*. Instituto Colombiano Agropecuario-ICA.
62. Virgen Vargas, J., Arellano Vázquez, J. L., Rojas Martínez, I., Ávila Perches, M. A., & Gutiérrez Hernández, G. F. (2010). Producción de semilla de cruza simples de híbridos de maíz en Tlaxcala, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(SPE4), 107-110.
63. Bolet Astoviza, M., & Socarrás Suárez, M. (2005). Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24(1), 54-59.
64. Pinzón, A., Barreto, E., & Aristizabal, F. (2007). Introducción al diseño “in silico” de primers. *Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia y del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia*.
65. Presello, D. A., Oviedo, M. S., Fernández, M., Iglesias, J., & Copia, P. A. (2016). Resistencia a podredumbres de espiga y acumulación de micotoxinas en maíz. *RTA EEA Pergamino*, 10(32), 29-32.
66. Requena, F., Saume, E., & León, A. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia tropical*, 23(4), 393-410.
67. Malgioglio G, Rizzo GF, Nigro S, Lefebvre du Prey V, Herforth-Rahmé J, Catara V and Branca F (2022). Plant-Microbe Interaction in Sustainable Agriculture: The Factors That May Influence the Efficacy of PGPM Application. *Sustainability* 14(4):2253.
68. Naciones Unidas México. Objetivo de Desarrollo Sostenible 2. Portal de las Naciones Unidas. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/>
69. Schaarschmidt, S., & Fahl-Hassek, C. (2019). Micotoxinas durante los procesos de nixtamalización y producción de tortilla. *Toxins*, 11 (4), 227.
70. Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Ces Medicina*, 29(1), 143-151.

71. Wu, F., Groopman, J. D. y Pestka, J. J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*. 5, 351-372.
72. Xu, Y., Zhang, Z., Lu, P., Li, R., Ma, P., Wu, J., Li, T., & Zhang, H. (2023). Increasing *Fusarium verticillioides* resistance in maize by genomics-assisted breeding: Methods, progress, and prospects. *The Crop Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.07.004>