BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS-ICUAP

Distribución del género *Fusarium* y *Aspergillus* en ambientes naturales de Puebla y Tlaxcala.

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO.

PRESENTA:

KAREN CRISTINA SAEZ GOMEZ

DIRECTOR:
D.C. RICARDO MUNGUIA PÉREZ

ASESORA:
M.C. EDITH DÍAZ CABRERA

OCTUBRE DEL 2015

AGRADECIMIENTOS.

Le doy gracias a Dios y a la vida por permitirme culminar una de las metas más anheladas de mi vida profesional. Agradezco a mi familia, en especial a mis padres Norberto y Celia que son el pilar de mi formación personal y profesional, a mis hermanos Norberto, Ángel y Víctor que al igual que mis papás siempre estuvieron en momentos buenos y complicados, brindándome en cada momento su apoyo incondicional. También agradezco la oportunidad de conocer personas maravillosas con los que espero compartir anécdotas toda la vida.

Gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme formar parte de una de las mejores universidades, a la Facultad de Ciencias Químicas en la cual pude estudiar la licenciatura que me apasiona y en la que daré todo lo mejor de mí, la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo; al D.C. Ricardo Munguia Pérez por el apoyo en la realización de este trabajo, a los profesores por compartir uno de los tesoros más valiosos, que es el conocimiento.

ÍNDICE.

Página

1. Introducción 1

2. Marco teórico 3

2.1. Generalidades de fitopatógenos en cultivos agrícolas 3

2.1.1. Enfermedades generadas por fitopatógenos en las plantas de maíz 3

2.1.2. Importancia económica y social del maíz 7

2.2. Generalidades de las hortalizas. 7

2.3. *Fusarium* 9

2.3.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium* 10

2.3.2 *Fusarium* como patógeno oportunista 11

2.4. *Aspergillus* 12

2.4.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus* 13

2.4.2 *Aspergillus* como patógeno oportunista 13

3. Marco de referencia 14

4. Planteamiento del problema 17

5. Justificación 18

6. Objetivos 19

7. Diseño de la investigación 20

7.1 Tamaño de la muestra 20

7.2 Sede y lugar de estudio 20

7.3 Criterios de inclusión 21

7.4 Criterios de exclusión 21

7.5 Recursos humanos 21

7.6 Recursos financieros 21

7.7 Análisis estadístico de la información 21

8 Materiales y metodología 22

8.1 Metodología 22

9 Resultados y discusión 28

10 Conclusiones 41

11 Expectativas 42

Bibliografía 43

Apéndices. Información adicional.

Apéndice 1. Técnica de preparación del Agar Borelli 47

Apéndice 2. Técnica de tinción azul de algodón-lactofenol 47

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

		Página
Gráfico 9.1	Frecuencia de aislamientos en silos de maíz del almacén a la intemperie en Nativitas, Tlaxcala	30
Gráfico 9.2	Frecuencia de muestras contaminadas y no contaminadas, recolectadas en Puebla y Tlaxcala	32
Gráfico 9.3	Frecuencia de aislamientos de *Fusarium*, *Aspergillus* y otros géneros	34
Gráfico 9.4	Frecuencia de especies de *Fusarium*, del total de muestras recolectadas	36
Gráfico 9.5	Frecuencia de especies de *Aspergillus*, del total de muestras recolectadas	37
Gráfico 9.6	Número total de especies aisladas, en suelos agrícolas y silos de maíz de almacén a la intemperie	38

ÍNDICE DE FIGURAS.

		Página
Figura 2.1	Partes de una planta de maíz	4
Figura 2.2	Síntomas de Damping-off en hortalizas como la lechuga	8
Figura 2.3	Variabilidad en color y textura de colonias pertenecientes al género *Fusarium*	10
Figura 2.4	*Fusarium oxysporum* A, B macroconidias; C, D microconidias	11
Figura 2.5	Morfología macroscópica de *Aspergillus fumigatus*	13
Figura 2.6	Morfología microscópica de *Aspergillus fumigatus*	13
Figura 8.1	Muestreo tipo zeta.	22

ÍNDICE DE TABLAS.

Página

Tabla 2.1	Clasificación taxonómica de *Zea mays*	4
Tabla 2.2	Etapas de crecimiento del maíz	5
Tabla 2.3	Clasificación taxonómica de *Fusarium*	9
Tabla 2.4	Clasificación taxonómica de *Aspergillus*	12
Tabla 7.1	Lugar de muestreo y cantidad de muestras	20
Tabla 9.1	Clave de cepas aisladas y lugar de muestreo en Tepeaca, Puebla	28
Tabla 9.2	Clave de cepas aisladas y lugar de muestreo en Nativitas, Tlaxcala	31
Tabla 9.3	Lugar de muestreo, y número de muestras contaminadas y no contaminadas en suelos agrícolas y silos de maíz en almacén a la intemperie	32
Tabla 9.4	Número de aislamientos en suelos agrícolas y en silos de maíz de almacén a la intemperie	33
Tabla 9.5	Especies aisladas de *Fusarium* y lugar de aislamiento	38
Tabla 9.6	Especies aisladas de *Aspergillus* y lugar de aislamiento	39
Tabla 9.7	Especies aisladas y micotoxinas que pueden llegar a producir	39

RESUMEN.

En el presente trabajo se realizó un estudio en suelos agrícolas dedicados al cultivo de haba, lechuga y maíz en el municipio de Tepeaca, Puebla y en silos de maíz de almacén concentrador a la intemperie en Nativitas, Tlaxcala, con el objetivo de estudiar la distribución de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* en ambientes naturales de Puebla y Tlaxcala. Se analizaron un total de 32 muestras, 9 pertenecientes a suelos agrícolas (3 de haba, 3 de maíz y 3 lechuga) y 23 muestras de mazorca obtenidas de almacenes a la intemperie. El muestreo se realizó tipo zeta y tomando en cuenta algunos puntos de las Normas Oficiales Mexicanas NOM-021-SEMARNAT-2000 y la NOM-188-SSA1-2002. Para el aislamiento de posibles hongos fitopatógenos se realizó dilución en placa, mientras que, para la identificación se obtuvieron cultivos axénicos seguido de microcultivos, para posteriormente observar a 40X. De los resultados obtenidos 29 de las muestras estaban inoculadas por lo menos con un hongo, mientras que el resto no; se obtuvieron 50 aislamientos pertenecientes a 7 géneros, el 60% de los aislamientos pertenecieron a los géneros *Fusarium* (16) y *Aspergillus* (14), y el 40% en orden de mayor a menor número de aislamientos a *Penicillium* (15), *Trichothecium* (2), *Chrysosporium* (1), *Alternaria* (1) y *Escopulariopsis* (1). Con ayuda de claves taxonómicas especializadas se identificaron 4 especies del género *Fusarium*: *F. solani* (6), *F. oxysporum* (5), *F. verticillioides* (3) y *F. graminearum* (2); y 3 especies del género *Aspergillus*: *A. flavus* (8), *A. glaucus* (5) y *A. fumigatus* (1). Se concluye que aunque las muestras obtenidas de suelos agrícolas no fueron representativas se aisló a *Fusarium* y *Aspergillus* así como también, en granos de mazorcas recolectadas de almacén a la intemperie; y aunque, se obtuvieron un gran número de aislamientos del género *Penicillium*, en el presente trabajo nos enfocamos a *Fusarium* y *Aspergillus* debido a su alta capacidad productora de micotoxinas, que incluso, algunas ya se encuentran dentro de la clasificación de sustancias cancerígenas proporcionada por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.

1. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año. El daño que ocasionan no solo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadoras atacadas por estos microorganismos. Se sabe que más de 8000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno, y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta.

El maíz (*Zea mays*) es el cereal más susceptible a ser atacado por bacterias y hongos debido a su alto contenido de proteínas, que lo convierte en una buena fuente de carbohidratos para el crecimiento microbiano.

Las enfermedades causadas por hongos, en hortalizas generan un incremento en la incidencia y la severidad, debido a que si se presentan condiciones favorables para la diseminación y el desarrollo de algunos organismos patógenos, como la humedad en suelo y aire, se pueden inducir pérdidas y en ocasiones hasta la ruina total de las cosechas.

Fusarium es uno de los fitopatógenos que afecta cultivos, está distribuido entre el 70 y el 84% de los lotes de maíz. Es un hongo que daña los tejidos vasculares del tallo, esto impide que la planta tome de forma adecuada los fertilizantes y el agua del suelo. Las plantas que son afectadas debido a la pudrición de tallos como consecuencia pueden quedar achaparradas y raquíticas, estas afectaciones en la planta reducen el rendimiento del maíz, ya que las mazorcas crecen pequeñas y no llenan todos los granos, llegando a reducir el rendimiento en más de 40%. En el peor de los casos cuando el daño es aún mayor algunas plantas pueden llegar a morir. Otro de los daños que causa este hongo es en los granos, llegando a afectar hasta el 14% de la mazorca.

Otro género que afectan los cultivos es *Aspergillus*, el cual, causa pudriciones en la mazorca. La mayoría de las especies de *Aspergillus* producen compuestos orgánicos llamados aflatoxinas, pudiendo llegar a ser tóxicos para seres humanos y animales que consumen alimentos contaminados con estas toxinas. Se puede convertir en un problema serio si se almacenan mazorcas infectadas con un alto contenido de humedad.

Durante el almacenaje, los hongos causan la mayoría de problemas por calentamiento, compactación y deterioro de granos. Se debe controlar la humedad y temperatura del grano para evitar el desarrollo del hongo. A menor temperatura y menor humedad mayor conservación de la calidad del grano

La viabilidad de la agricultura es fundamental para garantizar alimentos a la población. La seguridad regional y nacional alimentaria depende de varios factores, entre los que destacan el mantenimiento y fortalecimiento de un sistema de investigación y desarrollo de una manera incluyente, que sea capaz de proporcionar continuas mejoras en todos los aspectos de los sistemas productivos utilizados por los agricultores, que haga frente a la diversidad agroecológica, económica y social de un país, y que sea dinámica para responder a los cambios climáticos.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Generalidades de fitopatógenos en cultivos agrícolas.

Hongos fitopatógenos que se encuentran en suelos, ocasionan daños en los ecosistemas y agroecosistemas del mundo. Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución. Esta capacidad adaptativa de hongos fitopatógenos va a depender en gran medida del grado de relación que han desarrollado con sus plantas hospedantes, es decir, si son parásitos obligados, parásitos facultativos, o saprófitos facultativos. (Rodríguez, 2001).

Los hongos atacan las plantas hospederas susceptibles a través del movimiento de sus estructuras reproductivas, como lo son los esclerocios y las esporas. Las esporas se diseminan fácilmente por medios mecánicos a través del viento y agua. En adición, los hongos se transfieren fácilmente en tiestos con suelo contaminado y en plantas o partes de éstas que tienen el patógeno. (Moreira *et al.*, 2012).

Considerando el momento en que los hongos atacan a los granos se pueden clasificar como hongos de campo y hongos de almacenamiento, los primeros atacan a la planta antes de la cosecha y los segundos durante el almacenamiento. Los hongos de campo viven en la tierra e invaden plantas en crecimiento, pueden vivir en raíces, tallos, hojas y semillas, en algunos casos causan enfermedades a las plantas; los ejemplos más comunes de hongos de campo son: *Fusarium* y *Alternaría*. *Fusarium* puede producir las toxinas: DON, *zearalenona*, monliformina, fumonisinas y depositarlas en las semillas. Los hongos de almacenamiento crecen en condiciones más secas de las que pueden soportar los hongos de campo, como ejemplos podemos citar a: *Aspergillus* y *Penicillium*, que pueden invadir a las semillas directamente, *Aspergillus* puede producir toxinas como aflatoxina y ocratoxina. (Bolívar, 2007).

2.1.1 Enfermedades generadas por fitopatógenos en plantas de maíz.

Uno de los cultivos afectados por fitopatógenos es el de maíz, a continuación se describen algunas de las generalidades de la planta (figura 2.1).

El maíz científicamente llamado *Zea mays*, cuya taxonomía se describe en la tabla 2.1, al igual que otras plantas está constituido por una parte femenina y otra masculina que en conjunto trabajan para reproducirse. La planta de maíz se adapta muy bien a todos tipos de suelo pero suelos con pH entre 5.5 a 7 son a los que mejor se adaptan. También requieren suelos profundos, ricos en materia orgánica, con buena circulación del drenaje para no producir encharques que originan asfixia radicular. (Valladares, 2010).

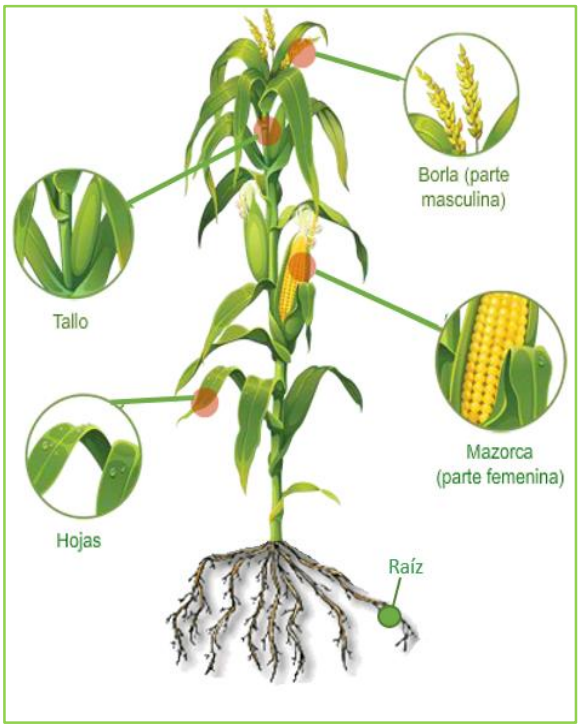


Figura 2.1: Partes de una planta de maíz

Fuente: SIAP, 2014

Tabla 2.1: Clasificación taxonómica de *Zea mays*

Reino:	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Commelinidae
Orden:	Poales
Familia:	Gramínea o Poaceae
Subfamilia:	Panicoideae
Tribu:	Maydeae
Género:	*Zea*
Especie:	*mayz*

Fuente: Valladares, 2010

Existen dos etapas de crecimiento (tabla 2.2): vegetativo (V) y reproductivo (R), además las etapas de crecimiento se agrupan en cuatro períodos: crecimiento de las plántulas (etapas VE y V1), crecimiento vegetativo (etapas V2, V3…Vn), floración y la fecundación (etapas VT, R0, y R1) y finalmente, llenado de grano y la madurez (etapas R2 a R6). (CONACYT, 2014).

Tabla 2.2: Etapas de crecimiento del maíz

Etapa	DAS*	Características
VE	5	El coleoptilo emerge de la superficie del suelo
V1	9	Es visible el cuello de la primera hoja.
V2	12	Es visible el cuello de la segunda hoja.
Vn		Es visible el cuello de la hoja número "n". ("n" es igual al número definitivo de hojas que tiene la planta; "n" generalmente fluctúa entre 16 y 22, pero para la floración se habrán perdido las 4 a 5 hojas de más abajo.)
VT	55	Es completamente visible la última rama de la panícula.
R0	57	Antesis o floración masculina. El polen se comienza a arrojar.
R1	59	Son visibles los estigmas.
R2	71	Etapa de ampolla. Los granos se llenan con un líquido claro y se puede ver el embrión.
R3	80	Etapa lechosa. Los granos se llenan con un líquido lechoso blanco.
R4	90	Etapa masosa. Los granos se llenan con una pasta blanca. El embrión tiene aproximadamente la mitad del ancho del grano.
R5	102	Etapa dentada. La parte superior de los granos se llena con almidón sólido y, cuando el genotipo es dentado, los granos adquieren la forma dentada. En los tipos tanto cristalinos como dentados es visible una "línea de leche" cuando se observa el grano desde el costado.
R6	112	Madurez fisiológica. Una capa negra es visible en la base del grano. La humedad del grano es generalmente de alrededor del 35%.

*DAS: número aproximado de días después de la siembra en tierras bajas tropicales, donde las temperaturas máxima y mínima pueden ser de 33°C y 22°C, respectivamente. En los ambientes más fríos, se amplían estos tiempos.

Fuente: CONACYT, 2014

Las enfermedades de maíz reducen la calidad del grano, así como también su rendimiento. Algunos de los factores que intervienen en el crecimiento de la planta son: presencia de fitopatógenos en suelos agrícolas, condiciones climatológicas, exceso de humedad o sequias, entre otros. (Paliwal *et al*., 2001).

Las enfermedades causadas por fitopatógenos de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* son las siguientes:

- Pudrición de las raíces.

La pudrición de las raíces es generalmente causada por hongos de los géneros *Fusarium* y *Pythium*. La raíz se debilita, se humedece y comienza a pudrirse; consecuentemente, el abastecimiento de alimentos a la planta se retarda y esta puede incluso volcarse. (Paliwal *et al.*, 2001).

- Pudrición del tallo.

Los patógenos de la pudrición del tallo son varios hongos y bacterias, muy a menudo en forma combinada. La enfermedad causa un secado prematuro de la planta, la rotura del tallo y la muerte de la planta y ocurre en todos los ambientes en que se cultiva el maíz: en climas fríos o cálidos, en tierras bajas, de media altitud o altas, en climas secos o húmedos.

Hay tres hongos principales que causan pudrición del tallo después de la floración, especies del género *Fusarium, Gibberella* y *Diplodia.* La pudrición causada por los hongos del género *Fusarium* comprende varias especies: *Fusarium moniliforme* y *Fusarium graminearum*. La pudrición comienza enseguida después de la polinización y afecta las raíces, la base de la planta y los entrenudos bajos y la enfermedad progresa a medida que la planta madura; se rompen los tallos y ocurre una maduración prematura como en otras pudriciones. Las plantas pueden permanecer erectas aun cuando estén secas pero caerán fácilmente al ser golpeadas. (Paliwal *et al.,* 2001).

- Pudrición de la mazorca.

La pudrición de la mazorca y de los granos también puede ser causada por el hongo *Fusarium moniliforme*. El patógeno entra a través de los estambres en el extremo de la mazorca; la infección permanece limitada por un cierto tiempo a algunos granos o a una parte de la mazorca y en los granos se desarrolla un moho pulverulento o algodonoso blanco-rosado. Los granos infectados al final de la estación pueden no tener moho y mostrar solo unas rayas en el pericarpio. Esta pudrición se difunde rápidamente en los ambientes tropicales y los granos infectados con *Fusarium* se pueden encontrar en lotes de mazorcas de maíz limpias. (Paliwal *et al.,* 2001).

Otra pudrición de la mazorca es causada por varias especies del género *Aspergillus*; la pudrición causada por *Aspergillus flavus* es la más importante porque participa en la producción de al menos dos micotoxinas en este caso llamadas aflotoxinas del maíz. *Aspergillus niger* es la especie más difundida y origina una masa de esporas pulverulentas negras. Otras especies producen un crecimiento de color verde amarillento o bronceado sobre y entre los granos. Algunos factores tales como las altas temperaturas y el estrés de las plantas, especialmente el estrés de humedad antes de la cosecha, están asociados con un aumento de la incidencia de la infección de *Aspergillus*. Las aflatoxinas son sumamente tóxicas para los seres humanos y los animales domésticos a causa de sus efectos carcinogénicos y otros efectos tóxicos. (Paliwal *et al.,* 2001).

- Mohos del almacenamiento.

Algunas especies de hongos, especialmente *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* que causan la pudrición de los granos en el campo son también parásitos de los granos almacenados y pueden dañar el grano de maíz en el período de almacenamiento. Estos hongos, en el campo, atacan y dañan el grano cuando su humedad es alta, por lo general por encima de 18%. Durante el almacenamiento los hongos atacan y dañan el grano cuando la humedad está entre 14 y 18%. (Paliwal *et al.*, 2001).

2.1.2 Importancia económica y social del maíz.

Durante el periodo 1996-2006, el maíz ocupó el 51% del total de la superficie sembrada y cosechada promedio del país; generó el 7.4% del volumen de producción agrícola nacional, representando el 30% del valor nuestra producción.

Aunque la demanda del maíz blanco cubre prácticamente la totalidad de la producción nacional, el país es deficitario en maíz amarillo; específicamente el grano amarillo tiene diversos usos, principalmente pecuario, por lo cual se generan requerimientos de importación superiores a los 5 millones de toneladas en un promedio anual.

El maíz es el cultivo más productivo en volumen. Hoy en día este cereal se utiliza como fuente fundamental en la nutrición tanto de seres humanos como animales. Es además una materia prima indispensable en la fabricación de productos alimenticios, farmacéuticos y de uso industrial. Además de los granos, las hojas, las flores, los tallos, todo es aprovechado para la fabricación de diversos productos: almidón, aceite comestible, bebidas alcohólicas, papel, edulcorante alimenticio, pegamentos, cosméticos, forraje, levaduras, jabones, antibióticos, caramelos, plásticos, entre otros. (SIAP, 2015).

2.2 Generalidades de las hortalizas.

Desde el punto de vista económico y social, las hortalizas son de gran importancia en nuestro país, por ser una fuente de comida, de trabajo en todo su proceso de producción, por la demanda

alimenticia en todos los estratos sociales y su alto valor en fresco e industrializado en los mercados locales, regionales, nacionales. Desde el punto de vista alimenticio, las hortalizas se consideran importantes para la dieta del ser humano por ser una fuente de vitaminas, minerales, carbohidratos y fibras; sustancia vegetales indispensables para el desarrollo normal del individuo, sostenimiento de vida y prevención de muchas enfermedades. (Alcázar, 2010).

Las hortalizas son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos fitopatógenos, los cuales pueden provocar grandes pérdidas en la producción de frutas y hortalizas. (Trigos *et al.*, 2008).

Por ejemplo, la especie *Fusarium oxysporum* en plantas de lechuga produce la enfermedad llamada Damping-off (figura 2.2), la cual presenta gran destrucción de tejidos, produciendo un amarillamiento de las hojas, doblamiento del tallo y finalmente muerte de la planta. Las plantas afectadas se marchitan y colapsan en un periodo de tiempo muy corto. (Moya, 2015).

Figura 2.2: Síntomas de Damping-off en hortalizas como la lechuga

Fuente: Moya, 2015

Por otro lado, el haba (*Vicia faba L.*) es una leguminosa de importancia para la alimentación de algunos países, entre ellos México. La semilla es el órgano de mayor interés por su consumo en fresco o seco; el resto de la planta se utiliza como forraje. En la actualidad, la producción de alimentos para el consumo humano demanda alta calidad, igual que para su uso dentro de la industria en la elaboración de harinas y pastas. En México, los principales estados productores de haba son: México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos y Distrito Federal, los que en conjunto representan 83% de la superficie sembrada en el país. (Guadarrama *et al.*, 2007).

2.3 *Fusarium*.

Fusarium (tabla 2.3), es un hongo filamentoso común en áreas tropicales y subtropicales, aunque también puede habitar climas fríos. Conocido patógeno de plantas, puede causar infecciones oportunistas en el hombre. Las especies más comunes son *F. solani, F. oxysporum, F. verticillioides* y *F. moniliforme.* (Dona, 2010).

Tabla 2.3: Clasificación taxonómica de *Fusarium*

Reino:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Clase:	Deuteromycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	*Fusarium*
Especie:	*F. oxysporum, F. verticillioides, F. solani, F. dimerum, F. chlamydosporum, etc.*

Fuente: Valencia, 2009

Los tricotecenos son un grupo de metabolitos secundarios del género *Fusarium* con una estructura básica similar. Se han descrito más de 45 tricotecenos, la mayoría de los cuales se clasifican en dos tipos, según su estructura química. Así tenemos los tricotecenos tipo A, como las toxinas T-2, HT-2 y el diacetoxiescirpenol; y los de tipo B, como el deoxinivalenol y sus derivados. La micotoxina T2 se metaboliza a HT-2, las principales especies productoras de estas son *F. sporotrichioides* y *F. poae*. El deoxinivalenol producido principalmente *por F. graminearum* y *F. culmorum*. La zearalenona, compuesto anabólico y uterotrópico con actividad estrogénica, es una de las micotoxinas de *Fusarium* más frecuente en los productos agrícolas. Una gran cantidad de especies del género pueden producirla, las más importantes, *F. graminearum, F. culmorum* y *F. crookwellense.* La moniliformina se forma en los cereales por un gran número de especies como lo son: *F. avenaceum, F. subglutinans, F. proliferatum* y *F. verticillioides*, aunque de esta última pocas cepas son capaces de producirla. Las fumonisinas son un grupo de al menos quince micotoxinas de estructura química similar, siendo la fumonisina B1 la más importante, las principales especies productoras son *F. verticillioides y F. proliferatum.* (Soriano, 2007).

Las micotoxinas más importantes de *Fusarium* que pueden dañar los cultivos de maíz y hortalizas, llegando a afectar potencialmente la salud humana y animal son, fumonisinas (FUMs), zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON), T-2 y HT-2. Las micotoxinas del género *Fusarium* son producidas principalmente por *Fusarium sporotrichioides, Fusarium verticillioides, Fusarium proliferatum, Fusarium culmorum* y *Fusarium graminearum.* . De las fumonisinas identificadas, B1 (FB1) es la que frecuentemente está relacionada con efectos inmunotóxicos, hepatotóxicos, neumotóxicos y nefrotóxicos. Si tricotecenos de tipo A, T-2 y HT-2 son ingeridas a través de los alimentos, pueden provocar efectos como: náuseas, dolor abdominal, mareo, necrosis dérmica, la inhibición de la síntesis de proteínas, etc. Por otra parte las toxinas DON, T-2 y HT-2 pueden tener un impacto negativo en las células hematológicas, manifestándose principalmente como trombocitopenia y leucopenia. (Kos *et al*., 2014)

2.3.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium*.

Las colonias del género *Fusarium* (figura 2.3) presentan diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna, pardo o no presentan pigmento), al reverso de la colonia puede presentar colores pardo oscuro o negro. El micelio puede presentar una densidad alta o baja, ya sea algodonosa o vellosa. (Summerell *et al.*, 2001; Carrillo, 2003).

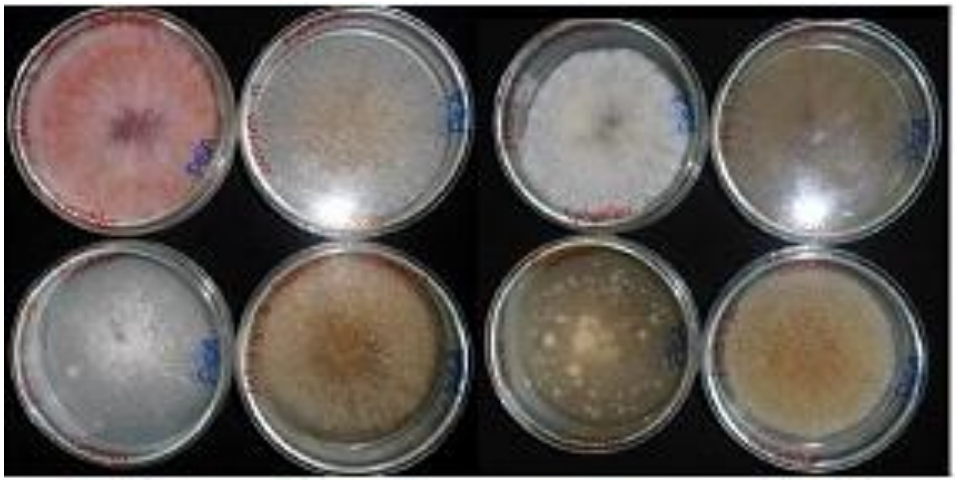


Figura 2.3: Variabilidad en color de colonias pertenecientes al género *Fusarium*

Fuente: Chávez y Kohli, 2013

Fusarium se reproduce por microconidios y macroconidios fusiformes que varían en forma y número según la especie aislada. Los macroconidios son curvos, hialinos, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y una célula basal en forma de pie. Los microconidios son producidos en el micelio aéreo, comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada. No siempre se producen los dos tipos de esporas (figura 2.4). (Leslie y Summerell, 2006).

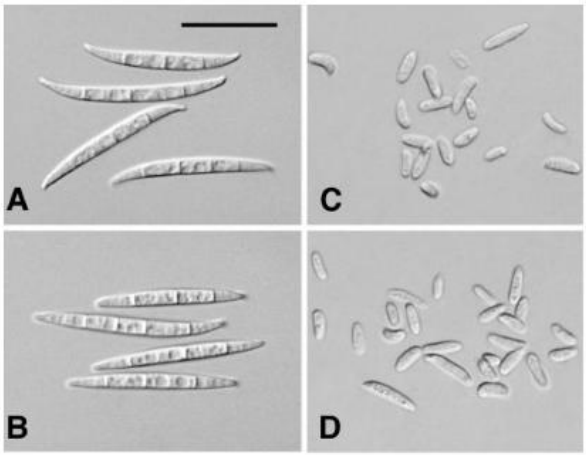


Figura 2.4: *Fusarium oxysporum* A, B macroconidias; C, D microconidias.

Fuente: Leslie y Summerell, 2006

2.3.2 *Fusarium* como patógeno oportunista.

Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en el suelo y materia orgánica. Son importantes patógenos de plantas y causan diversas enfermedades en los granos de cereal. Ocasionalmente causan enfermedades en humanos, que pueden ser superficiales (onicomicosis) o limitarse a un solo órgano (queratitis). Aunque se han identificado más de 100 especies, *Fusarium solani* es el causante más frecuente de enfermedad invasiva (en 50% de los casos), seguido por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum*. Estos se distinguen por hifas septadas, sin color, por lo que se les denomina hialohifomicosis. La enfermedad diseminada por *Fusarium* ha emergido como una infección importante y generalmente fatal en el paciente inmunodeprimido, sobre todo en pacientes con neutropenias prolongadas y profundas, como los que padecen neoplasias hematológicas. La mortalidad reportada es de 60 a 80%. (Martínez *et al.*, 2014).

Las características clave para la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium* de acuerdo a Burgess y col. 1994, son: forma de las macroconidias, presencia o ausencia de microconidias, la forma y el modo en que se forman las microconidias y finalmente la presencia o ausencia de clamidosporas.

2.4 *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* cuya clasificación taxonómica se muestra en la tabla 2.4, se encuentra distribuido en todo el mundo, puede crecer bajo condiciones ambientales variadas, pudiendo afectar una gran cantidad de alimentos. El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas. (Martínez *et al.*, 2013).

Tabla 2.4: Clasificación taxonómica de *Aspergillus*

Reino:	Fungi
División:	Deuteromycota
Clase:	Hyphomycetes
Orden:	Hyphomycetales
Familia:	Moniliaceae
Género:	*Aspergillus*
Especie:	*A. flavus, A. glaucus, A. parasiticus, A. oryzae, A. fumigatus, A. terreus, A. niger, A. nidulans,* etc.

Fuente: Arias y Piñeros, 2008

Las condiciones de crecimiento de *Aspergillus* son humedad relativa entre el 70 al 90%, contenido de agua en la semilla del entre 15 y 20% y un rango de temperatura amplio de 0 a 45 ^{0}C. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de aflatoxinas, pero las más importantes debido a su potencial mutagénico, cancerígeno y teratogénico son: B1, B2, G1, M1, M2, P1 y Q1. La aflatoxinas B1 es la más peligrosa y tóxica de todas y es producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*. El género *Aspergillus* produce una inhibición en la germinación de la semilla, cambios de color, enmohecimiento y pudrición. (Martínez *et al.*, 2013).

2.4.1 Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus*.

Las especies de este género son aerobias de crecimiento rápido, la colonia inicialmente es plana, de color blanco que crece haciéndose algodonosa. A medida que envejece y va esporulando, el centro de la colonia adquiere una tonalidad distinta de acuerdo a la especie así: amarillo *A. flavus*, verdoso *A. glaucus*, negro *A. niger*, gris *A. fumigatus* (figura 2.5). (Arias y Piñeros, 2008).

Aspergillus microscópicamente se caracterizan por tener micelio vegetativo compuesto de hifas septadas, ramificadas, incoloras, estructura conidial, de paredes gruesas, las cuales producen conidióforos como ramas aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la célula de pie (figura 2.6). (Arias y Piñeros, 2008).

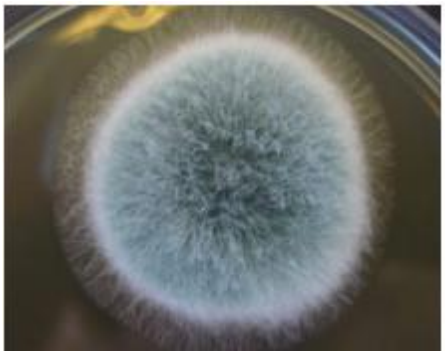


Figura 2.5: Morfología macroscópica de *Aspergillus fumigatus.*

Fuente: Arias y Piñeros, 2008

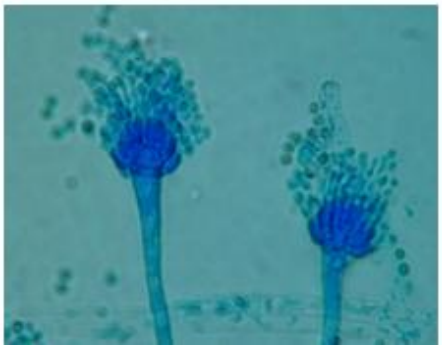


Figura 2.6: Morfología microscópica de *Aspergillus fumigatus.*

Fuente: Arias y Piñeros, 2008

2.4.2 *Aspergillus* como patógeno oportunista.

Las aflatoxinas producidas por *Aspergillus*, puede causar efectos carcinogénicos, teratogénicos, o mutagénicos, hasta producir desordenes hormonales o inmunosupresores; el efecto que se pueda llegar a producir va a depender de la aflatoxina, dosis, tiempo de exposición u organismo expuesto. El problema principal reside en que las aflatoxinas son acumulativas de modo que una vez que contaminan el grano o el producto agrícola en campo o almacén persisten a la digestión, al calor de la cocción o al congelamiento. Las aflatoxinas son ingeridas por los seres humanos no sólo a través de granos, semillas o frutos; también se presentan en la leche o la carne de animales criados con alimentos contaminados. (Martínez *et al.*, 2013).

3. MARCO DE REFERENCIA.

Las hortalizas son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento; tal es el caso de los hongos fitopatógenos, los cuales, pueden provocar grandes pérdidas en la producción. Por otra parte, este tipo de microorganismos son capaces de producir micotoxinas que pueden llegar a ser perjudiciales, aun cuando se encuentran en concentraciones muy bajas, poniendo en entredicho su inocuidad, ya que un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud.

En un estudio realizado, se monitoreo mensualmente y durante un año frutas y hortalizas, expendidas en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México, con el propósito de determinar la presencia de hongos fitopatógenos, así como su patogenicidad y correlacionar su potencial sintético de metabolitos secundarios tóxicos. Se analizaron 28 muestras de frutas y hortalizas por mes, obteniendo 336 muestras y de ellas se obtuvieron 344 aislamientos, *Alternaria* fue el género más incidente con 83 aislamientos, mientras que *Fusarium* fue el segundo con 47 aislamientos. Se obtuvieron un total de 27 especies fúngicas, pertenecientes a 18 géneros, de las cuales se comprobó que el 100 % presentaron patogenicidad en el producto original, de acuerdo con los postulados de Koch. Finalmente, se corroboró con la literatura que el 60.9 % de dichas especies pueden ser potencialmente productoras de micotoxinas. (Trigos *et al*., 2008).

Para la caracterización de la diversidad de especies del género *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo de maíz en parcelas del estado de Guanajuato, se llevó a cabo un estudio en el cual, se realizaron pruebas de patogenicidad con las especies identificadas. Los resultados indicaron la presencia de *F. subglutinans, F. verticillioides, F. heterosporum, F. esquiseti, F. proliferatum* y *F. reticulatum,* en donde *F. subglutinans* fue la especie más abundante. En cuanto a patogenicidad, *F. verticillioides* y *F. subglutinans* fueron las especies más patogénicas en las razas de maíz. (Figueroa *et al*., 2010).

Son pocos los estudios que se han realizado en México sobre la presencia de *Fusarium* en maíz y sus micotoxinas, por ello, se realizó un estudio para analizar la micobiota presente en el grano de maíz recién cosechado en el estado de Sonora, asi también, se determinó la concentración de

fumonisinas presentes en forma natural en este cereal, y por último se llevó a cabo la evaluación de la capacidad productora de dichas toxinas por las cepas de *Fusarium* aisladas de este grano, desarrolladas bajo condiciones controladas de laboratorio. En el estudio se colectaron muestras de grano de maíz procedentes de localidades productoras en Sonora, México. Se identificaron hongos principalmente de los géneros *Fusarium, Aspergillus* y *Penicillium*. El género con mayor incidencia fue *Fusarium* seguido por *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria.* Las concentraciones de fumonisinas detectadas en granos de maíz fluctuó entre 0.4 y 3.4 µg/g, sin embargo la producción mínima de fumonisinas por todas las cepas de *Fusarium* aisladas fue superior a 500 µg/g, representando un riesgo potencial por ser el maíz un producto de importancia en la alimentación de humanos y animales. (Gallardo *et al*., 2006).

Otro estudio realizado que tuvo como objetivo conocer las especies de *Fusarium* en granos de maíz blanco procedentes de mazorcas recién cosechadas y desgranadas en el campo, en el centro oriente del estado de Puebla, se analizaron 16 muestras de maíz, 10 de maíz blanco nacional y 6 de maíz criollo blanco para determinar las especies de *Fusarium* presentes en los granos, en especial aquellas registradas como inductoras de pudriciones de mazorca y grano, principalmente las que producen micotoxinas. Las especies identificadas en orden del número de aislamientos obtenidos fueron: *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. anthophilum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides* y *F. proliferatum*. Con excepción de *F. oxysporum*, *F. tricinctum* y *F. anthophilum*, las demás han sido registradas como inductoras de pudriciones de mazorca, grano y de tallo, y la mayoría son productoras de diversas micotoxinas, algunas de las cuales pueden ocasionar problemas a la salud humana y animal. (García y Martínez, 2010).

El género *Aspergillus* es el más frecuente (más de 40%) en grano de maíz blanco y amarillo almacenado en el norte de Tamaulipas, México, mientras que en campo la mayor incidencia la presenta *Fusarium* (más de 60%). Por último, cabe mencionan que, las instituciones involucradas en la sanidad de los alimentos deben implementar las medidas necesarias para promover la inocuidad del grano de maíz. (Hernández *et al.*, 2007).

El maíz es un producto que se ve afectado en el campo y durante el almacenamiento por hongos productores de toxinas como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Debido a la importancia que representa la contaminación con micotoxinas, moléculas que afectan al hígado y riñón principalmente, se realizó un trabajo que tuvo como objetivo conocer la incidencia de hongos

potencialmente toxigénicos en maíz de catorce estados de la república mexicana. Los resultados indicaron que: *Fusarium* se presentó en el 76,99 % de las muestras analizadas, *Aspergillus flavus* en el 11,72 %; *Aspergillus parasiticus*, en el 0,57 % y *Penicillium* en el 0,53 %. Los estados muestreados fueron: Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Hidalgo, Guanajuato, Veracruz, Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca, del norte, centro y sur del país. (Arrúa *et al.*, 2012).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México, la base de la alimentación es el maíz y el cultivo de hortalizas, los cuales son productos comercializados en el país y de gran importancia debido a su demanda. A nivel nacional los hongos fitopatógenos que más se han aislado de suelos agrícolas son los pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, esto sucede porque se adaptan a climas desde cálidos hasta tropicales. Su importancia radica en que pueden llegar a afectar cosechas, especialmente las plantas de maíz pueden afectarse en cualquiera de sus estadios de maduración, o bien, durante su almacenamiento con la consiguiente producción de micotoxinas.

Debido a que especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* se encuentran ampliamente distribuidos en suelos agrícolas, es importante saber si se encuentran y como distribuyen en los diferentes cultivos, así como también durante su almacenamiento en el caso del maíz.

En 2008 Tlaxcala destino 97,524.0 ha para el cultivo de maíz obteniendo un rendimiento (ton/ha) de 2.6, pero en 2009 el rendimiento fue menor (2.4), a pesar de que se destinaron más hectáreas para el cultivo de maíz (102,379.8 ha). (SAGARPA Tlaxcala, 2009). En Puebla se destinaron 462,374.4 ha en 2007 para el cultivo de maíz, obteniendo un rendimiento de 1.6 y en 2008 el rendimiento fue el mismo a pesar de que la superficie sembrada fue aún mayor con 509,373.0 ha. (SAGARPA Puebla, 2009). La disminución que se presenta en el rendimiento de los cultivos es alarmante ya que, la demanda de estos cultivos es aún mayor. La disminución en el rendimiento de hortalizas y maíz no solo afecta económicamente, si no también, puede llegar a afectar la salud de quien lo consume si se encuentra presente algún hongo fitopatógeno productor de micotoxinas.

Son muy pocas o casi nulas las investigaciones acerca de la distribución de estos hongos fitopatógenos, los cuales afectan cultivos agrícolas en todo el mundo, en el presente estudio nos enfocaremos en Puebla y Tlaxcala, cabe mencionar que gran parte de sus suelos agrícolas es destinado principalmente al cultivo de maíz, por ello es necesaria la realización de este estudio para saber si se encuentran estos dos principales hongos fitopatógenos, y cómo se distribuyen. Por todo lo anterior se plantea la siguiente pregunta científica:

¿Es posible aislar a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* en ambientes naturales de Puebla y Tlaxcala?

5. JUSTIFICACIÓN.

El suelo agrícola es un ecosistema complejo, el cual, está conformado por una diversidad de microrganismos entre ellos hongos, los cuales cumplen la función de degradación de materia orgánica, asi como, mantener un equilibrio de la microflora. Entre los hongos fitopatógenos que se aíslan con mayor frecuencia encontramos a: *Acrostalagmus*, ***Aspergillus***, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Spicaria*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pillularia*, *Cylindrocarpon* y ***Fusarium***, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Pythium*, *Chaetomium*, y *Rhizoctonia.* (Giri *et al*., 2005).

El cereal más ampliamente distribuido a nivel mundial es el maíz, el cual ocupa la tercera posición en producción, seguido por el trigo y el arroz. En el maíz *Fusarium* spp., ocasiona marchitez desde plántulas hasta la planta adulta, causando generalmente pudriciones en los órganos vegetativos, como hojas, tallo y raíz. En México, la superficie dedicada al cultivo del maíz se ha reducido en los últimos años, con pérdidas de alrededor del 30%. Algunos factores limitantes del rendimiento, son las enfermedades causadas por patógenos, destacan las producidas por el género *Fusarium*, el cual presenta una distribución cosmopolita y es endémico de zonas maiceras de todo el mundo. Este hongo, en maíz puede causar daño en todas las etapas del cultivo. En semilla, el micelio puede invadir y ocasionar manchas en las cubiertas externas, causando además disminución de la geminación por la muerte del embrión. En plántula y planta adulta, debilita y pudre la raíz, ocasionando acame. En el maíz, la pudrición de tallo y mazorca está asociado con *F. verticillioides* y *F. graminearum*. (Figueroa *et al.*, 2010).

La importancia de identificar a estos microorganismos y saber su distribución, no solo se centra en el hecho de que afectan grandes cultivos, sino también, porque se ha encontrado que *Fusarium* y *Aspergillus* pueden afectar la salud de quien se encuentra expuesto a las micotoxinas que producen. Debemos comenzar a darle importancia a estos fitopatógenos no solo desde el punto de vista productivo, sino también, comenzar a sospechar de estas micotoxinas como posibles agentes predisponentes de una amplia gama de enfermedades. Finalmente el maíz es un alimento de importancia mundial, por ello es necesario su monitoreo, para garantizar la calidad de semillas libres de patógenos, durante cada una de las etapas del cultivo, la cosecha, e incluso, durante la pos-cosecha (Plasencia, 2004).

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Estudiar la distribución de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* en ambientes naturales de Puebla y Tlaxcala.

6.2 Objetivos específicos.

- Aislar a *Fusarium* y *Aspergillus* de ambientes naturales (suelos dedicados al cultivo de maíz y hortalizas con especial interés en haba y lechuga; así como, granos de maíz) de los municipios de Tepeaca (Puebla) y Nativitas (Tlaxcala); mediante técnicas microbiológicas especializadas.

- Identificar morfológicamente a *Fusarium* y *Aspergillus*, utilizando como apoyo claves taxonómicas especializadas.

- Identificar y reportar los géneros aislados, diferentes a *Fusarium* y *Aspergillus.*

7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

El diseño experimental que se ocupó en el presente estudio fue de tipo transversal, observacional, descriptivo y prospectivo. Para la realización del estudio fue necesario obtener muestras representativas de suelos agrícolas dedicadas al cultivo de maíz y hortalizas con especial interés en haba y lechuga; así también, muestras de mazorcas recolectadas de silos de un almacén a la intemperie concentrador de varias parcelas, para posteriormente trabajar con granos de maíz.

7.1 Tamaño de la muestra.

Para determinar la distribución de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* se analizó un total de 32 muestras, 9 procedentes de suelos agrícolas dedicados al cultivo de maíz y suelos de hortalizas con especial interés en haba y lechuga, y 23 muestras de mazorca recolectadas de silos de un almacén a la intemperie concentrador de varias parcelas. En la tabla 7.1 se muestra el lugar de muestreo y la cantidad de muestras obtenidas.

Tabla 7.1: Lugar de muestreo y muestras totales recabadas en Puebla y Tlaxcala

LUGAR DE MUESTREO	MUNICIPIO	
	TEPEACA, PUEBLA	NATIVITAS, TLAXCALA
Suelo agrícola de maíz	3	
Suelo agrícola de haba	3	
Suelo agrícola de lechuga	3	
Almacén a la intemperie		23

7.2 Sede y lugar de estudio.

El estudio fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas -ICUAP en el Laboratorio de Micología.

7.3 Criterios de inclusión.

1. Muestreo de suelos agrícolas dedicados al cultivo de maíz, haba y lechuga en el municipio de Tepeaca, Puebla.
2. Muestreo de mazorcas dañadas, en almacén concentrador a la intemperie, en el municipio de Nativitas, Tlaxcala.

7.4 Criterios de exclusión.

1. Muestreo de suelos agrícolas dedicados a cultivos diferentes al de maíz, haba y lechuga, y que no pertenezcan al municipio de Tepeaca, Puebla.
2. Muestreo de mazorcas no dañadas, y que no sean del almacén concentrador a la intemperie, del municipio de Nativitas, Tlaxcala.

7.5 Recursos humanos.

El presente trabajo fue realizado con ayuda del D.C. Ricardo Munguia Pérez, la M.C. Edith Díaz Cabrera y la tesista Karen Cristina Saez Gomez.

7.6 Recursos financieros.

El presente trabajo fue financiado por el Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas -ICUAP.

7.7 Análisis estadístico de la información.

En el trabajo realizado se utilizó estadística paramétrica descriptiva, y, con base a la identificación de hongos de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, se reportó el número de aislamientos y porcentaje.

8. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

Para la realización de este estudio se utilizó el material y equipo necesario para la recolecta de muestras de suelo en campo y muestras de mazorca en almacén concentrador a la intemperie. Asi también, el equipo y material necesario para el procesamiento de las muestras en el laboratorio, el uso de cepas de referencia de *Fusarium solani* y *Aspergillus flavus* aisladas a partir de muestra de suelo e identificadas con ayuda de claves taxonómicas especializadas. En el diagrama general de trabajo (diagrama 1) se muestra de manera general la metodología que se llevó a cabo.

8.1 Metodología.

El muestreo (diagrama 2) se realizó tipo zeta utilizando como referencia algunos puntos de las Normas Oficiales Mexicanas NOM-021-SEMARNAT-2000 y NOM-188-SSA1-2002. El muestreo tipo zeta consistió en trazar una zeta imaginaria, en el muestreo de suelos agrícolas de haba, lechuga y maíz solo se tomaron 3 muestras (figura 8.1) por cada suelo y cada muestra estaba conformada por dos submuestras las cuales fueron recolectadas a profundidades diferentes, una aproximadamente a 5 cm de profundidad y la otra 30 cm más profunda que la primera, el peso aproximado de cada muestra (formado por las dos submuestras) fue de 500 g. Para el muestreo de mazorcas en el almacén concentrador a la intemperie al igual que en el muestreo de suelos se obtuvieron dos submuestras una recolectada de la superficie externa y la otra a 15 cm de profundidad aproximadamente.

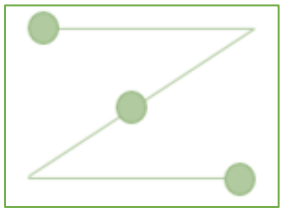


Figura 8.1: Muestreo tipo zeta.

En el laboratorio bajo condiciones de esterilidad se tamizaron las muestras de suelo para realizar suspensiones con 1 g de suelo y 9 ml de agua estéril, a partir de las muestras de mazorca se macero 1 g de maíz (conformado por las dos submuestras) en 9 ml de agua estéril.

El aislamiento de los microrganismos (diagrama 3) se realizó por extendido en superficie, las muestras se procesaron por dilución seriada (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) y extendiendo en la superficie de la placa 100 µL de las diluciones 1:1000 y 1:10000 por duplicado utilizando como medio agar dextrosa Sabouraud. Las placas se incubarán a una temperatura de 26 ± 2 ^{0}C durante un período de 4 a 7 días. Se determinaron las colonias presuntivas de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* con base a la morfología colonial, posteriormente se resembró en tubos con agar dextrosa Sabouraud para obtener cultivos axénicos, al crecimiento colonial obtenido se le realizó microcultivo (diagrama 4) en agar Borelli (Apéndice 1). La identificación microscópica se realizó a 40X, utilizando la tinción azul de algodón-lactofenol (Apéndice 2).

Para la identificación de géneros y especies se utilizaron claves taxonómicas especializadas reportadas por Abarca en 2000, Alcalá y col., Burgess y col. 1994, Leslie y Summerell en 2006, así como también por López y col. 2012; utilizando como cepas de referencia a *Fusarium solani* y *Aspergillus flavus* aisladas a partir de muestras de suelo e identificadas con ayuda de claves taxonómicas especializadas.

Para tener un control de las cepas aisladas, en el laboratorio se les proporciono una clave con base al lugar de muestreo (abreviación del cultivo o muestra de maíz) y el número de muestra, seguido de la dilución (expresado en letras: dilución 1:1000 con la letra A y 1:10000 con la letra B) en la que se aisló, en algunos casos de la misma dilución se aislaron dos cepas o más por lo que después de la dilución se agregó un numero de acuerdo al orden en el que fue aislado. Por ejemplo: SAM1 B (suelo agrícola de maíz muestra 1 dilución 1:10000), SAH1 B (suelo agrícola de haba muestra 1 dilución 1:10000), SAH1 B-1 (suelo agrícola de haba muestra 1 dilución 1:10000 cepa 1), SAL1 B (suelo agrícola de lechuga muestra 1 dilución 1:10000), MM1 B-1 (muestra de maíz 1 dilución 1:10000 cepa 1).

Diagrama 1: Diagrama general de trabajo.

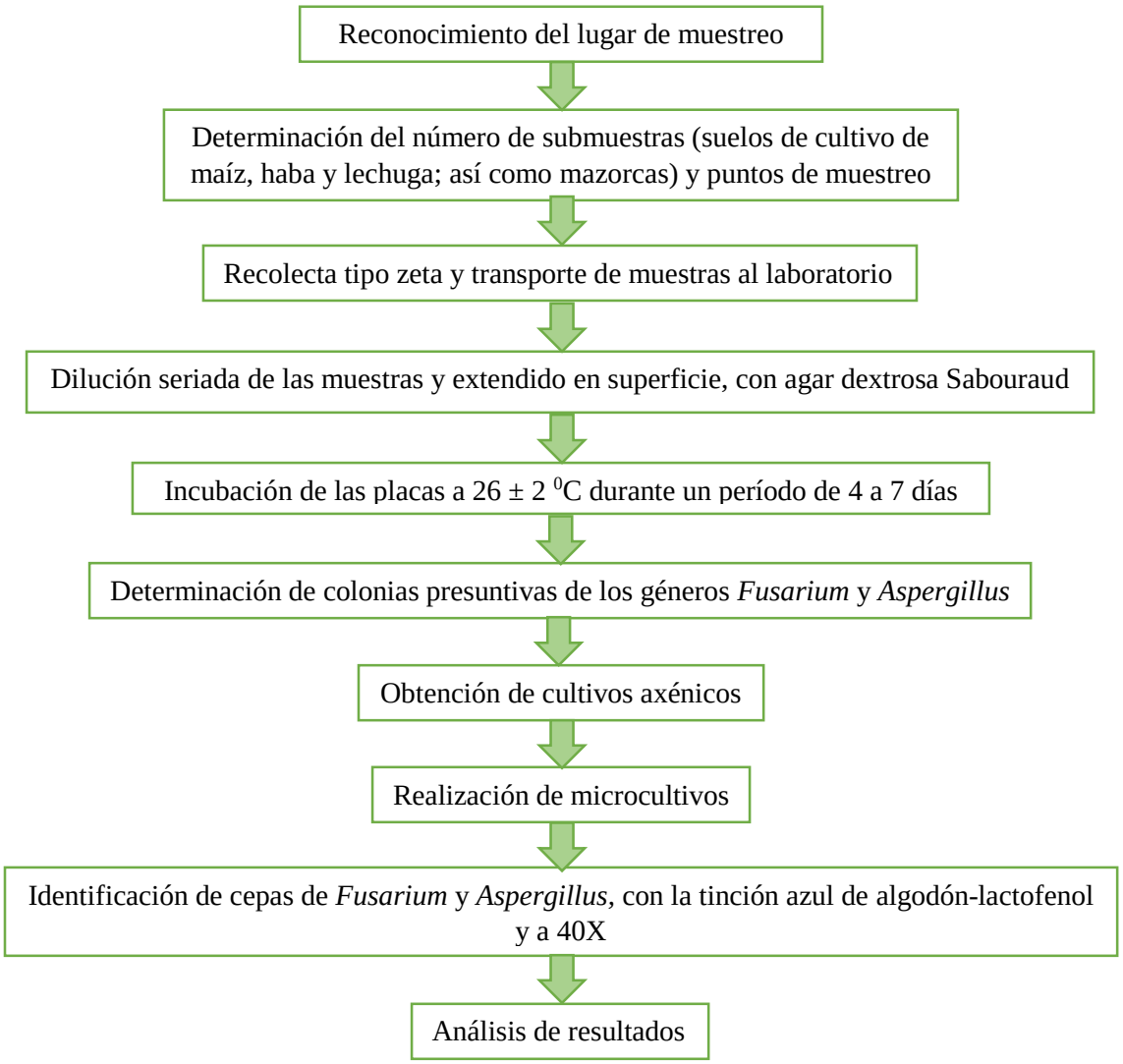


Diagrama 2: Recolección de muestras, tratamiento previo al análisis y realización de diluciones.

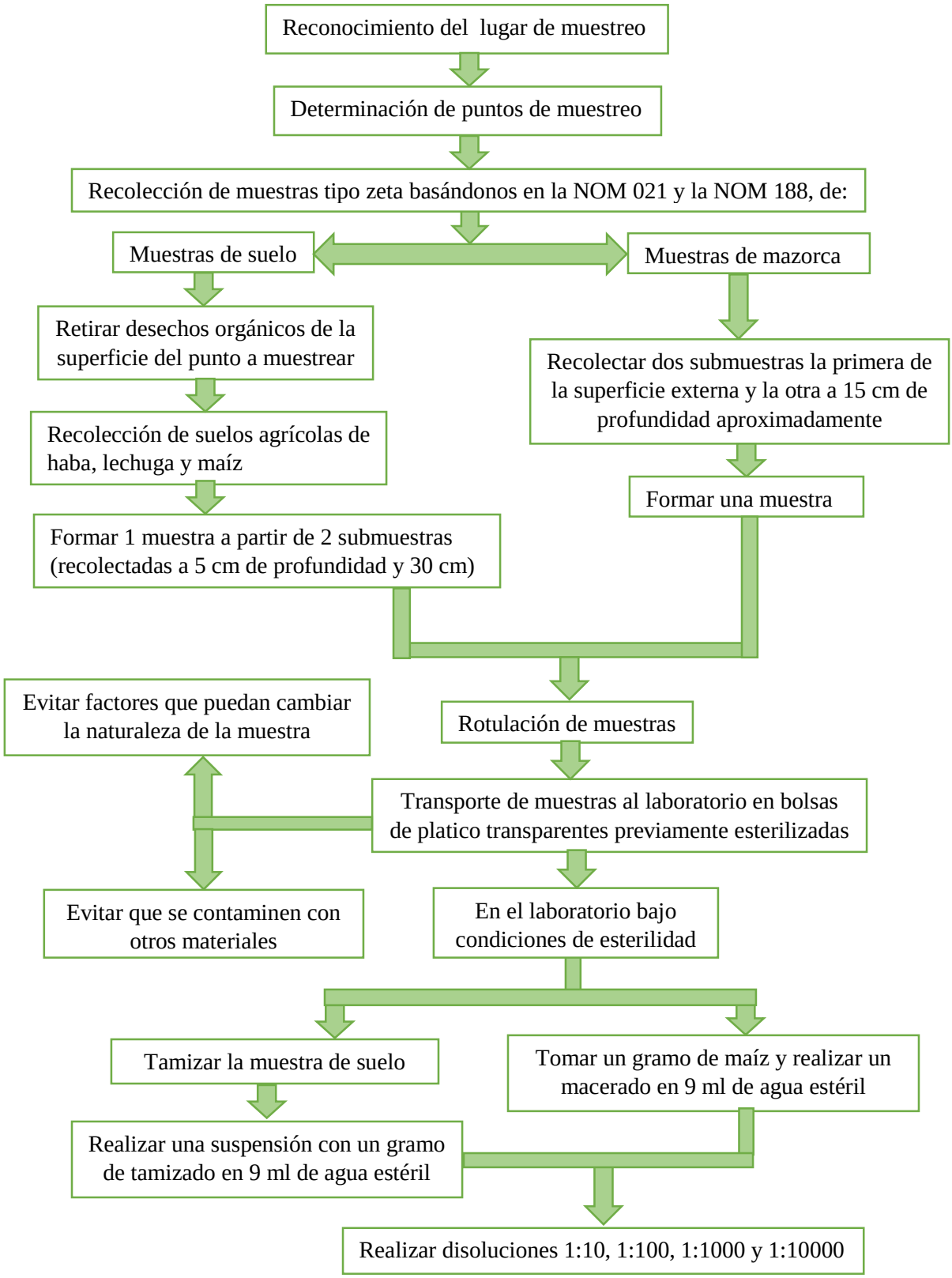
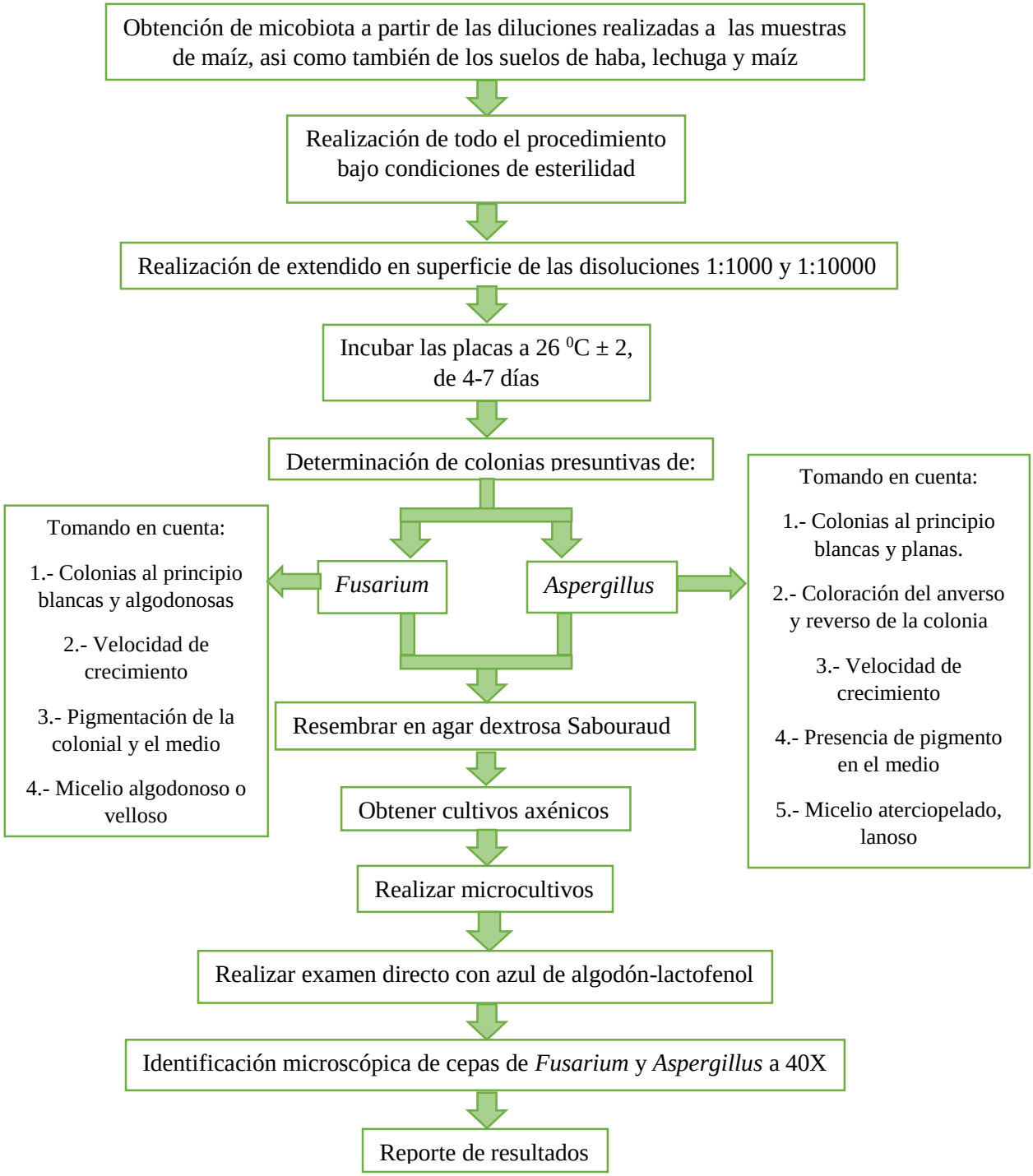
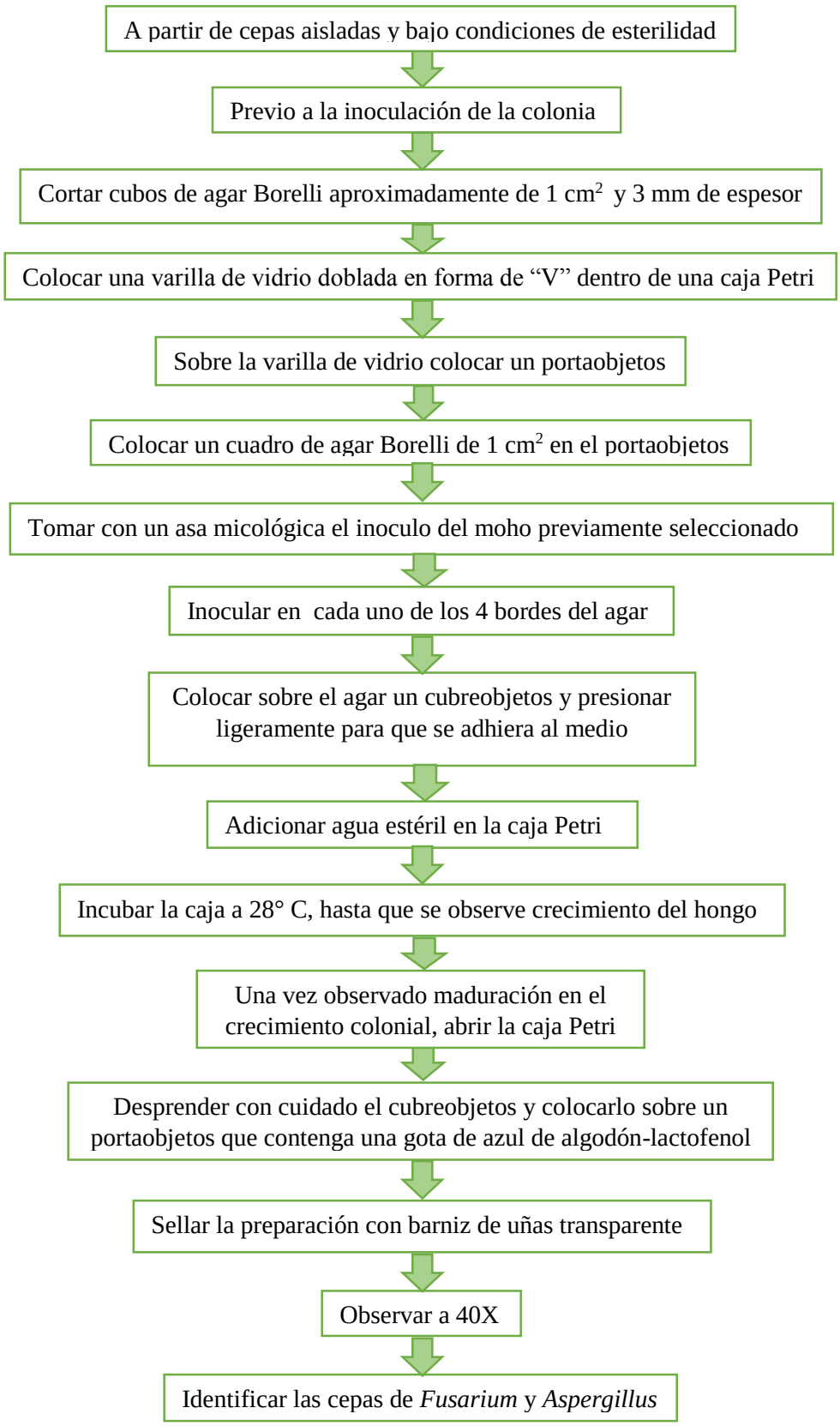


Diagrama 3: Obtención de micobiota.



.

Diagrama 4: Realización de microcultivos.



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En los estados de Puebla y Tlaxcala se dedica gran parte de su superficie a algún tipo de cultivo agrícola, pero el rendimiento que se obtiene en ocasiones se ve afectado, esto debido a diversos factores como la presencia de hongos fitopatógenos.

En el presente estudio se determinó la distribución de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* en suelos agrícolas dedicados al cultivo de maíz, haba y lechuga en el municipio de Tepeaca, Puebla y en silos de un almacén a la intemperie concentrador de varias parcelas en Nativitas, Tlaxcala. En la tabla 9.1 se muestran los datos referentes al municipio de Tepeaca, Puebla y en la tabla 9.2 los pertenecientes al municipio de Nativitas, Tlaxcala; en ambas tablas se muestra la clave de la cepa aislada que se proporcionó en el laboratorio, asi como, el lugar de muestreo, el género y especie aislada.

Tabla 9.1: Clave de cepas aisladas y lugar de muestreo en Tepeaca, Puebla

TEPEACA, PUEBLA		
CLAVE	GÉNERO Y ESPECIE	LUGAR DE MUESTREO
SAM2 B	*F. solani*	Suelo agrícola de maíz
SAM1 B	*F. solani*	Suelo agrícola de maíz
SAL1 B	*F. solani*	Suelo agrícola de lechuga
SAL2 B	*F. solani*	Suelo agrícola de lechuga
SAM3 B	*F. graminearum*	Suelo agrícola de maíz
SAH1 B-1	*A. Flavus*	Suelo agrícola de haba
SAH2	*A. Flavus*	Suelo agrícola de haba
SAH3	*A. Flavus*	Suelo agrícola de haba
SAH1 B-2	*A. fumigatus*	Suelo agrícola de haba

SAM (suelo agrícola de maíz), SAL (suelo agrícola de lechuga), SAH (suelo agrícola de haba)

Como se puede observar en la tabla 9.1, aunque el número de muestras no es representativo debido a que solo fue posible recolectar 3 muestras por cada suelo agrícola (a causa de circunstancias ajenas a los objetivos del trabajo) se pudieron obtener aislamientos de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, e incluso se pudo identificar la especie con ayuda de claves taxonómicas

especializadas antes mencionadas. Otros géneros aislados en suelos agrícolas fueron *Penicillium* y *Alternaria*; *Penicillium* es un hongo fitopatógeno que también es productor de micotoxinas y afecta una gran cantidad de cultivos, pero por motivos ya antes mencionados en este trabajo solo nos enfocamos a *Fusarium* y *Aspergillus*, aunque este hongo no deja de ser importante ya que también está implicado en algunas alteraciones en la salud de humanos; *Alternaria* es un hongo que también afecta cultivos pero el daño que genera no es tan grave debido a que frecuentemente afecta hojas, y las plantas que no tienen suficientes nutrientes son las más atacadas, de este género se aisló una cepa en el laboratorio. Quizá el número de muestras no es representativo, pero estos datos nos indican que en suelos agrícolas del municipio de Tepeaca, Puebla también puede haber afectaciones en los cultivos a causa de hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*.

En muestras de maíz recolectadas de silos de maíz de almacén a la intemperie al igual que en suelos agrícolas, se pudieron aislar los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* (tabla 9.2), El número de muestras inoculadas en el almacén a la intemperie es grande, ya que, de las 23 muestras recolectadas solo 2 no presentaron algún aislamiento. Estos datos nos indican que hay una gran predisposición de contaminación de la cosecha durante el almacenamiento, lo cual puede deberse a que no hay un control en la humedad y temperatura de almacenamiento , durante la cosecha algunas mazorcas ya enmohecidas no se separaron de las mazorcas en buen estado y fueron almacenadas, lo cual pudo haber provocado contaminación en otras mazorcas; además de daños causados en los granos debido a insectos, y como se ha mencionado anteriormente, entre más dañado este un grano los hongos pueden invadirlos con mayor facilidad. Por lo mencionado anteriormente, es necesario tener medidas precautorias durante el cultivo o durante la cosecha para evitar este tipo de afectaciones en el maíz durante el almacenamiento.

Otros géneros aislados de mayor a menor número de aislamientos en silos del almacén concentrador fueron: *Penicillium*, *Trichothecium*, *Chrysosporium* y *Scopulariopsis*. *Trichothecium* se considera un contaminante y, aunque es un hongo ampliamente distribuido en la vegetación en descomposición y en el suelo, aún no hay reportes de enfermedades en humanos o animales debido a este género, en el laboratorio se aislaron 2 cepas. *Chrysosporium* por otro lado es un hongo queratinofílico que vive en el pelaje de los perros y gatos, generalmente no causan ningún efecto adverso en la salud, pero entre ellos, pueden causar dermatofitosis (Dokuzeylul *et al.*, 2013), posiblemente en el lugar hay presencia de estos animales por lo que se pudo aislar, pero no es nada

certero, por ello, consideramos a este hongo como un contaminante ya que solo se aisló en el laboratorio una cepa. En el presente trabajo solo se aisló una cepa del género *Scopulariopsis*, este hongo frecuentemente también es considerado un hongo contaminante, aunque también pueden encontrarse como agente de infecciones en humanos. A continuación en el gráfico 9.1 se muestra la frecuencia de aislamientos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, y otros géneros (*Penicillium*, *Trichothecium*, *Chrysosporium* y *Scopulariopsis*) de muestras de maíz recabadas de silos de un almacén concentrador, por obvias razones no se realizó la frecuencia de aislamientos en suelos agrícolas (debido a que no es representativo el número de muestras).

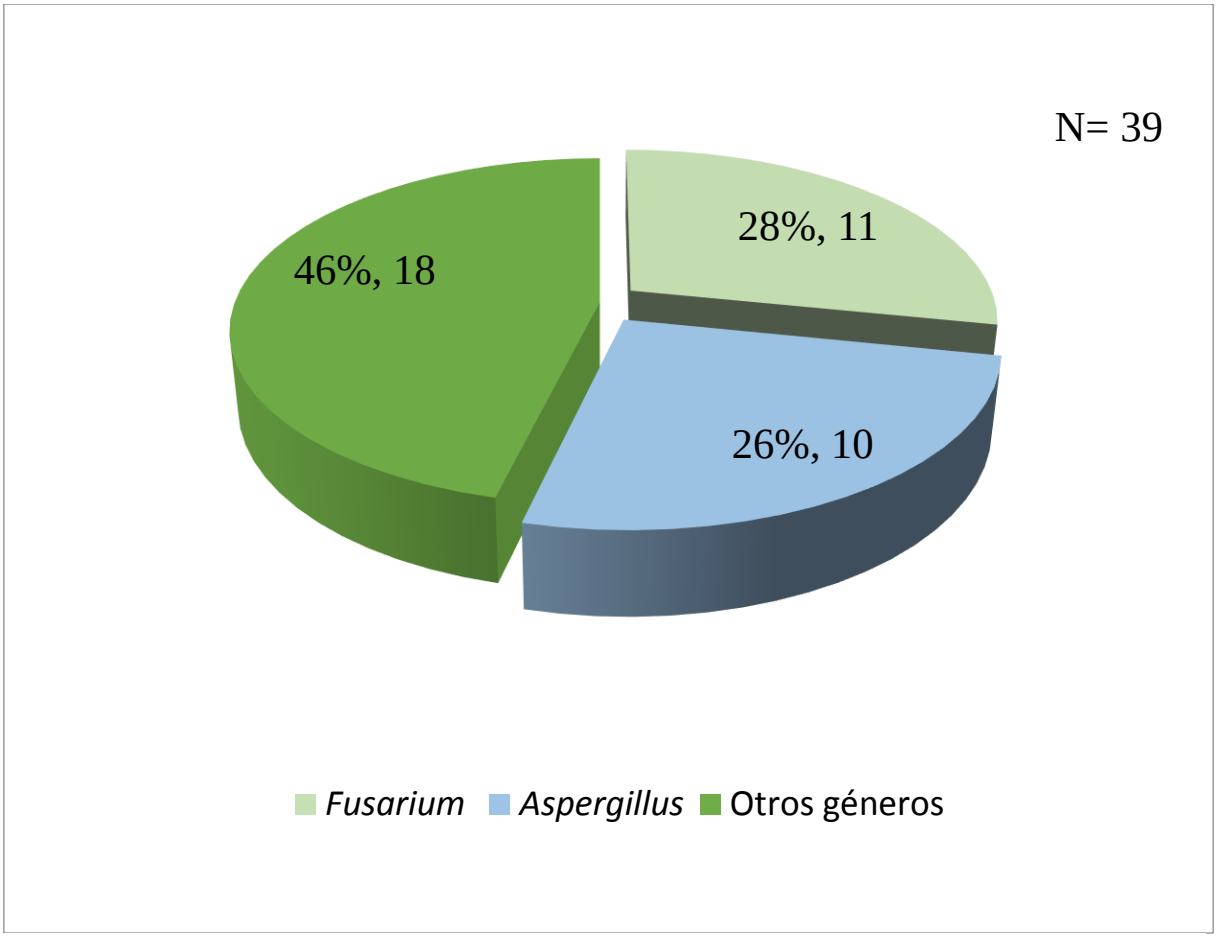


Gráfico 9.1: Frecuencia de aislamientos en silos de maíz del almacén a la intemperie en Nativitas, Tlaxcala

Tabla 9.2: Clave de cepas aisladas y lugar de muestreo en Nativitas, Tlaxcala

NATIVITAS, TLAXCALA		
CLAVE	GÉNERO Y ESPECIE	LUGAR DE MUESTREO
MM21 B	F. oxysporum	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM3 B	F. oxysporum	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM5 A	F. oxysporum	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM10 B	F. oxysporum	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM8 A	F. solani	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM9 B	F. solani	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM2 A	F. oxysporum	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM7 A	F. verticillioides	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM11 A	F. verticillioides	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM4 A	F. verticillioides	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM6 B	F. graminearum	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM1 B	A. glaucus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM18 A	A. glaucus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM17 A	A. glaucus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM16 B	A. glaucus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM12 A	A. glaucus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM20 B	A. flavus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM14 B	A. flavus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM15 A	A. flavus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM22 B	A. flavus	Silos de maíz de almacén a la intemperie
MM23 B	A. flavus	Silos de maíz de almacén a la intemperie

En la tabla 9.3 se muestran el total de muestras recolectadas, el lugar de donde se obtuvieron, el número de muestras contaminadas y no contaminadas, con la palabra “contaminada” se hace referencia a aquellas muestras en las que se obtuvo el aislamiento de por lo menos un hongo. Como se puede observar del total de muestras recolectadas, las muestras en la que se tuvo por lo menos el aislamiento de un género, es mucho mayor en comparación con aquellas que no presentaron ningún aislamiento.

Tabla 9.3: Lugar de muestreo, y número de muestras contaminadas y no contaminadas en suelos agrícolas y silos de maíz en almacén a la intemperie

Lugar de muestreo	No. de muestras	Muestras contaminadas	Muestras no contaminadas
SAM	3	3	0
SAL	3	2	1
SAH	3	3	0
AIM	23	21	2
Totales:	32	29	3

SAM (suelo agrícola de maíz), SAL (suelo agrícola de lechuga), SAH (suelo agrícola de haba), AIM (almacén a la intemperie de maíz)

En el gráfico 9.2 se muestra la frecuencia de las muestras contaminadas y no contaminadas, con base a las 32 muestras recabadas en este estudio.

Gráfico 9.2: Frecuencia de muestras contaminadas y no contaminadas, recolectadas en Puebla y Tlaxcala

A continuación en la tabla 9.4 se muestra el total de aislamientos obtenidos en el laboratorio, a partir de, suelos agrícolas de maíz, haba y lechuga, asi como también, de granos de maíz obtenidos de mazorcas de un almacén a la intemperie, pertenecientes a 7 géneros: *Fusarium*, *Aspergillus* y otros géneros como, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Chrysosporium*, *Alternaria* y *Scopulariopsis* que, en algunos casos son considerados hongos contaminantes.

Tabla 9.4: Número de aislamientos en suelos agrícolas y en silos de maíz de almacén a la intemperie

Lugar de muestreo	No. de aislamientos	Aislamientos *Fusarium*	Aislamientos *Aspergillus*	Otros géneros
SAM	3	3	0	0
SAL	2	2	0	0
SAH	6	0	4	2
AIM	39	11	10	18
Totales:	50	16	14	20

SAM (suelo agrícola de maíz), SAL (suelo agrícola de lechuga), SAH (suelo agrícola de haba), AIM (almacén a la intemperie de maíz)

En suelos agrícolas los géneros aislados de mayor a menor número de aislamientos fueron: *Fusarium* (5), *Aspergillus* (4), *Penicillium* (1) y *Alternaria* (1). Y en granos de maíz los géneros que se aislaron fueron: *Penicillium* (14), *Fusarium* (11), *Aspergillus* (10), *Trichothecium* (2), *Chrysosporium* (1) y *Scopulariopsis* (1). Como se puede observar en suelos agrícolas (haba, lechuga y maíz) asi como, en maíz obtenido de un almacén a la intemperie se aisló a *Fusarium* y *Aspergillus*, a pesar de que el número de muestras obtenidas de suelos agrícolas no es representativo. Aunque no todos los géneros aislados son productores de micotoxinas o bien patógenos para humanos o animales, o en algunos casos algunos son solo hongos contaminantes, en el presente trabajo decidimos mencionarlos, ya que, no son pocos los aislamientos que se obtuvieron, por tal razón hay que darles la importancia que se merecen, tal es el caso de *Penicillium* que fue un género del que se presentó una gran cantidad de aislamientos y que además algunas de sus especies son perjudiciales para cultivos o bien productores de micotoxinas, aunque en este trabajo no pudimos diferenciar las especies, ya que solo nos centramos en *Fusarium* y *Aspergillus*

debido a que la mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros son altamente productoras de micotoxinas.

En el grafico 9.3 se muestra la frecuencia del total de aislamientos obtenidos, pertenecientes a los géneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, y por otros géneros (*Penicillium*, *Alternaria*, *Trichothecium*, *Chrysosporium* y *Scopulariopsis*).

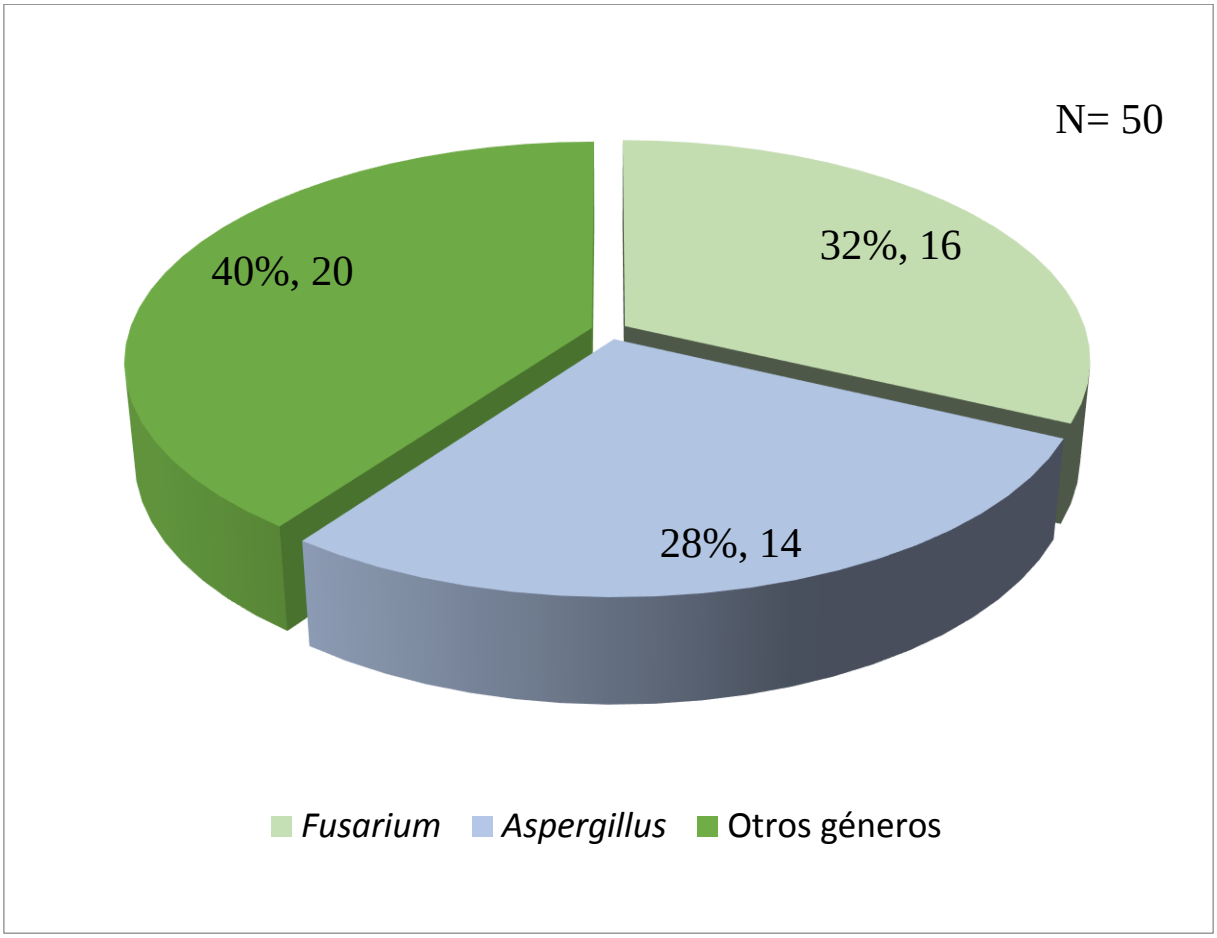


Gráfico 9.3: Frecuencia de aislamientos de *Fusarium*, *Aspergillus* y otros géneros

Fusarium y *Aspergillus* presentan una mayor frecuencia en el total de aislamientos obtenidos, ya que, representa el 60%, y aunque se aislaron otros géneros los cuales representan el 40 % de frecuencia, *Fusarium* y *Aspergillus* son los más frecuentes.

Además de la identificación de géneros en los aislamientos obtenidos, también se identificaron las especies pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, con la ayuda de claves taxonómicas

especializadas reportadas por Abarca en 2000, Alcalá y col., Burgess y col. 1994, Leslie y Summerell en 2006, así como también por López y col. 2012.

En este estudio realizado a partir de muestras de suelos agrícolas de haba, lechuga y maíz, y de muestras de maíz; se aislaron un total de 7 especies pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, los cuales son: *F. solani, F. oxysporum, F. verticillioides, F. graminearum, A. flavus, A. glaucus* y *A. fumigatus.*

En el gráfico 9.4 se muestran la frecuencia de las especies aisladas pertenecientes al género *Fusarium,* como se puede observar la especie que presentó un mayor número de aislamientos fue *F. solani*, la mayoría de los aislamientos fueron obtenidos a partir de suelos agrícolas, debido a que es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido en el suelo y además puede invadir raíces, la producción de esporas es lo que permite a este hongo superar condiciones adversas y adaptarse a cualquier medio; la compactación del suelo favorece tanto el proceso de invasión como el desarrollo de los síntomas generados por este hongo en las plantas. (Martínez *et al*., 2006). Las mazorcas pudieron haberse contaminado en el campo debido al alojamiento de esporas en ellas, y como consecuencia, estás probablemente se almacenaron ya inoculadas desde el campo por esta especie. *Fusarium oxysporum* fue aislada a partir de muestras de mazorca recolectadas de silos de un almacén a la intemperie, algunas de las razones por las que se pudo haber aislado son: es un hongo saprobio, ubicuo en el suelo, aislado de las raíces y semillas de muchas plantas entre ellas las de maíz, como parásito vegetal tiene varias formas especializadas que se conocen como *formae specialis* (f.sp.) que infectan diversas hospederas induciendo diferentes enfermedades; se le considera especie cosmopolita; por ultimo esta especie tiene gran capacidad para producir toxinas de importancia económica y sanitaria. (García y Martínez, 2010). *Fusarium verticillioides* otra de las especies aisladas durante este estudio, se aisló en mazorcas, está especie es el principal hongo fitopatógeno que afecta la productividad del maíz en el mundo, penetra a la planta por distintas rutas e infecta raíces, tallo y mazorca; este patógeno produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo que disminuye su calidad. (De la Torre *et al.*, 2014). *Fusarium graminearum* también fue una de las especies aisladas durante la realización de este estudio, esta especie inducen pudriciones de mazorca y de tallo y tizón en las plántulas. En México, este moho está registrado como especie que inducen pudriciones de mazorca y es de gran importancia por la capacidad que tienen para producir micotoxinas. (García y Martínez, 2010).

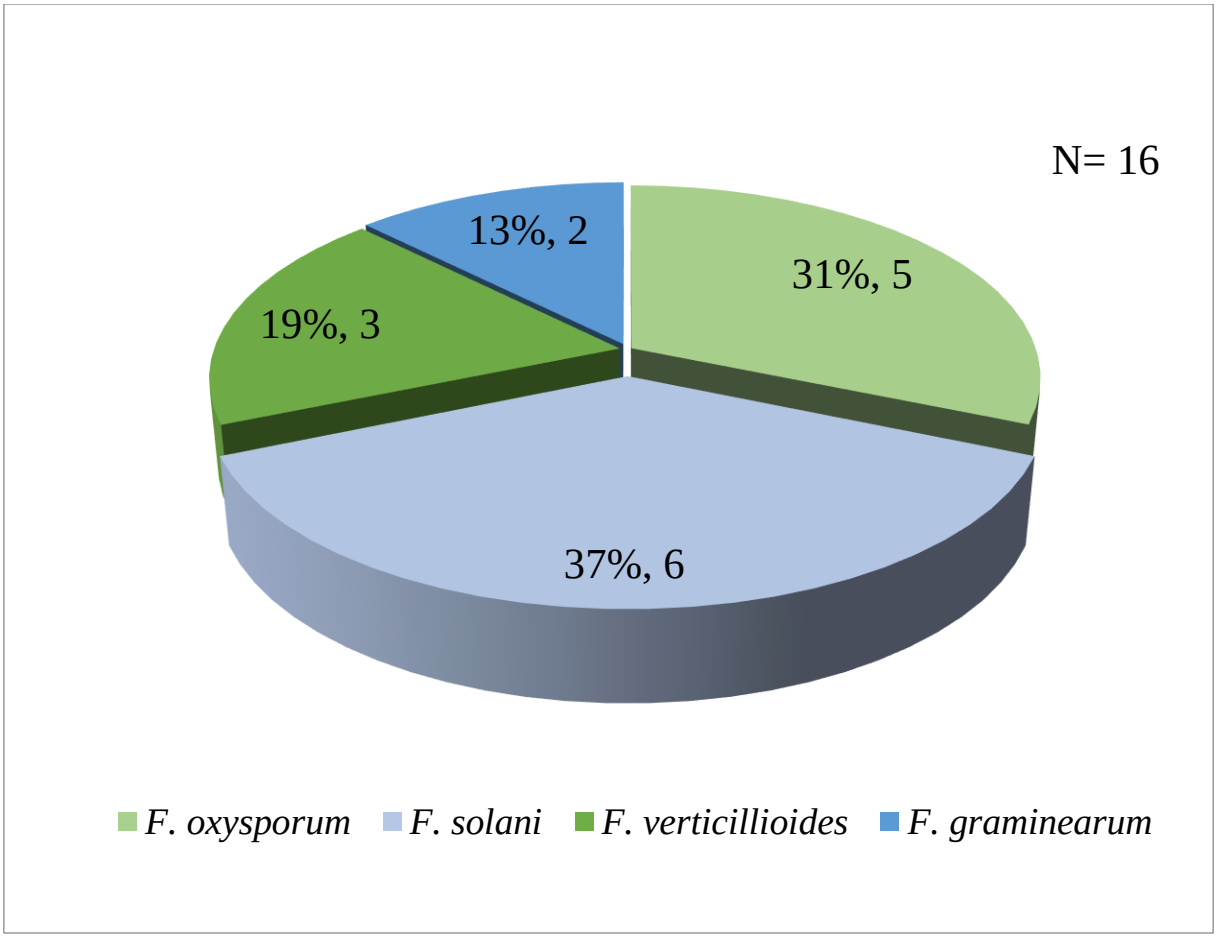


Gráfico 9.4: Frecuencia de especies de *Fusarium*, del total de muestras recolectadas

A continuación en el gráfico 9.5 se pueden observar las especies aisladas del género *Aspergillus*, el hábitat natural de este género es el suelo donde sobrevive y se desarrolla sobre materia en descomposición, es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente. Es un hongo que comúnmente ataca al maíz tanto en campo como en almacén, y es un productor potencial de micotoxinas, este género produce aflatoxinas. *Aspergillus flavus* (57%) fue la especie que presentó un mayor número de aislamientos, el grano de maíz posee una microbiota particular de bacterias, insectos y hongos que pueden causarle daños, las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* (la cual no fue aislada en el laboratorio) son las más importantes porque producen aflatoxinas que provocan gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos al grano contaminado, cabe notar que la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de la cepa, no de la especie. (Martínez *et al.*, 2013). *Aspergillus glaucus* fue la segunda especie con mayor número de aislamientos (36%), seguido de *Aspergillus fumigatus* (7%), la cual es una especie

frecuentemente aislada debido a que puede crecer a temperaturas de 12 a 45 ^{0}C y puede desarrollarse a un mínimo de agua. (Arias y Piñeros, 2008).

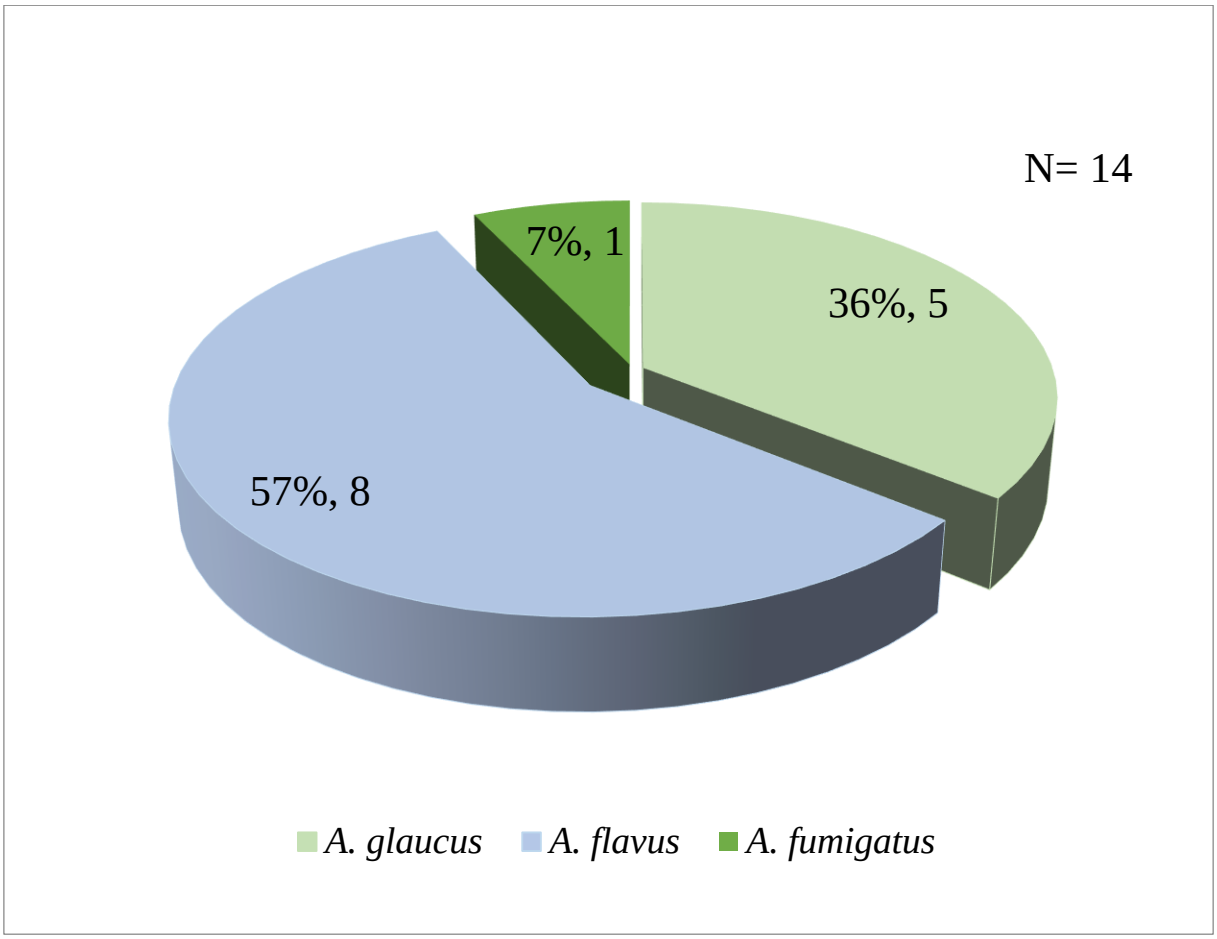


Gráfico 9.5: Frecuencia de especies de *Aspergillus*, del total de muestras recolectadas

El número de especies aisladas pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* se puede observar en el gráfico 9.6, *A. flavus* y *F. solani* son las especies que presentan un mayor número de aislamientos, mientras que, *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *A. fumigatus* presentan menor número de aislamientos.

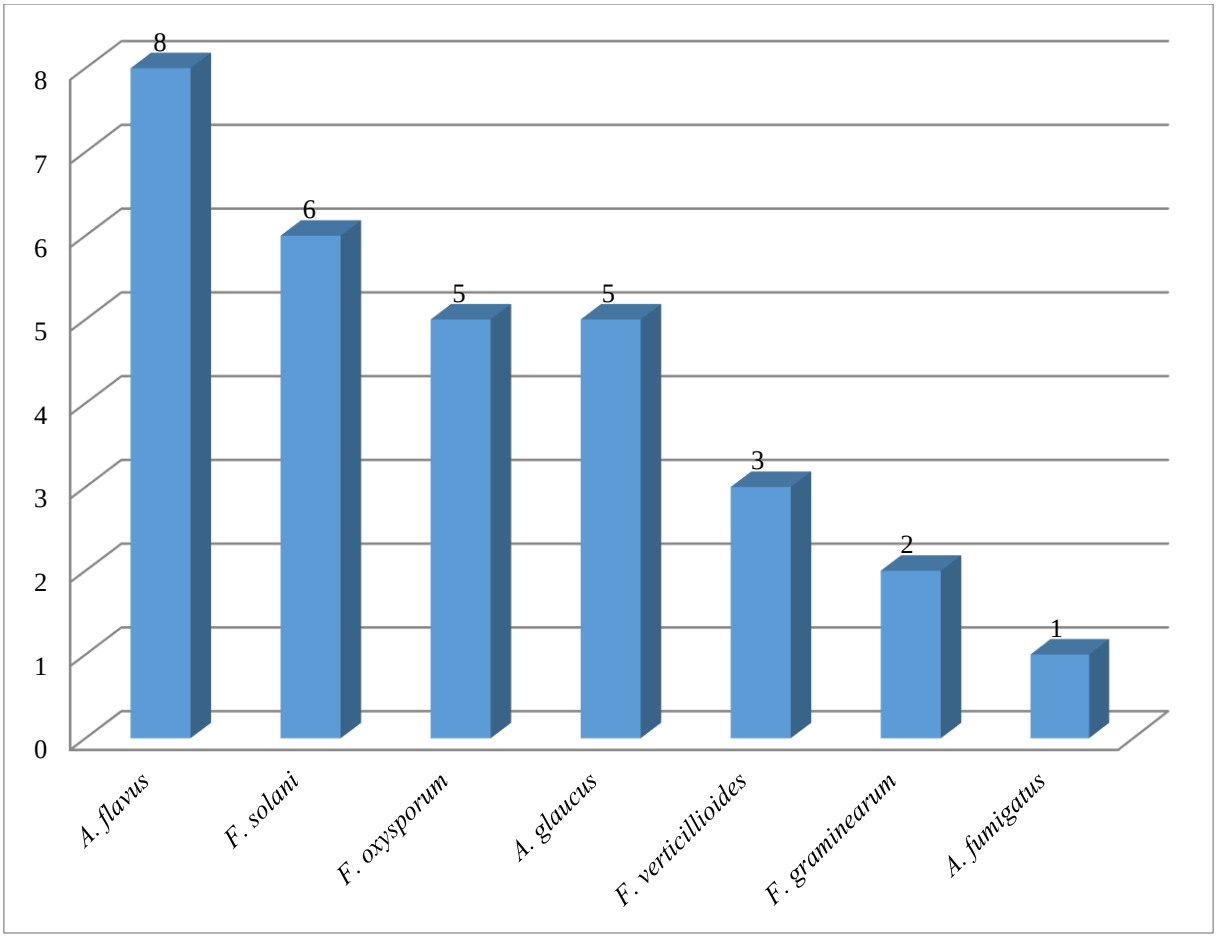


Gráfico 9.6: Número total de especies aisladas, en suelos agrícolas y silos de maíz de almacén a la intemperie

En las tablas 9.5 y 9.6 se resume el total de especies aisladas en suelos agrícolas y en silos de maíz de un almacén concentrador a la intemperie, pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*, respectivamente.

Tabla 9.5: Especies aisladas de *Fusarium* y lugar de aislamiento

Especies	Aislamientos	AIM	SA
F. oxysporum	5	5	0
F. solani	6	2	4
F. verticillioides	3	3	0
F. graminearum	2	1	1

AIM (almacén a la intemperie de maíz) y SA (suelos agrícolas)

Tabla 9.6: Especies aisladas de *Aspergillus* y lugar de aislamiento

Especies	Total de aislamientos	AIM	SA
A. glaucus	5	5	0
A. flavus	8	5	3
A. fumigatus	1	0	1

AIM (almacén a la intemperie de maíz) y SA (suelos agrícolas)

En el presente trabajo se aislaron cepas que podrían estar o no estar implicadas en la producción de micotoxinas, y a su vez, ser patógenas para humanos. Debido al tiempo, durante la realización de este trabajo no pudimos concluir si las cepas que se aislaron en laboratorio son productoras de micotoxinas, ya que, la producción de micotoxinas depende no solo del genotipo de la cepa, sino también de toda una serie de factores ambientales que van a ejercer su influencia en el crecimiento y metabolismo de la cepa. (Castrillo *et al*., 2013). Pero, en la tabla 9.7 se muestran las especies que fueron aisladas en el laboratorio y que podrían estar relacionadas con la producción de micotoxinas, estos datos son reportados por Abrunhosa y col. 2012, asi como por la FAO y la OMS en 2012.

Abrunhosa y col. 2012, mencionan que la toxicidad depende en gran medida de las cantidades ingeridas, del tiempo de exposición y de las posibles sinergias que pueden derivarse de la ingestión de micotoxinas diferentes al mismo tiempo. Se sabe también que diferentes especies tienen distintas sensibilidades a las micotoxinas y que, por lo general, la edad de las personas, el sexo y su estado fisiológico son cruciales en su nivel de toxicidad. Las micotoxinas producidas pueden ser carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas, inmunosupresoras y estrogénica.

Tabla 9.7: Especies aisladas y micotoxinas que pueden llegar a producir

ESPECIES AISLADAS	MICOTOXINAS QUE PUEDEN LLEGAR A PRODUCIR
Fusarium oxysporum	MON, EN, BEA, FB, FUP, DAS, FUS
Fusarium verticillioides	FB1, FB2, FB3, FUP, BEA, MON, FUS
Fusarium graminearum	DON, ZEA, NIV, FUS
Fusarium solani	MON, FUS
Aspergillus flavus	AF
Aspergillus fumigatus	Gliotoxina

AF (aflatoxinas), BEA (beauvericina), DAS (diacetoxiscirpenol), DON (deoxinivalenol), EN (enantinas), FB (fumonisinas), FUP (fusaproliferina), FUS (fusarenona-X), MON (moniliformina), NIV (Nivalenol), ZEA (Zearalenona)

Fusarium graminearum es un hongo que puede provocar alteración en la salud del ser humano, dentro de las toxinas que produce está la toxina Deoxinivalenol; la FAO y la OMS en 2012 mencionan que se han registrado intoxicación de personas asociada al consumo de cereales (trigo, cebada, maíz) contaminados por tricotecenos como Deoxinivalenol. La sintomatología que se observa es la siguiente: náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza y vértigo; mientras que, Kos y col. 2014 reportan que la toxina Deoxinivalenol puede tener un impacto negativo en las células hematológicas, manifestándose principalmente como trombocitopenia y leucopenia. Los datos mencionados anteriormente corroboran que *Fusarium graminearum* puede ser una especie patógena para humanos.

De acuerdo a Martínez y col. 2014, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* son los causantes más frecuentes de onicomicosis y la enfermedad diseminada. Theumer y col. 2012, mencionan que la fumonisina B1 es sintetizada principalmente por *F. verticillioides* en humanos, esto muestra una fuerte correlación entre el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas y las altas incidencias de cáncer de hígado y esófago.

La aspergilosis pulmonar es la infección micótica del pulmón más frecuente y devastadora como oportunismo reemergente y es causada por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* de acuerdo a Gassiot y col. 2000. Cabe recalcar que, la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de la cepa y no de la especie.

10. CONCLUSIONES.

1. Se aislaron en suelos agrícolas de haba, lechuga y maíz; asi como, en muestras de maíz recolectadas de silos de maíz de un almacén a la intemperie concentrador de varias parcelas, a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*.

2. El género *Fusarium* tuvo una frecuencia del 32%, mientras que, *Aspergillus* del 28%.

3. Se aislaron un total de 7 especies pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Aspergillus*: *Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Fusarium verticillioides, Fusarium graminearum, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus* y *A. glaucus*.

4. Otros géneros aislados fueron: *Penicillium, Alternaria, Trichothecium, Chrysosporium* y *Scopulariopsis.*

11. EXPECTATIVAS.

- Mediante técnicas moleculares determinar si las cepas aisladas son productoras de micotoxinas.

- Determinar mediante técnicas especializadas la concentración de micotoxinas, si es que llegaran a producir las cepas que se aislaron en el presente trabajo.

- Determinar cuáles de las cepas que se aislaron en este trabajo, pueden llegar a ser patógenas para humanos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abarca, L. (2000). *Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial.* Revista Iberoamericana de Micología, **17**: 79-84.
2. Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Villa-Chã, A. S., Pereira, M. & Venâncio, A. (2012). *Micotoxinas detectadas en productos alimenticios en Portugal: Revisión*. Revista Bio Ciencias, **2** (1): 5-31.
3. Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T. & Bouza, E. *Aspergillus y aspergilosis*. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañon. Madrid
4. Alcázar, J. C. (2010). *Manual básico: producción de hortalizas.* Pesa México, FAO, SAGARPA. México, 30.
5. Arias, E. L. & Piñeros, P. A. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde.* (Tesis de Licenciatura). Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá.
6. Arrúa, A. A., Quezada, M. Y., Vazquez, M. E. & Flores, A. (2012). *Incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en maíz (Zea mays L.) de diferentes orígenes geográficos en México*. Fitosanidad, **16** (1): 49-50
7. Arrúa, A. A., Martínez, E. M., Quezada, M. Y., Lara, J. M., Vázquez, M. E. & Flores, A. (2012). *Aspergillus aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, **3** (4): 1047-1052.
8. Bolívar, M. (2007). *Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención.* Archivos Latinoamericanos de Producción animal, **15**: 180-184.
9. Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P. & Backhouse, D. (1994). *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3ª Ed. Sydney: University of Sydney.
10. Carrillo, L. (2003). *Hongos de los alimentos y forrajes.* Universidad Nacional de Salta. Argentina, 130.
11. Castrillo, M. L., Horianski, M. A. & Jerke G. (2013). *Aislamiento de cepas de Aspergillus sección Nigri en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico.* Revista Argentina de Microbiología, **45** (2):110-113

12. Chávez, A. & Kohli, M. (2013*). Identificación de hongos presentes en la punta negra de trigo.* Investigación Agraria, **15** (2): 133-137.
13. CONACYT. (2014). *Maíz.* CIBIOGEM Sitio web: http://www.conacyt.mx/cibiogem/index.php/maiz
14. De la Torre, M. E., Sánchez, D., Galeana, E. & Placencia, J. (2014*). Fumonisinas-síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-Maíz.* Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. **17** (1):77-91.
15. Dona, F.(2010). *Fusarium especie*. Revista chilena de infectología, **27** (4): 327-328.
16. Dokuzeylul, B., Basaran, B., Sigirci, B. D., Gulluoglu, E., Metiner, K. & Or, M. E. (2013). *Dermatophytosis caused by a Chrysosporium species in two cats in Turkey: a case report*. Veterinarni Medicina. **58** (12): 633–636.
17. Figueroa, M. G., Rodríguez, R., Guerrero, B. Z., González, M. M., Pons, J. L., Jiménez t, J. F., Ramírez, J. G., Andrio, E. & Mendoza, 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.
18. Gallardo, E. D., Ibarra, G. M. & Sánchez, R. I. (2006). *Micobiota de maíz (Zea mayz L.) recién cosechado y producción de fumonisinas B1 por cepas de Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenb*. Revista Mexicana de Fitopatología. **24** (1): 27-34.
19. García, G. & Martínez, R. (2010). *Especies de Fusarium en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla.* Revista Mexicana de Biodiversidad, **81**: 15-20.
20. Gassiot, C., Pino, P. P., Rodríguez, J. C., Ramos, M. M., Páez, I. & Gundián, J. (2000). *Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia.* Acta Médica. **9** (1-2): 67-72.
21. Giri, B., Houng, P., Kumari, R., Prasad, R. & Varma, A. (2005). *Microbial Diversity in Soils.* Soil Biology, **3**:19-55.
22. Guadarrama, A., Escalante, J. A., Rodríguez, M. T., Sánchez, P. & Sandoval, E. (2007). *Biomasa, proteína, taninos y rendimiento en haba en función del nitrógeno.* Terra Latinoamericana, **25** (2): 169-175.
23. Hernández, S., Reyes, M. A., García, J. G. & Mayec, N. (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.

24. Kos, J., Hajnal, E. J., Škrinjar, M., Mišan, A., Mandić, A., Jovanov, P. & Milovanović I. (2014). *Presence of Fusarium toxins in maize from Autonomous Province of Vojvodina, Serbia.* Food Control, **46**: 98-101.
25. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. 1ª Ed. USA: Blackwell Publishing.
26. López, R., Méndez, L. J., Hernández, F. & Castañón, L. R. (2012). *Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.* 2ª Ed. México: Trillas.
27. Martínez, E., Barrios, G., Rovesti, L. y Santos, R. (2006). *Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico.* Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba.
28. Martínez, H. Y., Hernández, S., Reyes, C. A. & Vázquez, G. (2013). *El Género Aspergillus y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas.* Revista Mexicana de Fitopatología, **31** (2): 126-146.
29. Martínez, L., Caro, C. H. & Bonifaz, A. (2014). *Infecciones por Fusarium.* Dermatología Revista Mexicana, **58**: 432-442.
30. Martínez, H. Y., Hernández, S., Reyes, C. A. & Vázquez G. (2013). *El Género Aspergillus y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas.* Revista Mexicana de Fitopatología. **31** (2): 126-146.
31. Moreira, F., Huising, E. J. & Bignell, D. E. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo.* Instituto Nacional de Ecología. México, 337.
32. Moya, H. J. (2015). *Manejo fitosanitario para el cultivo de hortalizas.* Instituto Agropecuario Colombiano, 13-14.
33. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) & Organización Mundial de la Salud (OMS). (2012). *Comisión del CODEX Alimentarius*. Comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos. Maastricht, Países Bajos.
34. Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R. & Violic, A. D. (2001). *Enfermedades del maíz.* El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Sitio web: http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc
35. Plasencia, J. (2004). *Aflatoxins in maize: a Mexican perspective*. Journal of Toxicology, **23**: 155-177.
36. Rodríguez, M. d. P. (2001). *Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México.* Acta Zoológica Mexicana (nueva serie), 53-78.

37. SAGARPA Tlaxcala. (2009). *Síntesis del Sector Agropecuario de Tlaxcala*. Dirección General de Estudios Agropecuarios y Pesqueros. México, Tlaxcala.
38. SAGARPA Puebla. (2009). *Síntesis del Sector Agropecuario del Estado de Puebla.* Dirección General de Estudios Agropecuarios y Pesqueros. México, Puebla.
39. SIAP. (2014). *El maíz una planta femenina y masculina*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sitio web: http://www.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/2/03-maiz/contexto-3.html
40. SIAP. (2015). *Maíz GM.* AgroBioMéxico Sitio web: http://www.agrobiomexico.org.mx/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=95&Itemid=29
41. Soriano, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos.* 1ª Ed. España: Ediciones Díaz de Santos.
42. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Briden, W. L. & Burgués, L. W. (2001). *Fusarium.* American Phytopathological Society Press. Minessota, EEUU., 408.
43. Theumer, M., Mary. V., Arias, S. & Rubinstein, H. (2012). *Mecanismos de toxicidad de fumonisina B1 en células animales y vegetales.* Revista Bio Ciencias. **2** (1): 32-44.
44. Trigos, A., Ramírez, K. & Salinas, A. (2008). *Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria.* Revista Mexicana de Micología, **28**: 125-129.
45. Valencia, M. F. (2009). *Caracterización enzimática de cepas de Fusarium aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas.* (Tesis de Licenciatura). Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá.
46. Valladares, C. A. (2010). *Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano*. Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Departamento de producción vegetal sección cultivos de grano apv 350. Sitio web: https://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/unidad-ii-taxonomia-botanica-y-fisiologia-de-los-cultivos-de-grano-agosto-2010.pdf

APÉNDICES. INFORMACIÓN ADICIONAL.

Apéndice 1. Técnica de preparación del Agar Borelli.

El agar Borelli es un método conveniente para la identificación de dermatofitos previamente cultivados en medios como Sabouraud. La observación de esporulación y pigmentación durante el aislamiento de hongos se puede observar con este medio, que también permite la identificación de especies.

Técnica de preparación del Agar Borelli para 25 ml

- Harina de Trigo 0.35g
- Leche en polvo 0.35g
- Miel de abeja 0.175g
- Agar bacteriológico 0.35g
- Agua 25ml

Apéndice 2. Técnica de tinción azul de algodón-lactofenol.

Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que perite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas. La técnica consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos y, sobre ella, colocar un fragmento pequeño del cultivo por estudiar, se coloca un cubreobjetos sobre la preparación, para fijar la muestra es necesario sellarla con barniz transparente y se procede a la observación de la misma. (López *et al.*, 2012).

Fórmula del colorante:

- Ácido láctico 20 g
- Glicerina 40 g
- Fenol de cristales 20g
- Azul de algodón al 1% 2 ml
- Agua destilada 20 ml