

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS TOXIGÉNICAS DEL GÉNERO  
*Fusarium* MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**TESIS DOCTORAL**

Eyder Daniel Gómez López  
Valencia, 2008





UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA



---

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**  
**Área de Microbiología**

**Dña. ROSA MARÍA MONTES ESTELLÉS**, Profesora Titular de Universidad y **D. GONZALO CUESTA AMAT**, Profesor Contratado Doctor, pertenecientes al Departamento de Biotecnología – Área Microbiología – de la Universidad Politécnica de Valencia,

**CERTIFICAN:** Que la tesis doctoral titulada “**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS TOXIGÉNICAS DEL GÉNERO *Fusarium* MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**”, que presenta Eyder Daniel Gómez López para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo, ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia bajo nuestra dirección, reúne los requisitos adecuados para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado, Valencia, de Junio de 2008

Fdo.: Dña. Rosa M<sup>a</sup> Montes Estellés

Fdo.: D. Gonzalo Cuesta Amat



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida del siguiente Proyecto de Investigación:

**PREVENCION Y CONTROL DE MICOTOXINAS EMERGENTES EN CEREALES,  
FRUTAS Y DERIVADOS. Ministerio de Ciencia y Tecnología. AGL2004-07549-  
C05-04. Diciembre 2004- Diciembre2007**



*A Marina Sánchez y Nancy Barrera M.  
Por enseñarme a volar y no volar en mi vuelo.*

*A mis padres Adolfo y Elba María  
mis hermanos y sobrinos*



## Agradecimientos

Son muchas cosas las que te pasan por la mente cuando emprendes un viaje a un país que no es el tuyo, a comenzar con una nueva etapa en tu vida, todos los sentimientos se mezclan y estás entre la alegría y la nostalgia, después de un tiempo las cosas se van tornando de otro color, como dice el poema de Jorge Luis Borges, uno aprende que realmente puede aguantar, que uno realmente es fuerte, que uno realmente vale, y uno aprende y aprende y con cada día uno aprende. Es por ello que quiero expresar mi agradecimiento mezclando sin ningún respeto, advierto, lo profesional con lo personal a las personas que más han influido en mí en este período; en este país que no me ha costado nada quererlo.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Montes quien me brindó la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de microbiología, *por su comprensión, paciencia y soportarme durante la escritura de esta tesis*. Y como no, al Dr. Gonzalo Cuesta Amat por su apoyo incondicional en los momentos más críticos de mi vida, tanto en lo académico como en lo personal, *no tengo palabras para agradecer todo lo que hiciste por mí, un millón de gracias. Si existe el cielo, sin duda hay un sitio para vosotros en él*.

A la Dra. María Antonia Ferrús, a quien le tengo una gran admiración tanto profesional como personal, *cuando se me vino el mundo encima, consiguió con sus palabras que no perdiera mi cabeza y poder tener un poco de lucidez en mis decisiones, que a mi parecer fueron las más acertadas, por eso y mil cosas más, gracias*.

Qué decir del Dr. Enrique Hernández, todo un profesor en el sentido estricto de la palabra, siempre con su apoyo y buena voluntad. A Dr. Luis Roig, director del departamento, por su constante disposición. A Dr. Javier Hernández, siempre muy afable conmigo, al Dr. Manuel Hernández “Manolo” por darme ánimo constantemente. A Dra. Salut Botella por muchas cosas, entre ellas enseñarme un “poquet” de valenciano, a la Dra. Ana Jiménez compañera de despacho por un tiempo y por los “dulces”, a la Dra. María Ángeles Castillo por ser como es, una buena persona, a la Dra. Yolanda Moreno, dispuesta a darme una mano siempre con una sonrisa, a la Dra. Ana González la que más y mucho más, a la Dra. M<sup>a</sup> Carmen, compañera en mis primeros inicios de mi doctorado, a Rosa Garrido ¡qué buena eres!, siempre queriendo hacerte sentir bien, al Dr. Ramón Segarra por haber colaborado con su sapiencia en lo que respecta a cromatografía, y por supuesto a Nancy Serra, *tu paciencia y colaboración en el laboratorio fueron claves*, a Claudia Milena *por darme ánimo y poder cotillear un poco* y, al Dr. Rafael Sirera, el último en llegar hasta el momento a microbiología por compartir momentos cotidianos.

A mis “chicas del maíz” Sonia Marcos, Paula David, María Tortosa, por ser tan currantes, *sin vosotras no hubiera sido posible este trabajo*, como también a Laura Martí y a Carmen Montalvà, mil y mil gracias. A los del CAMA, Irene, Jorge, Patricia, Teresa, Domingo, gracias por compartir nuestros agobios y uno que otro café, y a los de microbiología, Liliana, Gloria, Raquel, Ferran, Adriana, Laura, Jordi, Albert, Myriam, Rocío, *¡chicos sin vosotros nada habría sido igual!. ....Y como sabemos que “de cualquier valla sale un ratón cualquiera,” como olvidarlo, si estaba en toda parte*.

A Liliana, Josep, Ivano, David, Irache, Rosita, Derek, Ralf, por hacerme pasar momentos inolvidables, los recordare por siempre.

¡Bueno! a la peña del bar: Marina, Pepe, Rubiela, Juanita, Manolo, Enna, Rafael, gracias por tenerme en cuenta en todo acontecimiento.

A Gildardo, Sneider y Pablo “familia Tigreros Rodríguez”, al primero por ser mi compañero de trabajo y haberme dado la oportunidad de recorrer por decir algo, toda la geografía española, *¿cuantos kilómetros hemos recorrido? ....muchísimos*; gracias a ello mi economía no se vino a pique. A él, su esposa e hijo mi eterna gratitud.

A Carmen Rosa, Nelson y Rosita, Martín, María Elena, Marcela, Noralba, Marzory, Gloria “la negra”, Nubia, Dra. Francia, mis amigos de Colombia por estar siempre pendientes de mí, cosa que se agradece cuando se está lejos.

A Ester Julia Lloreda, Yesid Carvajal, Alexander Roa, mis primeros compañeros de piso, gracias por abrirme las puertas de su hogar. A mi prima Lucelly por ser mi apoyo familiar más cercano aquí en el otro lado del charco. A Yolanda Beltrán y Zulma Salazar por estar siempre allí, muy pendientes.

A Nubia Murcia mi compañera de piso por tantos años, casi toda mi estancia, *fue para mí un placer compartir contigo, siento que te tragaras todos mis agobios y por haberme soportado durante mi estado predoctoral.*

A Jorge y Gloria toda mi gratitud, son y serán mis hermanos adoptivos o más que eso, fueron muchos los momentos compartidos, estoy seguro que no se me olvidaran. A mi nuevo sobrino Felipe y a Orión.

A mi maestra, Marina Sánchez por creer siempre en mí y a Nancy Barrera por apoyarme en todo, no en vano comparten la dedicatoria de esta tesis con mi familia.

Ya casi al final (*pero ustedes saben que no son los últimos*) los amigos de fuera del laboratorio: del lado de caminos y otros lares, a los que les adeudo la paciencia, mis espinas agudas, los arrebatos de humor, la negligencia, las vanidades, los temores y las dudas: Alba, Ángel, Claudia, Delba, Diana Lucia, Chiara (*la que más me soportó, gracias*), Miquel, Ángela, José; pero oye, *muchas bodeguitas conocimos, ¿eh? y lo bien que la pasamos.*

A mis hermanos, Julio, Adolfo, Gloria Damaris, mis cuñadas Graciela y Dorian y sobrinos Paola, Yaneth, Julián, Adolfo y Daniel, y como olvidar a Lucila, porque fueron ellos los que estuvieron pendientes durante mi tiempo de ausencia de los seres que más amo en este mundo, mis padres, para cumplir mis metas y a ellos por comprender que el mundo ya es pequeño, que las distancias ya no son tan largas y que yo regreso, si Dios lo quiere.

A todos lo que hicieron posible que esta tesis llegara a su final que su Dios y mi Dios los proteja, siempre deseándoles Paz y Bien.

# ÍNDICE DE MATERIAS

---



ÍNDICE DE MATERIAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	XIII
RESUMEN	XV
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. REVISIÓN HISTÓRICA DE <i>Fusarium</i> spp.	3
1.1. Situación taxonomía actual del género <i>Fusarium</i>	7
1.2. El concepto de especie en hongos	11
1.3. Especies de <i>Fusarium</i>	12
1.3.1. <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (Telemorfo <i>Gibberella zeae</i> )	12
1.3.2. <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg. (Telemorfo <i>Gibberella moniliformis</i> (Wineland))	13
1.3.3. <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo	15
1.3.4. <i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg. (Telemorfo <i>Gibberella intermedia</i> (Kuhlman))	15
1.3.5. <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo	16
1.3.6. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl emend. Snyder and Hansen	16
2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN	17
2.1. Identificación y caracterización de las especies del género <i>Fusarium</i>	17
2.2. Estructuras que se tienen en cuenta para la identificación morfológica en especies del género <i>Fusarium</i>	18
2.3. Técnicas fisiológicas y bioquímicas	21
2.3.1. Metabolitos secundarios	21
2.3.2. Ubiquinonas (coenzima Q)	22
2.3.3. Composición de ácidos grasos	22
2.3.4. Composición de la pared de celular	23
2.3.5. Composición proteica	23

## Índice de materias

---

3. TÉCNICAS MOLECULARES	23
3.1. ADN ribosómico	24
3.1.1. Región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) y Región Espaciadora Intergénica IGS	25
3.1.2. Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP))	27
3.1.3. Secuenciación de nucleótidos	29
4. MICOTOXINAS	30
4.1. Historia de la Micotoxicosis	30
5. MICOTOXINAS MÁS FRECUENTES PRODUCIDAS POR <i>Fusarium</i> spp.	32
5.1. Tricotecenos	32
5.1.1. Estructura química de los tricotecenos	34
5.1.2. Propiedades físico-químicas de los tricotecenos	35
5.1.3. Toxicidad de los Tricotecenos	36
5.1.4. Deoxinivalenol (DON)	36
5.1.5. Nivalenol (NIV)	39
5.1.6. 3-Acetildeoxinivalenol (3-AcDON)	40
5.1.7. 15-Acetildeoxinivalenol (15-AcDON)	41
5.1.8. Fusarenon X (FUS X)	41
5.1.9. Neosolaniol (NEO)	41
6. BIOSÍNTESIS DE TRICOTECENOS	42
6.1. Genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos (Genes <i>Tri</i> )	43
6.2. Especies micotoxigénicas de <i>Fusarium</i>	45
7. FACTORES DETERMINANTES EN LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS POR HONGOS DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	48
7.1. Actividad del agua ( $a_w$ ) y contenido de agua	48
7.2. Temperatura	49
7.3. pH	49
7.4. Niveles de oxígeno (O <sub>2</sub> ) y dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	50
7.5. Composición del sustrato	50
7.6. Interacción con otros microorganismos	51
7.7. Insectos	51

8. ANÁLISIS DE MICOTOXINAS	52
8.1. Métodos químicos	52
8.1.1. Muestreo	52
8.1.2. Extracción	53
8.1.3. Purificación	53
8.1.4. Técnicas cromatográficas	54
8.1.5. Detección y cuantificación	54
8.1.6. Métodos cromatográficos	54
<b>II. OBJETIVOS</b>	59
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b>	63
1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Fusarium</i> spp., PROCEDENTES DE MAÍZ	63
1.1. Procedencia de las Muestras de maíz	63
1.2. Medios de cultivo	64
1.3. Obtención de aislados de <i>Fusarium</i> spp.	64
1.4. Cultivo puro de hongos pertenecientes al género <i>Fusarium</i> , identificación y conservación	66
1.4.1. Nomenclatura de las placas	66
1.5. Cepas de referencia	67
2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL ADN DE <i>Fusarium</i> .: Método CTAB	68
2.1. Preparación de los aislados para la extracción de ADN	68
2.1.1. Procedimiento	68
2.1.2. Detección del ADN por electroforesis y visualización del producto de PCR	69
2.1.3. Conservación del ADN	70
3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ( PCR)	70
3.1. Preparación del ADN	70
3.2. Oligonucleótidos sintéticos	70
3.3. PCR para el género <i>Fusarium</i>	70
3.4. PCR para <i>F. graminearum</i>	71
3.5. PCR para <i>F. verticillioides</i>	72
3.6. PCR para <i>F. culmorum</i>	73
3.7. PCR para <i>F. oxysporum</i>	73
3.8. PCR múltiple para <i>Fusarium</i> spp.	74
3.9. PCR para detección de aislados productores de tricotecenos	74

## Índice de materias

---

3.10. PCR para detección de aislados de <i>Fusarium</i> spp., productores de deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV)	77
3.11. PCR para amplificación de la región IGS	77
3.12. PCR para amplificación de la región ITS1- 5.8S – ITS2 y posterior secuenciación	78
3.13. Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP) de la región IGS.	78
4. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DE LA REGIÓN ITS1- 5.8S – ITS2	79
5. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS: Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, 15-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X y Nivalenol	80
5.1. Extracción y purificación	82
5.2. Derivatización de las micotoxinas	82
5.3. Determinación de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol, por cromatografía de gases con detector de masas	83
5.3.1. Condiciones del cromatógrafo y del detector de masas	83
5.3.2. Cuantificación de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol por patrón interno	84
5.4. Estudio de los parámetros analíticos del método	85
5.4.1. Intervalo de linealidad	85
5.4.2. Límite de cuantificación o determinación	86
5.4.3. Exactitud y precisión del método: ensayos de fortificación y recuperación de micotoxina	87
<b>IV. RESULTADOS</b>	93
1. CONTAMINACIÓN FÚNGICA DE LOS GRANOS DE MAÍZ	93
1.1. Maíz almacén	93
1.2. Maíz campo	96
1.3. Maíz experimental	103
1.3.1. Comparación de <i>Fusarium</i> spp. respecto a la microbiota fúngica total, según la variedad de maíz	104
1.3.2. Comparación de <i>Fusarium</i> spp. respecto a la microbiota fúngica total, según los medios de cultivo	108
2. AISLADOS DE HONGOS DEL GÉNERO <i>Fusarium</i> DE GRANOS DE MAÍZ	109

3. IDENTIFICACIÓN POR PCR	109
3.1. Identificación del género <i>Fusarium</i>	109
3.2. Identificación a nivel de especie	110
3.2.1. PCR para <i>F. graminearum</i>	110
3.2.2. PCR para <i>F. verticillioides</i>	111
3.2.3. PCR para <i>F. culmorum</i>	112
3.2.4. PCR para <i>F. oxysporum</i>	112
3.2.5. PCR múltiple	113
4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS POR SECUENCIACIÓN	114
5. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD EN LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN AMPLIFICADOS POR PCR (PCR-RFLP) DE AISLADOS DE <i>Fusarium</i> spp., DE GRANOS DE MAÍZ	120
6. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>Fusarium</i> spp., PRODUCTORES DE TRICOTECENOS	131
7. COMPROBACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol Y Nivalenol EN AISLADOS DEL COMPLEJO <i>F. graminearum</i> POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE MASAS.	135
7.1. Presencia de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol, en los medios de cultivo PDA, Czapeck y YES	136
<b>V. DISCUSIÓN</b>	149
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	165
<b>VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA</b>	169
<b>ANEJOS</b>	189



Figura 1.	Región Espaciadora intergénica IGS y Región Transcritora Interna (ITS)	26
Figura 2.	Estructura química de los tricotecenos tipo A y B	34
Figura 3.	Metabolismo de DON en el sistema digestivo	38
Figura 4.	Biosíntesis de tricodéina	43
Figura 5.	Genes <i>Tri</i> implicados en la producción de Tricotecenos	44
Figura 6.	Toxinas producidas por hongos del género <i>Fusarium</i>	47
Figura 7.	Porcentaje de cada género fúngico obtenidos de maíz almacén en los medios de cultivo PDA-CL y AVM	94
Figura 8.	Porcentajes para cada género fúngico de maíz campo obtenidos en medio PDA-CI	97
Figura 9.	Distribución en porcentaje de la contaminación fúngica según el medio de cultivo, para granos de maíz campo	98
Figura 10.	Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de <i>Fusarium</i> aislado de maíz campo en los medios de cultivos	99
Figura 11.	Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de hongos no pertenecientes al género <i>Fusarium</i> , aislado de maíz campo en los medios cultivo PDA-CL y AVM	99
Figura 12.	Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de <i>Fusarium</i> para las Comunidades Autónomas	103
Figura 13.	Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de hongos no <i>Fusarium</i> para las Comunidades Autónomas	103
Figura 14.	Gráfico de medias de <i>Fusarium</i> spp., según la variedad de maíz	107
Figura 15.	Gráfico de medias de otros hongos según la variedad de maíz	107
Figura 16.	Gráfico de medias de <i>Fusarium</i> spp., según medios de cultivo	108
Figura 17.	Gráfico de medias de otros hongos según medios de cultivo	108
Figura 18.	Árbol filogenético relacionando las secuencias ITS de los diferentes aislados de <i>F. graminearum</i>	117
Figura 19.	Árbol filogenético relacionando las secuencias ITS de los aislados de <i>G. moniliformis</i> ( <i>F. verticillioides</i> ), <i>F. equiseti</i> y <i>F. Proliferatum</i>	118
Figura 20.	Dendrograma de similitud obtenido por UPGMA, utilizando las enzimas de restricción <i>Mbo I</i> , <i>Xho I</i> , <i>Eco RI</i> , <i>Hin6 I</i> , <i>Hha I</i> , <i>Alu I</i> , <i>Bsu RI</i> , <i>Hind III</i> , <i>HaeIII</i> , en los 18 aislados pertenecientes al complejo <i>F. graminearum</i> . y <i>F. graminearum</i> 2150 de CECT	124
Figura 21.	Dendrograma de similitud de los aislados pertenecientes a <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. equiseti</i> y <i>Fusarium</i> sp., procedentes de granos de maíz y cepas de referencia CECT2982, CECT2715, CECT2150, en base a sus perfiles génicos de amplificación	129
Figura 22.	Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de los aislados <i>F. verticillioides</i> procedentes de maíz campo, maíz almacén y maíz experimental y cepa de referencia CECT 2982	130
Figura 23.	Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de los aislados de <i>F. verticillioides</i> procedentes de maíz almacén y cepa de referencia CECT 2982	132
Figura 24.	Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de <i>F. verticillioides</i> procedentes de maíz campo y cepa de referencia CECT 2982	132

## Índice de figuras

---

Figura 25.	Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de <i>F. verticillioides</i> procedentes de maíz experimental y cepa de referencia CECT 2982	133
Figura 26.	Dendrograma generado con 36 aislados de <i>Fusarium spp.</i> , procedentes de maíz, por análisis de restricción de la región IGS y cepa de referencia CECT 2982	134
Figura 27.	Cromatograma de iones totales de patrón 4 ppm	143
Figura 28.	Cromatograma de iones totales de la muestra P2.9.3(2) en medio de cultivo PDA	144
Figura 29.	Cromatograma de iones cuantitativo y cualitativo de DON (parte superior) y espectro de iones al tiempo de retención de DON (parte inferior) en la muestra P2.9.3(2) en PDA a los 21 días	144
Figura 30.	Cromatograma de iones totales del aislado V.5.1.1(1) Neo: neosolaniol (patrón interno); DON: deoxinivlenol; 15-AcDON	145
Figura 31.	Cromatograma de iones cuantitativo y cualitativo de 15-AcDON (parte superior) y espectro de iones al tiempo de retención 15-AcDON (parte inferior) del aislado V.5.1.1(1)	145

Tabla 1.	Eventos relevantes en la investigación de <i>Fusarium</i> spp. (1809-2007)	8
Tabla 2.	Estructuras químicas de los sustituyentes R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> y R <sub>5</sub> de los tricotecenos Tipo A y Tipo B	35
Tabla 3.	Micotoxinas producidas por especies del género <i>Fusarium</i>	46
Tabla 4.	Variedad y origen de las muestras de maíz almacén	64
Tabla 5.	Procedencia de las muestras analizadas de maíz campo	65
Tabla 6.	Cepas de referencia	67
Tabla 7.	Oligonucleótidos utilizados en este estudio	75
Tabla 8.	Condiciones de temperatura para las reacciones de amplificación	76
Tabla 9.	Tiempos de retención e iones característicos de las micotoxinas	86
Tabla 10.	Número de granos de maíz almacén contaminados por hongos en los dos medios de cultivo utilizados PDA-CI y AVM	94
Tabla 11.	Micobiota de granos de maíz de almacén en los dos medios de cultivo utilizados PDA-CI y AVM	95
Tabla 12.	Número y porcentaje de granos de maíz campo contaminados por hongos	96
Tabla 13.	Distribución de la contaminación fúngica en granos de maíz campo	97
Tabla 14.	Porcentajes de hongos aislados de maíz campo en función de la Comunidad Autónoma estudiada	102
Tabla 15.	Porcentajes de hongos que han crecido en la variedad Panamá	105
Tabla 16.	Porcentajes de hongos que han crecido en la variedad Cribor	105
Tabla 17.	Porcentajes de hongos que han crecido en la variedad Net	105
Tabla 18.	Recuento total de hongos del género <i>Fusarium</i> y otros hongos, según variedad	107
Tabla 19.	Identificación a nivel de especie mediante el análisis de secuencia de la región ITS de los aislados de <i>F. graminearum</i>	116
Tabla 20.	Identificación a nivel de especie mediante el análisis de secuencia de la región ITS de los aislados de <i>Fusarium verticillioides</i> identificados por PCR	119
Tabla 21.	Identificación a nivel de especie mediante el análisis de secuencia de la región ITS de los 14 aislados de <i>Fusarium</i> spp., no identificadas por PCR	120
Tabla 22.	Exactitud y precisión del método para las diferentes micotoxinas evaluadas	136
Tabla 23.	Detección de genes implicados en la producción de tricotecenos y DON y NIV. Resumen de las cuatro micotoxinas producidas por los aislados del complejo <i>F. graminearum</i> provenientes de maíz, en los distintos medios de cultivo y distintos tiempos de incubación	137
Tabla 24.	Micotoxinas detectadas (µg/kg) por CG-MS a partir de medio de cultivo PDA crecido con cepas de <i>F. graminearum</i> incubadas durante 7, 15 y 21 días a 20 °C	140
Tabla 25.	Micotoxinas detectadas (µg/kg) por CG-MS a partir de medio de cultivo crecido YES con cepas de <i>F. graminearum</i> incubadas durante 7, 15 y 21 días a 20 °C	141
Tabla 26.	Micotoxinas detectadas (µg/kg) por CG-MS a partir de medio de cultivo Czapectk crecido con cepas de <i>F. graminearum</i> incubadas durante 7, 15 y 21 días a 20 °C	142



## Índice de fotografías

---

Fotografía 1.	Estructuras morfológicas del género <i>Fusarium</i>	20
Fotografía 2.	Desarrollo de algunas de las especies fúngicas contaminantes en maíz campo	101
Fotografía 3.	Micobiota fúngica de maíz experimental	106
Fotografía 4.	Identificación de <i>Fusarium</i> spp., mediante PCR	110
Fotografía 5.	Amplificación de los aislados de <i>F. graminearum</i>	111
Fotografía 6.	Identificación de <i>F. verticillioides</i> mediante PCR	112
Fotografía 7.	Identificación de <i>F. oxysporum</i> mediante PCR	113
Fotografía 8.	Identificación de <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> y <i>F. sporotrichioides</i> mediante PCR múltiple	114
Fotografía 9.	Productos de amplificación de la región ITS de los aislados de <i>Fusarium</i> spp.	114
Fotografía 10A.	Perfiles generados después de la digestión con las enzimas de restricción A: <i>Alu</i> I, B: <i>Hha</i> I, en la región IGS, en aislados de <i>F. graminearum</i>	122
Fotografía 10B.	Perfiles generados después de la digestión con las enzimas de restricción C: <i>Eco</i> RI, D: <i>Mbo</i> I, en la región IGS, en aislados de <i>F. graminearum</i>	123
Fotografía 11A.	Perfiles generados por análisis de restricción de la región IGS de los aislados de <i>F. verticillioides</i> con A: <i>Alu</i> I y B: <i>Bsu</i> RI	125
Fotografía 11B.	Perfiles generados por análisis de restricción de la región IGS de los aislados de <i>F. verticillioides</i> con C: <i>Mbo</i> I y D: <i>Eco</i> RI	126
Fotografía 11C.	Perfiles generados por análisis de restricción de la región IGS de los aislados de <i>F. verticillioides</i> E: <i>Hha</i> I	127
Fotografía 12.	Identificación de aislados productores de tricotecenos mediante PCR	135



## Abreviaturas empleadas

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AVM	Agar Verde Malaquita
$a_w$	Actividad del agua
Blast	Basic Local Alignment Sequence Tool
C	Citosina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CG	Cromatografía de gases
cm	Centímetro
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
Cz	Czapeck
DAS	Diacetoxiscirpenol
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DON	Deoxinivalenol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EST	Expressed Sequence Tag
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
FUS X	Fusarenon X
g	Gramo
G	Guanina
gmol <sup>-1</sup>	Gramos mol
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IDT	Ingesta diaria tolerable
IGS	Intergenic Spacer
IGS	Región espaciadora intergénica
ITS	Región espaciadora transcritora interna
ITS	Internal Transcribed Spacer Regions
Kb	Kilobases (1000 pb)
kg	Kilogramos
DL <sub>50</sub>	Dosis intraperitoneal o letal
LOAEL	Nivel más bajo de la micotoxina al cual se observan efectos tóxicos
LSD	Least Significant Differences
m	Metro
M	Molar
mg	Miligramo
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros

## Abreviaturas

---

mM	Milimolar
mPCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa múltiple)
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
NEO	Neosolaniol
ng	Nanogramo
NIV	Nivalenol
nm	Nanómetro
NOAEL	Estimación del nivel de la micotoxina al cual no se observan efectos tóxicos
O <sub>2</sub>	Oxígeno
°C	Grados centígrados
p/v	Peso/ volumen
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-RFLP	Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR
PDA-CI	Potato Dextrosa Agar-Cloranfenicol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RIA	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
sp.	Especie
spp.	Especies
subsp.	Subespecies
T	Tiamina
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Toneladas
U	Unidades
UPGMA	Unweighted pair-group method with arithmetic mean
UV	Ultravioleta
V	Voltios
XAD	Resina de amberlita
YES	Agar sacarosa extracto de levadura
ZEA	Zearalenona
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
15-AcDON	15-Acetildeoxinivalenol
3-AcDON	3-Acetildeoxinivalenol

## CARACTERIZACIÓN DE CEPAS TOXIGÉNICAS DEL GÉNERO *Fusarium* MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Las micotoxinas son metabolitos producidos por un amplio grupo de hongos, entre los que se encuentran los pertenecientes al género *Fusarium*. Se han detectado como contaminantes naturales en mayor o en menor grado en un gran número de productos agrícolas y manufacturados y, si llegan a ser consumidas, pueden causar una gran variedad de efectos tóxicos en humanos y animales.

Dentro de los cereales, el maíz es uno de los más vulnerables a la colonización por especies del género *Fusarium* y, por consiguiente, a la contaminación por las micotoxinas que produce dicho género. Es por ello que en este trabajo se aislaron estos hongos a partir de granos de maíz destinados al consumo humano y animal. Estos análisis, además de aportarnos los aislados necesarios para la identificación y detección de la producción de micotoxinas, sirvieron para el estudio comparativo entre los medios de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) y Agar Verde Malaquita, destacándose este último por su selectividad para el aislamiento de hongos del género *Fusarium* frente otros géneros.

Una vez obtenidos los aislados, nos centramos en la identificación por PCR de especies del género *Fusarium* procedentes de grano de maíz y la detección de especies productoras de tricotecenos (deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV)). Como controles se utilizaron cepas de referencia: suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo.

De los hongos obtenidos en la primera parte de este trabajo se seleccionaron 377 pertenecientes al género *Fusarium*. Estos aislados fueron analizados mediante PCR utilizando diferentes iniciadores específicos. Con este método se obtuvo la identificación de las especies *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. La técnica PCR también permitió la detección de cepas productoras de tricotecenos, así como la de aislados productores de DON.

Para comprobar la especificidad de la identificación por PCR, se realizó la secuenciación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del DNA, con esta técnica se confirmó

la identificación por PCR de algunos aislados y se identificaron 43 aislados que no pudieron ser identificados por PCR. También se analizó la región IGS mediante la técnica PCR-RFLP de 96 aislados, encontrándose una alta variabilidad intra e interespecifica.

Se determinó la producción de las micotoxinas deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON), fusarenona X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol, mediante cromatografía de gases con detector de masas (GS-MS), a partir de aislados crecidos en tres medios de cultivo diferentes, a distintos periodos de incubación. Para ello, se estudiaron 19 aislados de *F. graminearum* que previamente habían demostrado poseer los genes implicados en la producción de tricotecenos y DON. Mediante GC-MS se encontró que todas las cepas producían alguna de las micotoxinas, DON, 3-AcDON y 15-AcDON. El medio de cultivo donde se obtuvo mayor producción de micotoxinas fue PDA a los 21 días.

## CARACTERITZACIÓ DE SOQUES TOXIGÈNIQUES DEL GÈNERE *Fusarium* PER MITJÀ DE TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR.

Les micotoxines són metabòlits produïts per un ampli grup de fongs, entre els quals es troben els pertanyents al gènere *Fusarium*. S'han detectat com a contaminants naturals en major o en menor grau en un gran nombre de productes agrícoles i manufacturats i, si arriben a ser consumides, poden causar una gran varietat d'efectes tòxics en humans i animals.

Dins dels cereals, la dacsa és un dels més vulnerables a la colonització per espècies del gènere *Fusarium* i, per consegüent, a la contaminació per les micotoxines que produeix aquest gènere. És per això que en aquest treball es van aïllar aquests fongs a partir de grans de dacsa destinada al consum humà i animal. Aquestes anàlisis, a més d'aportar-nos els aïllats necessaris per a la identificació i detecció de la producció de micotoxines, van servir per a l'estudi comparatiu entre els medis de cultiu Potato Dextrosa Agar (PDA) i Agar Verd de Malaquita, en què destaca aquest últim per la seua selectivitat per a l'aïllament de fongs del gènere *Fusarium* enfront d'altres gèneres.

Una vegada obtingudes les soques, ens centràrem en la identificació per PCR d'espècies del gènere *Fusarium* procedents de grans de dacsa i la detecció d'espècies productores de tricotecens –deoxinivalenol (DON) i nivalenol (NIV)–. Com a controls es van utilitzar ceps de referència subministrats per la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus.

Dels fongs obtinguts en la primera part d'aquest treball, se'n van seleccionar 377 pertanyents al gènere *Fusarium*. Les soques van ser analitzades per mitjà de PCR, utilitzant diferents iniciadors específics. Amb aquest mètode s'obtingué la identificació de les espècies *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* i *F. verticillioides*. La tècnica PCR també va permetre la detecció de soques productores de tricotecens, així com la d'aïllats productors de DON.

Per a comprovar l'especificitat de la identificació per PCR, es va realitzar la seqüenciació del fragment ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADN. Amb aquesta tècnica es va

confirmar la identificació per PCR d'algunes soques i se n'identificaren 43 que no havien pogut ser identificades per PCR. També s'analitzà la regió IGS, per mitjà de la tècnica PCR-RFLP, de 96 soques, en què es trobà una alta variabilitat intra i interespecífica.

Es va determinar la producció de les micotoxines deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON), fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) i nivalenol, per mitjà de cromatografia de gasos amb detector de masses (GS-MS), a partir de soques crescudes en tres medis de cultiu diferents, a distints períodes d'incubació. Per a aquest propòsit, es van estudiar 19 soques de *F. graminearum* que prèviament havien demostrat tenir els gens implicats en la producció de tricotecens i DON. Per mitjà de GC-MS es va trobar que tots els ceps produïen alguna de les micotoxines, DON, 3-AcDON i 15-AcDON. El medi de cultiu on s'obtingué major producció de micotoxines va ser PDA al cap de 21 dies.

## **CHARACTERIZING OF TOXIGENIC STRAINS OF *Fusarium* BY MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES.**

Mycotoxins are metabolites produced by a wide group of fungi, including the genus *Fusarium*. Mycotoxins have been identified as natural pollutants to a greater or lesser degree in many agricultural and manufactured products and can cause several toxic effects in humans and animals if they become eaten.

Maize is one of the most vulnerable cereals to colonization by *Fusarium* species and hence the contamination by mycotoxins produced by such genus. In this work we have isolated *Fusarium* strains from maize grains for human and animal feed. We have carried out a comparative study between Potato Dextrose Agar (PDA) and Agar malachite green (AVM) to isolate *Fusarium* strains, highlighting the latter for its selectivity for isolation *Fusarium* genus.

We focus on the identification by PCR of *Fusarium* isolates from maize grains and detection of trichothecenes producing strains (deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV)). As controls, were used strains reference provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT).

We have selected 377 isolates belonging to *Fusarium* genus and subjected to PCR analysis using different primers specific. With this method we have identified the species *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *F. verticillioides*. The PCR technique also allowed the detection of the gene that codifies the production of trichothecenes, as well as isolated producers of DON.

To check the specificity of the identification of *Fusarium* strains by PCR, sequencing of the fragment ITS1-5.8S-ITS2 DNA was carried out. With this technique we have identified 43 isolates that could not be identified by PCR. We have also analyzed the region IGS through technical PCR-RFLP of 96 isolated, founding a high intra and interspecific variability.

The production of deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON), fusarenon X, 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) and nivalenol from isolated

## Summary

---

strains in three different culture media at different periods of incubation, was determined by gas chromatography with mass detector (GS-MS). We studied 19 isolated *F. graminearum* containing the genes involved in the production of trichothecenes and DON. By GC-MS was found that all strains produced one of the mycotoxins, DON, 3-AcDON and 15-AcDON. The culture medium in which was obtained a higher production of mycotoxin PDA was at 21 days.

# I. INTRODUCCIÓN

---



## 1. REVISIÓN HISTÓRICA DE *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, quien lo definió como especies de forma hialina, con esporas no septadas que nacían en un estroma, con forma de canoa o banana, el cual era el carácter primario distintivo. Dicha descripción se hizo basándose en las observaciones de *F. roseum*, primera especie descrita, y debido a su falta de especificidad, se podría aplicar al menos a 50 géneros de Hiphomycetes (Marasas *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1994). Es por ello que la definición original ha sufrido una serie de modificaciones quedando como: “especies con macroconidios fusoides, ligeramente curvados, septados y con una célula basal pedicelada. Con microconidios y clamidosporas terminales o intercalares, que pueden estar ausentes o presentes” (Nelson *et al.*, 1994).

En 1821, Fries valida este género, incluyéndolo en el orden *Tuberculariaceae*. Aunque se ha avanzado considerablemente, todavía existen desacuerdos en la sistemática de *Fusarium*, que exhibe un grado notable de variación con respecto a características morfológicas, culturales, y fisiológicas; variación que se puede explicar, en parte, por la capacidad de la especie de colonizar lugares ecológicos diversos en la mayoría de las áreas geográficas del mundo. Sin embargo, esta variación ha conducido a dificultades considerables en el desarrollo de un sistema taxonómico estable y extensamente aceptado para el género (Summerell *et al.*, 2003; Leslie and Summerell, 2006).

Inicialmente se describieron más de 1.000 especies, variedades y formas, nombradas en base a observaciones superficiales (Toussoun *et al.*, 1975). Sistemáticamente no se describió el organismo entero y no se hizo ninguna tentativa de buscar semejanzas o relaciones entre hongos/variedades. La necesidad de buscar un sistema exacto y fiable de clasificación se produjo cuando especies del género *Fusarium* causaron serias enfermedades en muchas plantas, y fue H.W. Wollenweber quien estudio este género, del cual se publicaron trabajos como “Studies on the *Fusarium* problem”, de 1913, o “Identification of species of *Fusarium* occurring on the sweet potato”, de 1914, entre otras, en las cuales colaboraron O.A. Reinking, C.D. Sherbakoff, H. Johann, and A.A. Bailey. Estudios como “Aliquot *Fusaria tropicalia* nova vel revisa”, de 1925 y “Fundamentals for taxonomic studies of

*Fusarium*”, de 1925, dieron lugar en 1935 a la publicación “Die Fusarien” en la cual colaboró O.A. Reinking, donde se redujeron el número de especies, variedades y formas de *Fusarium* a 142, agrupados en 16 secciones (Nelson *et al.*, 1994).

Muchos son los sistemas taxonómicos que han sido propuestos para el género *Fusarium*: Raillo en 1935, Snyder y Hansen en 1940-1941-1945, Bilai en 1955-1970, Gordon 1944-1960, Messiaen y Cassini en 1968, Booth en 1971, Matuo en 1972, Joffe en 1974, Gerlach y Nirenberg en 1982 y Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O., en 1983. Sin embargo, todos los sistemas propuestos sobre la taxonomía de *Fusarium* están basados en trabajos de Wollenweber y Reinking publicados desde 1913 a 1935 (Nelson *et al.*, 1994).

Los taxónomos de *Fusarium* se pueden clasificar en "divisores", los cuales buscan diferencias y crean nuevas clasificaciones; "agrupadores" que buscan semejanzas y los asocian en base a las características que tienen en común y los "moderados", que son una mezcla de los dos grupos anteriores" (Nelson *et al.*, 1994).

Dentro de los "divisores" encontramos a Wollenweber y Reinking, cuyo trabajo de 1935 sobre la taxonomía de *Fusarium* se ha convertido en referencia estándar en este tema. El trabajo consistió en organizar aproximadamente 1.000 especies del género *Fusarium* en 16 secciones: *Eupionnotes*, *Macroconia*, *Spicarioides*, *Submicrocera*, *Pseudomicrocera*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella*, y *Ventricosum*. Estas secciones contenían 65 especies, 55 variedades, y 22 formas. Pero en estas se encuentran 77 sinónimos para *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. y 133 sinónimos para *Fusarium lateritium* Nees y su teleomorfo (Nelson *et al.*, 1994).

El sistema producido es tan complejo que es difícil o imposible utilizarlo para construir una clave práctica satisfactoria. Los caracteres usados por Wollenweber y Reinking para separar especie, variedades y formas no son estables y pueden ser alterados fácilmente por medios de cultivos y bajo diferentes condiciones ambientales. La variación o la mutación de los cultivos de *Fusarium* no fue reconocida por Wollenweber y Reinking, puesto que sus cultivos no fueron

monospóricos y algunas de sus especies y muchas de sus variedades y formas pueden ser mutantes (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

Raillo y Bilai, entre 1950 y 1955, estudiaron los caracteres morfológicos del género, como forma y longitud del macroconidio, carácter guía en la determinación de la especie; curvatura de conidios, número de tabiques, y ancho de conidios, caracteres usados para la separación de subespecie y de variedades; y los caracteres culturales como pigmento, presencia del esclerocio, y modo de la formación de la espora, los cuales eran útiles en la separación de formas. Estudiaron la variabilidad en *Fusarium* utilizando cultivos monospóricos y encontraron que la forma de la célula apical, la curvatura de los conidios y número de tabiques seguía siendo constante en los cultivos desarrollados a partir de cultivos monospóricos, pero la longitud y la anchura de conidios, número de esclerocios y formación de la espora variaban considerablemente (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

En 1955 Bilai reconoció la importancia de la variación y/o mutación de los cultivos en la taxonomía de *Fusarium*. Estudió la morfogénesis en aislados provenientes de conidios, prestando atención particular a los efectos de la temperatura, humedad, período de crecimiento, composición del medio de cultivo, germinación y envejecimiento de los conidios, y encontró que la variabilidad era mayor que lo aceptado en la descripción de muchas especies. En base a estos resultados, revisó la taxonomía del género para incluir solamente nueve secciones, 26 especies, y 29 variedades. Combinó la sección *Liseola* con la sección *Elegans* y la sección *Gibbosum* con la sección *Discolor*. Este sistema se utilizó en Rusia, pero no se ha aceptado en otras partes del mundo (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

Gerlach y Nirenberg publica en 1982 "The genus *Fusarium* - a pictorial atlas", un trabajo que utiliza fotografías y dibujos de línea excelentes. Éstos utilizaron ocho medios de cultivos bajo condiciones ambientales que acentúan diferencias. Se concentraron en las diferencias más que las semejanzas, con el resultado de que una diferencia leve en la morfología de un cultivo pudo haber sido la base para señalar una nueva especie o variedad. Las nuevas especies fueron establecidas en

base a un solo cultivo y, en algunos casos, en un solo cultivo mutante (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

En 1986, Joffe hace un acercamiento a la taxonomía de *Fusarium* similar a la de Wollenweber y Reinking y de Gerlach y Nirenberg (1982). De hecho, su sistema parece ser simplemente una nueva exposición de las secciones y especies de Wollenweber y Reinking, con la adición de algunos nombres de Gerlach. En su monografía "*Fusarium* species: Their Biology and Toxicology" incluyó 13 secciones, 33 especies y 14 variedades, tomando como base primaria el macroconidio, forma del microconidio y características del cultivo (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

Siguiendo en la taxonomía de este género encontramos a los denominados "agrupadores", entre los que se encuentran Snyder y Hansen. En los años 40, publicaron sus resultados en tres publicaciones. Este sistema se basa sobre todo en la morfología del macroconidio y en un estudio extenso de la naturaleza y variabilidad de las especies de *Fusarium*. La base para su trabajo era un análisis de cultivos monospóricos de las especies de *Fusarium* bajo condiciones idénticas del substrato y de condiciones ambientales. Encontraron que los caracteres utilizados por Wollenweber y Reinking para la identificación de especie eran insuficientes (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

Dentro de los taxónomos considerados como "moderados", Gordon, en 1944 propone un sistema taxonómico que es una mezcla entre las propuestas de Wollenweber y Reinking y Snyder y Hansen, pero con más semejanza al primero. Booth, en 1971, modificó el sistema de Gordon, agregando resultados de sus estudios, y amplió la información sobre los estados perfectos. La contribución más importante fue la información sobre conidióforos y células conidiogénicas, útiles en la taxonomía de las especies de *Fusarium*. Demostró el valor de la presencia de polifiálides y monofiálides en la separación secciones y especie. También demostró que la longitud y la forma de las células conidiogénicas que producen microconidios eran caracteres fiables en la separación entre especies (Nelson *et al.*, 1994; Leslie and Summerell, 2006).

En 1983 Nelson, Toussoun y Marasas proponen uno de los sistemas taxonómicos más utilizados a nivel mundial. La filosofía de estos investigadores es que no hay un sistema taxonómico totalmente satisfactorio para la identificación de todas las especies del género *Fusarium*. Sobre esta base, estos investigadores seleccionaron lo que consideraban las mejores partes de varios sistemas y combinaron los resultados de su propia investigación para desarrollar un sistema de identificación práctica. El sistema incluyó *F. oxysporum* y *F. solani*, según lo descrito por Snyder y Hansen, y la información sobre los conidióforos, según lo descrito por Booth. Las secciones de Wollenweber y Reinking conteniendo especie toxigénicas, así como otras secciones fueron conservadas. Sin embargo, el número de especies fue reducido, y variedades y formas fueron combinadas con la especie apropiada (Nelson *et al.*, 1983; 1994; Leslie and Summerell, 2006). Los eventos más relevantes en la investigación del género *Fusarium* se resumen en la Tabla 1.

### **1.1. Situación taxonómica actual del género *Fusarium***

El género *Fusarium* comprende 70 especies descritas, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es en realidad un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellos se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola (Leslie and Summerell, 2006).

Aunque no se conoce nada acerca del origen espontáneo de nuevas razas de *Fusarium* en la naturaleza, salvo que surgen irregular e impredeciblemente, se sabe que pueden producirse por mutagénesis (Booth, 1984). La “forma specialis” (f. sp.) son cepas morfológicamente similares y se caracterizan por sus adaptaciones a diferentes hospedadores. Tanto las “forma specialis” como las razas fisiológicas no son reconocibles morfológicamente, solo la inoculación y su comportamiento frente al hospedador permiten su identificación. Aunque raza fisiológica y “forma specialis” no están incluidos en los códigos internacionales de nomenclatura, ayuda a describir el grado de especificidad de la relación hospedador – patógeno (Taylor *et al.*, 1999).

**Tabla 1. Eventos relevantes en la investigación de *Fusarium* spp. (1809-2007)**

Año	Evento
1809	Link describe el género <i>Fusarium</i>
1821	Fries valida este género que lo incluyó en el orden <i>Tuberculariaceae</i>
1822	Fries describe el estado sexual del género <i>Gibberella</i>
1834	Schweinitz describe <i>Gibberella zeae</i> en maíz en los Estados Unidos
1877	Saccardo describe <i>Oospora verticillioides</i> en maíz asociada con pellagra en Italia
1882	Palchevski reporta tóxicos en pan en Siberia
1886	De Bary propone que las toxinas juegan un papel importante en la enfermedad de las plantas
1901	Buckley and MacCallum asocian la encefalitis de caballos con comida mohosa en Maryland, Estados Unidos
1904	Peters and Sheldon, correlacionan la consumición de maíz contaminado con <i>F. monilliforme</i> con toxicosis en animales en Nebraska
1913	Wollenweber publica "Studies on the <i>Fusarium</i> problem"
1914	Wollenweber publica "Identification of species of <i>Fusarium</i> occurring on the sweet potato"
1923	Dounin reporta enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> "head blight" y pan con toxinas en Russia
1925	Bailey reporta "Aliquot <i>Fusaria</i> tropicalia nova vel revisa", "Fundamentals for taxonomic studies of <i>Fusarium</i> "
1934	Yabuta y colaboradores reportan la estructura de ácido fusarico de especies de <i>Fusarium</i>
1935	Wollenweber and Reinking publican el primer gran atlas "Die Fusarien", en Berlin describen 142 especies del género
1935	Raillo hace la propuesta de un sistema taxonómico
1940	Snyder y Hansen reduce todas las especies de <i>Fusarium</i> a nueve especies
1940s	En Rusia se presenta un brote de aleukia en humanos por el consumo de granos contaminados con especies de <i>Fusarium</i>
1944 1960	Gordon propone un nuevo sistema una mezcla entre la propuesta de Wollenweber y Reinking y el de Zinder y Hansen
1947	Gäumann aísla un fitotóxico una mezcla de eniatina de especies de <i>Fusarium</i> . Su estructuras fueron reportadas 20 años más tarde
1955 1970	Bilai propone un nuevo sistema taxonómico reconociendo la importancia de la variación o de la mutación de los cultivos en la taxonomía de <i>Fusarium</i>
1957	Gäumann reporta que el ácido fusarico es tóxico para las plantas causándoles marchitamiento.
1960	El consumo de alimento contaminado con aflatoxinas es correlacionado con el brote de la enfermedad X en pavos en Inglaterra
1960s	El Consumo de alimento contaminado con <i>F. graminearum</i> es correlacionado con el brote de síndrome estrogénico en cerdos en el centro de Estados Unidos
1960s	Reportan las estructuras de tricotecenos de <i>Fusarium</i> , incluida diacetoxiscirpenol, deoxinivalenol
1970s	Toxina T-2 y nivalenol son reportados en Europa, Japón y Estados Unidos
1966	Urry y colaboradores reportan la estructura de zearalenona de especies de <i>Fusarium</i>
1968	Messiaen y Cassini en su propuesta taxonómica incluyen variedades botánicas en vez de cultivares en la subespecie en <i>F. roseum</i>
1969	Hamill y colaboradores reportan la estructura de bauvericina de especies de <i>Fusarium</i>
1970s	El consumo de granos contaminados con <i>F. graminearum</i> se asocia con el brote de akakabi-byo en humanos en Japón
1971	Booth modifica la propuesta taxonómica de Gordon añadiendo información sobre conidióforos y células conidiogénicas
1972	Matuo sigue la propuesta de Snyder y de Hansen y propone una clave para el sistema entero
1974	Springer y colaboradores reportan la estructura de moniliformina en especies de <i>Fusarium</i>

Continuación Tabla 1.

1974	Joffe en su propuesta incluyó 13 secciones, 33 especies y 14 variedades para <i>Fusarium</i>
1977	McLaughlin y colaboradores y Ueno, reportan que los tricotecenos inhiben la síntesis de proteínas
1977	Hidy y colaboradores reportan actividad estrogénica de zearalenonas
1981	El consumo de maíz contaminado con <i>F. verticillioides</i> es correlacionado con una alta tasa de cáncer de esófago en el sur África
1981	Oficiales del gobierno de Estados Unidos alega el uso de tricotecenos como agentes de guerra biológicos en el sureste de Asia
1982	Gerlach y Nirenberg publica "The genus <i>Fusarium</i> a pictorial atlas"
1983	Nelson, Toussoun y Marasas, publican " <i>Fusarium</i> species: an illustrated manual for identification"
1984	Gelderblom y colaboradores reportan actividad mutagénica y la estructura de fusarina C de especies de <i>Fusarium</i>
1984	Marasas, Nelson, y Toussoun publican "Toxigenic <i>Fusarium</i> Species: identity and mycotoxicology"
1985-1991	Acuerdos con los oficiales de Estados Unidos, Irak contrata la producción en gran escala de tricotecenos y otras micotoxinas para el desarrollo de armas biológicas
1988	Bezuidenhout y colaboradores reportan la estructura de fumonisinas de especies de <i>Fusarium</i> . Laurent y colaboradores reportan independientemente la macrofusina en 1989
1988	Marasas y Kellerman y colaboradores causan leucoencefalomalacia en caballos aplicando fumonisinas por vía intravenosa y en 1990 por dosis oral
1989	Hohn y colaboradores clonan tricodenina sintetasa, primer tricoteceno biosintético y en 1992 descubren el cluster génico
1989	Desjardins y colaboradores reportan que los tricotecenos son requeridos por <i>F. sporotrichioides</i> y en 1992 <i>F. sambucinum</i> causa putrefacción en raíces, pero no la putrefacción seca en tubérculos de patatas
1990s	Gobernantes de los países de Europa, norte y sur América y otros, publican regulaciones para deoxinivalenol, fumonisinas y zearalenonas en alimentos humanos y comida para animales
1990	Harrison y colaboradores muestran que el edema pulmonar en cerdos se puede causar aplicando una inyección intravenosa de fumonisina. En 1998, Gumprecht y colaboradores causan esta enfermedad por dosis por vía oral
1991	Gelderblom y colaboradores demuestran experimentalmente que la ingestión de fumonisinas puede causar cáncer de hígado en ratas. En 2001 la administración de alimentos y drogas de Estados Unidos confirman que una dieta que contenga fumonisinas causa cáncer de hígado y riñón en roedores
1991	Wang y colaboradores descubren que las fumonisinas inhiben la síntesis de esfingolipidos
1993	La agencia internacional para la investigación contra el cáncer dice que toxinas producidas por <i>F. moniliforme</i> ( <i>F. verticillioides</i> ) se catalogan como grupo 2B carcinógenas (posiblemente carcinogénicas para humanos)
1993	Haese y colaboradores descubren el gen de la eniatina sintetasa
1996	Xu y Leslie publican el mapa genético de <i>F. verticillioides</i>
1996	Hermann y colaboradores reportan que la producción de enlaces eniatinicos que dan la habilidad a <i>F. avenaceum</i> para causar secamiento de raíz en tomate
1996	Desjardins, Proctor y colaboradores reportan que los enlaces de tricotecenos dan la habilidad a <i>F. graminearum</i> para causar la enfermedad llamada fusariosis en trigo
1997	Stevens y Tang descubren que las fumonisinas inhiben el receptor del folate ó ácido fólico, un posible mecanismo para neutralizar las defensas
1998	Kimura y colaboradores reportan el gen de <i>Fusarium</i> TR101, que confiere la resistencia a tricotecenos. Este también es reportado por McCormick y colaboradores en 1999

### Continuación Tabla 1.

1999	Proctor y colaboradores descubren el cluster génico para la biosíntesis de fumonisina
2000	Beremand y colaboradores publican una librería génica de <i>F. sporotrichioides</i>
2000	Brandwagt y colaboradores descubren el gen ASC-1, que confiere resistencia a fumonisinas
2002	Jurgenson y colaboradores publican el mapa genético de <i>F. graminearum</i> .
2003	Se secuencía el genoma completo de <i>F. graminearum</i>
2004	Schmidt, Trail y Song y colaboradores descubren genes para la biosíntesis de equisetina, fusarina y zearalenonas en especies de <i>Fusarium</i>
2006	Lysøe y colaboradores reportan que el gen <i>PKS4</i> de <i>F. graminearum</i> es esencial en la producción de Zearalenona
2006	Leslie y Summerell publican "The <i>Fusarium</i> Laboratory Manual" donde presenta la descripción de 70 especies del género <i>Fusarium</i>
2007	Brown y colaboradores reportan que en <i>F. verticillioides</i> el cluster génico FUM codifica a Zn (II) 2Cys6 proteína que afecta la expresión génica para FUM y la producción fumonisina

\* Tabla basada en la propuesta de Anne E. Desjardins. *Fusarium*. Mycotoxins: chemistry, Genetics and Biology. 2006

Según de Hoog *et al.* (2000) y Leslie and Summerell (2006), la clasificación de *Fusarium* se ubica en la:

<b>División</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Subdivisión</b>	Pezizomycotina
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase</b>	Hypocreomycetidae
<b>Orden</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Familia</b>	<i>Hypocreaceae</i>

Mitosporic Hypocreales

**Género** *Fusarium*

**Especies** *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. dimerum*, *F. chlamydosporum*, etc.

Algunas especies tienen un estado sexual reconocido dentro de la familia *Nectriaceae* y pertenecen al género *Gibberella* o *Nectria*.

## 1.2. El concepto de especie en hongos

En micología, la distinción entre una población y un individuo no es siempre fácil, y puede crear la confusión en los estudios genéticos (Carlile and Watkinson, 1994). Es por ello que se ha tomado como unidad taxonómica básica a la especie. Sin embargo diversos micólogos consideran que para ser una especie tiene que variar extensamente, y hay diversos acercamientos para delinearla. Hay que tener en cuenta, además, que la base genética para algunos de estos conceptos es en gran parte desconocida (Taylor *et al.*, 2000).

Varios conceptos han sido utilizados por micólogos para definir la especie fúngica. El concepto morfológico (fenotípico) es el acercamiento clásico más usado por micólogos, y se definen en base a características morfológicas y específicamente por las diferencias entre ellas. El concepto policategórico se basa en una combinación de caracteres, aunque cada especie no tiene que tener la misma combinación. El concepto biológico, que fue desarrollado antes del análisis filogenético moderno, acentúa el intercambio de genes (es decir, reproducción sexual y parasexual) dentro de la especie y la presencia de las barreras que previenen el cruce de la especie (Davis, 1995).

Sin embargo, el concepto de especie biológica, basado en la reproducción sexual, es de difícil aplicación en los microorganismos que no experimentan meiosis y se utiliza solamente en los hongos en fase sexual. No obstante en hongos en fase asexual, el intercambio genético por hibridación somática es una posibilidad teórica, cuando existe compatibilidad vegetativa, aunque es limitado (Carlile and Watkinson, 1994; Seifert *et al.*, 1995; Kurtzman and Robnett, 1997).

Los recientes progresos han influenciado altamente los conceptos tradicionales de la sistemática. Los acercamientos y la incorporación a la filogenética de las técnicas de la biología molecular, particularmente el análisis de secuencias de ADN, han proporcionado nueva información que ha hecho que el concepto de especie biológica se venga abajo, apareciendo el concepto de la especie filogenética. Este concepto se ha encontrado particularmente apropiado para los grupos de hongos en

donde no se ha observado ninguna reproducción sexual (deuteromicetes) (Leslie and Summerell, 2006).

Uno de los problemas para los especialistas en morfología implica el decidir cuántas diferencias se requieren para ser considerada una especie. Esto ha sido solucionado en parte por el concepto de la especie filogenética, especialmente cuando está basada en el análisis de características moleculares que ofrece consistencia en la delineación de la especie (Kurtzman and Robnett, 1997).

Sin embargo, la definición del concepto de especie filogenética es también complejo, y se han propuesto diversas definiciones. El concepto basado en el carácter, define una especie como grupo de organismos que tienen cualidades o combinaciones comunes. Por otro lado, el concepto tradicional de especie insiste que los organismos deben ser relacionados filogenéticamente antes de ser considerados miembros de especies conocidas (Baum and Donoghue, 1995).

### 1.3. Especies de *Fusarium*

#### 1.3.1. *F. graminearum* Schwabe (Telemorfo *Gibberella zeae*)

Es una especie cosmopolita y presenta una amplia gama de hospedantes. Las principales especies de interés económico susceptibles son: trigo, cebada, avena, centeno, maíz, trébol, alfalfa, batata, arroz (Leslie and Summerell, 2006).

Las principales características que presenta esta especie son: esporodoquios a menudo escasos, pero cuando están presentes son de color naranja pálido y pueden estar ocultos bajo el micelio. El macroconidio es relativamente delgado, en forma de hoz de  $2.5 \times 35-63 \mu\text{m}$ , puede contener entre 5 a 6 septos, se caracterizan por presentar una célula basal con forma de pie bien desarrollada. Las clamidosporas son globosas, midiendo entre  $10$  a  $12 \mu\text{m}$  de diámetro, pueden ser simples o en cadena. Con microconidios ausentes. Es un hongo homotálico y sus peritecios, son gregarios y de coloración púrpura oscuro a negro. Se forman a partir de un estroma, de forma ovoide, papilado, con diámetro de  $150-350 \mu\text{m}$ , la temperatura para que se forme esta estructura está entre  $5-35 \text{ }^\circ\text{C}$ , presentando un óptimo de  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ , requiere

una alta humedad relativa y baja incidencia de luz ultravioleta. Las ascas pueden contener 8 esporas hialinas. Estas esporas miden de 3.5 x 17-25 µm, presentan de 0 a 4 septos, normalmente de 4 células. El teleomorfo de esta especie es *Gibberella zeae* (Marasas *et al.*, 1984; Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

Estudios en análisis filogenéticos basados en 11 genes nucleares revelan que *F. graminearum* consiste en al menos nueve linajes biogeográficamente estructurados denominados “Complejo *F. graminearum*” (*Fg*), que recientemente ha logrado el estado de especie. Estos linajes son *F. austroamericanum* (linaje 1), *F. meridionale* (linaje 2), *F. boothii* (linaje 3), *F. mesoamericanum* (linaje 4), *F. acaciae-mearnsii* (linaje 5), *F. asiaticum* (linaje 6), *F. graminearum* (linaje 7), *F. cortaderiae* (linaje 8) y *F. brasilicum* (linaje 9) (O'Donnell *et al.*, 2004; Glenn, 2007).

Por muchos años *F. graminearum* fue ubicado en dos grupos, conocidos como *F. graminearum* grupo 1 y *F. graminearum* grupo 2, morfológicamente son muy difíciles de diferenciar estos dos grupos, pero hay diferencias ecológicas y patológicas.

*F. graminearum* no se asocia directamente como patógeno humano, pero aislados de esta especie producen tres importantes micotoxinas, zearalenona, nivalenol y deoxinivalenol, así como aurofusarina, culmorina, fusarina C, fusarocromanona y esteroides. La distribución geográfica de esta especie es universal y frecuentemente se asocia con el lugar de origen y temperatura para la producción de una determinada micotoxina (Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006; Lori y Rizzo, 2007).

### **1.3.2. *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. (Teleomorfo *Gibberella moniliformis* Wineland)**

Esta especie que se encuentra dentro de las especies que pertenecen al complejo *G. fujikuroi*, estado perfecto asociado a las especies del género *Fusarium* pertenecientes a la sección *Liseola* y *Elegans*, cuya taxonomía es altamente controvertida, y depende del criterio usado. Se distinguen nueve mapas de poblaciones (MP) designados con las letras A – I: para *F. verticillioides* (Sacc.) y el

MP A; *F. sacchari* (Butler) el MP B; *F. fujikuroi*, el MP C; *F. proliferatum*, MP D; *F. subglutinans*, el MP E; *F. thapsinum*, el MP F; *F. nygamai*, el MP G; *F. circinatum*, el MP H y *F. konzum*, el MP I (Kerényi *et al.*, 1999; Zeller *et al.*, 2003; Leslie *et al.*, 2004).

La apariencia del macroconidio formado en el esporodoquio, varía desde forma de hoz a casi recto con el lado dorsal y ventral casi paralelo y con paredes delgadas y célula basal con forma de pie, con 3 a 5 septos. Con microconidios abundantes, unicelulares de forma oval a claviforme con una base aplanada. Se forman apicalmente en cadenas largas sobre monofiálides. Los conidióforos pueden ser ramificados o no ramificados, monofiálides, y no presenta clamidosporas. La morfología de la colonia en el medio PDA es de color blanco la cual crece rápidamente y frecuentemente se tiñe de púrpura. Los esporodoquios pueden estar presentes o ausentes; cuando están presentes pueden ser de color arena a naranja. Se pueden desarrollar esclerocios y usualmente son de color azul oscuro los cuales pueden ser abundantes dando esa coloración a la superficie superior e inferior de la colonia. La superficie inferior puede variar desde incolora hasta púrpura oscura (Leslie and Summerell, 2006).

Su distribución geográfica es amplia y con alto un rango de hospedadores importantes económicamente, como maíz, higo, esparrago, pino, caña de azúcar, cebada, trigo. Causa diversos síntomas, está asociado con la marchitez, pudrición de raíz y tallo en sorgo y maíz, en algunos casos produce pudrición de granos y mazorca (Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

*F. verticillioides* es morfológicamente igual a *F. thapsinum* que no produce pigmentos amarillos, también es similar a *F. proliferatum* pero las especies se distinguen porque éste forma microconidios en cadena desde polifiálides. Lo mismo sucede con *F. andiyazi* pero éste no forma pseudoclamidosporas, también es muy similar en algunos aspectos con *F. nygamai* (Leslie and Summerell, 2006).

Una de las características de esta especie es que da alergia en humanos y tiene la capacidad sistemática de producir cáncer. La fumonisina es la micotoxina más importante que sintetiza esta especie, pero también ácido giberelico,

moniliformina, ácido fusarico, beauboricina, y fusaproliferina (Malonek *et al.*, 2005; Desjardins, 2006).

### **1.3.3. *F. equiseti* (Corda) Saccardo**

Posee abundante macroconidios formados en esporodoquio de color naranja. Se usa solamente el macroconidio formado en esporodoquio para su identificación, la cual posee una curvatura dorsiventral y usualmente con 5 a 7 septos, con una distintiva célula basal en forma de pie parecido a un látigo. Su tamaño puede variar entre 25 a >120  $\mu\text{m}$ , los macroconidios pueden ser también producidas por monofiálides o en conidióforos bifurcados. No produce microconidios, produce clamidosporas globosas, intercalares, solitarias o en cadenas, lisas o rugosas (Leslie and Summerell, 2006).

*F. equiseti* se puede confundir con un gran número de especies del género *Fusarium* incluyendo a *F. scirpi*, *F. compactum*, y *F. semitectum* (Leslie and Summerell, 2006).

Geográficamente *F. equiseti* es cosmopolita, habitante natural del suelo y aislado en muchas partes del mundo y puede colonizar raíces de plantas desde los 13 °C hasta los 30 °C. Produce una cantidad considerable de la enzima linamarasa y el ácido ursodeoxicólico. Con lo que respecta a los humanos se conoce como alergénico, se reconoce como patógeno humano y se asocia a micotoxicosis en animales y humanos por las micotoxinas que produce las cuales incluyen: butenolida, beauvericina, tricotecenos como diacetoxiscirpenol, nivalenol, y toxina T-2, equisetina, fusarocromanona y zearalenona (Marasas *et al.*, 1984; Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

### **1.3.4. *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg. (Telemorfo *Gibberella intermedia* (Kuhlman))**

Su estado sexual es *G. intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg and Seifer, su distribución geográfica es mundial y puede colonizar varios sustratos. Causa enfermedades en maíz, sorgo, mango y espárrago. El macroconidio es el típico que

se forma en las especies del complejo *G. fujikuroi* el cual se describió en la especie *F. verticillioides* (Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

Algunos aislados de *F. proliferatum* producen ácido giberélico y una variedad de micotoxinas en altos niveles dentro de las que se incluyen beauvericina, fusaproliferina, ácido fusarico, fusarinas, fumonisina y moniliformina. También puede producir proteasas y  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -xylosidasa, algunas especies producen enzimas que están involucradas en la biodegradación de lignina (Leslie and Summerell, 2006).

### **1.3.5. *F. culmorum* (W.G. Smith) Saccardo**

Se caracteriza por qué forma abundantes macroconidios en el esporodoquio. Estos son cortos y robustos, con una célula basal en forma de pie poco desarrollada. Estos también se forma en monofiálides o en conidióforos bifurcados. Contiene entre 3 y 4 septos. Con microconidios ausentes y abundantes clamidosporas las cuales se pueden formar entre la tercera a quinta semana (Leslie and Summerell, 2006).

Presenta similitudes morfológicas con *F. sambucinum* y *F. crookwellense*. El estado sexual de *F. culmorum* es probablemente heterotálica. Comúnmente se encuentra en regiones templadas. Está asociado a enfermedades de raíz y tallo en cereales y contaminación de granos, particularmente en las regiones templadas de Europa. Produce esteroides y micotoxinas como la moniliformina, deoxinivalenol, fusarina C, y zeralenona. También produce T-2 y neosolaniol. En humanos se asocia con dermatitis (Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

### **1.3.6. *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder and Hansen**

Su estado sexual no es conocido, su distribución geográfica es cosmopolita y es un importante patógeno vascular de muchas plantas y es común en el suelo como saprofito. Sus características principales es su macroconidio que se forma en esporodoquio, en conidióforos bifurcados o en monofilides, que usualmente son abundantes, de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, usualmente con 3 septos transversales, con la célula basal elongada y

la célula apical atenuada; con un tamaño que va de 27 a 46  $\mu\text{m}$  de largo por 3 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Los microconidios usualmente no tienen septos, unicelulares, hialinos, elipsoidales a cilíndricos, rectos o curvados; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados y son formados abundantemente en falsas cabezas. Los microconidios tienen 5-12  $\mu\text{m}$  de largo por 2.5-3.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Produce abundantes clamidosporas a las 4-6 semanas. Son más de 100 formas “especiales” o razas que se han descrito de *F. oxysporum* (Marasas *et al.*, 1984; Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006).

Se ha asociado con varias infecciones en humanos incluyendo infecciones en la cornea, varios tipos de dermatitis, e infecciones internas. Generalmente esta especie no produce micotoxinas aunque sintetizan varios poliketidos en sus metabolitos secundarios aunque se desconoce su función y toxicidad. Algunos aislados pueden producir zearalenona y algunos tricotecenos (Leslie and Summerell, 2006).

## **2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN**

### **2.1. Identificación y caracterización de las especies del género *Fusarium***

Como se dijo anteriormente, la marcada variabilidad de *Fusarium* spp. en cuanto a sus características fisiológicas y morfológicas, explica su capacidad para colonizar diversos nichos ecológicos diseminados por todo el mundo. Esto explica la cantidad de especies descritas por los diversos autores. La mayoría de estas clasificaciones se basan en las características macro y microscópicas del cultivo y se considera un género anamórfico dentro de los Ascomicetes (de Hoog *et al.*, 1998; 2000).

La morfología, pigmentación de la colonia y ausencia o presencia de esporodoquio, esclerocios o estroma en diferentes medios son características que se tienen en cuenta. En medios habituales las colonias presentan un crecimiento rápido, que suele ocupar toda la placa (8-9 cm de diámetro en una semana). El color que desarrollan depende de la especie, y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc., coloraciones que pueden variar según los

diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso (de Hoog, 1998; Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

Habitualmente los medios de cultivo más utilizados con el propósito de identificación son: agar extracto de malta (MEA), en el cual se pueden valorar aspectos morfológicos tanto macroscópicos como microscópicos además de conseguirse una buena esporulación. Con agar patata dextrosa (PDA) se valora muy bien el aspecto morfológico y coloración de la colonia, pero su alto contenido en carbohidratos condiciona un mayor crecimiento en detrimento de la esporulación, que suele retrasarse, y los conidios pueden ser atípicos. El medio agar harina de avena (OA) se utiliza para valorar la velocidad de crecimiento, color, aspecto de la colonia y características microscópicas. Agua agar (WA) es un medio recomendado para la germinación inicial de conidios de cultivos de *Fusarium* spp., y suelo agar (SA), que se usa para formación de clamidosporas, es utilizado para la identificación de algunas especies de *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). Otros medios de cultivo utilizados son: agar clavel (CLA), Cloruro de potasio agar (AKCl), agar arena, agar nutriente sintético (SNA), medio de Komada, entre otros.

La temperatura habitual de incubación puede oscilar entre 24 y 28 °C. La formación de conidios puede estimularse incubando los diferentes medios bajo luz negra (300-400 nm) y también alternando luz y temperatura (25 °C día/20 °C noche) (Leslie and Summerell, 2006).

### **2.2. Estructuras que se tienen en cuenta para la identificación morfológica en especies del género *Fusarium***

Las especies del género *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas llamadas: macroconidio, microconidio y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas, mientras que otras especies no.

El **macroconidio** es el órgano principal para la caracterización, no solamente de la especie si no también del género *Fusarium*; su forma y tamaño varía según la especie. Este se puede formar en una estructura especializada llamada esporodoquio, como también en monofiálides, polifiálides y en el micelio aéreo. Para

algunas especies es una característica relativamente constante y estable, pero se debe utilizar cautelosamente como criterio taxonómico. La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium*, pero varios géneros de *Coelomycetes* también la tienen (Nelson *et al.*, 1983; Seifert, 2001; Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

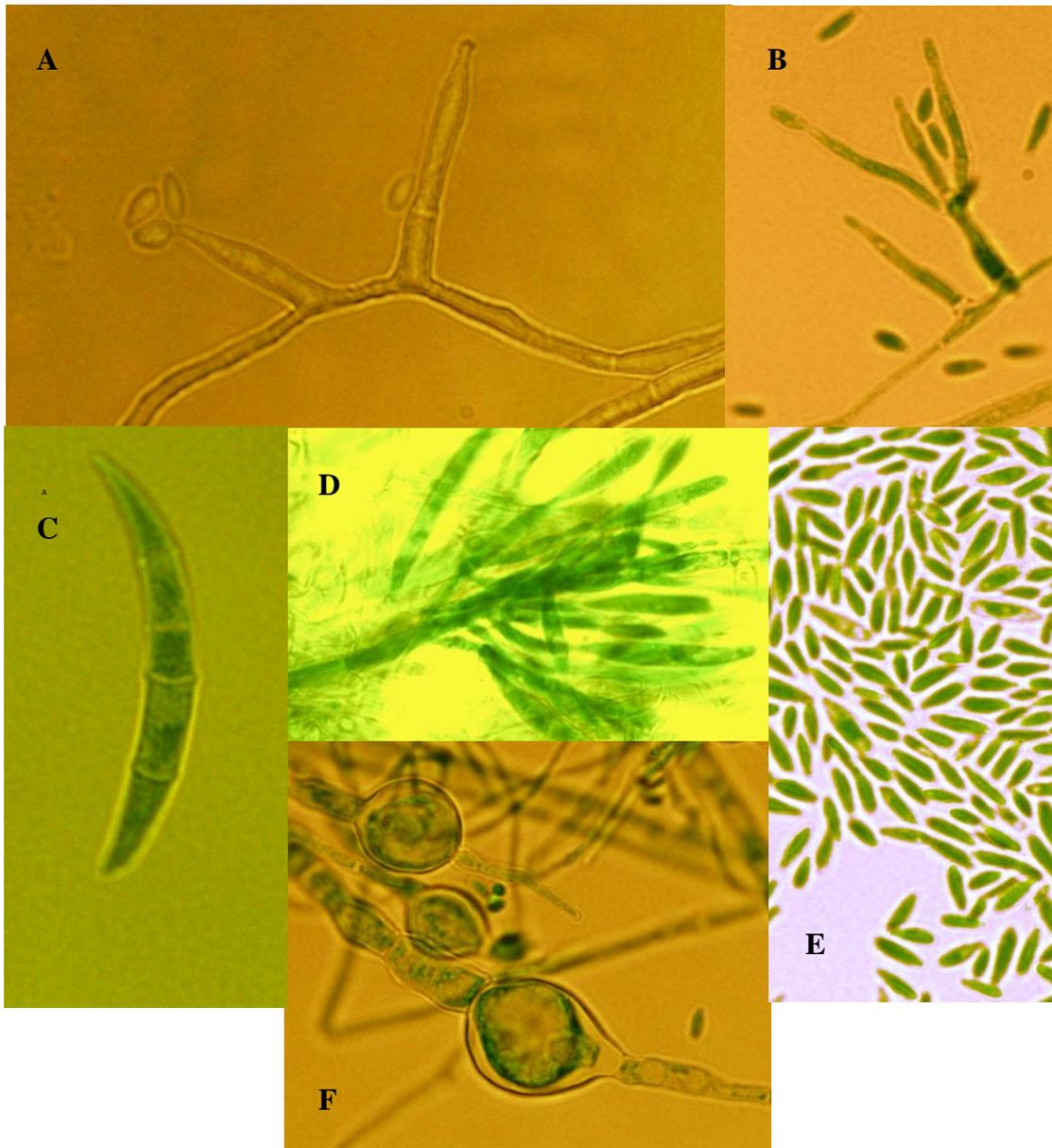
El **microconidio** es un carácter primario en taxonomía del género *Fusarium* y se considera su presencia o ausencia. Si el microconidio está presente, las características consideradas son: forma, modo de formación, si está solo, en falsas cabezas, en cabezas o en cadenas. Estos se forman en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides pero no en el esporodoquio. Se pueden ver aislados, en masas o en cadenas. La forma en la que son producidos se observa mejor en un medio con substrato natural como el agar-clavel (Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

Los **mesoconidios**, anteriormente denominados blastoconidios, son otro tipo de conidios que tienen forma y tamaño similar a los macroconidios pero les falta la célula basal en forma de pie, pueden ser rectos, se forman siempre en polifiálides y son individuales (Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

Otras estructuras como los **conidióforos**, que contienen el microconidio. Es un carácter taxonómico primario y, dependiendo de la especie, se pueden encontrar en monofiálides o contener monofiálides y polifiálides produciendo microconidios (Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006). El **esporodoquio** es una masa de conidióforos cortos y estrechamente ramificados que nacen directamente de una maraña de hifas. Se producen más frecuentemente en la naturaleza que en los cultivos de laboratorio (Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

La presencia o ausencia de **clamidosporas** es un carácter primario en taxonomía de *Fusarium*. Si están presentes, pueden estar solas, en pares, en grupos, o en cadenas. Su pared puede ser gruesa, rugosa o lisa. Es una espora de supervivencia ante ambientes adversos que garantiza la propagación y supervivencia del hongo (Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

También encontramos los **esclerocios**, que son una masa de células duras (difícil de aplastar entre porta y cubre) e inactiva bajo condiciones ambientales desfavorables y el **estroma**, que es una estructura vegetativa compacta dentro de la que se desarrollan cuerpos de fructificación.



Fotografía 1. Estructuras morfológicas del género *Fusarium* A y B: conidióforos, C: Macroconidio, D: macroconidióforo, E: microconidio, F: clamidoesporas (Fotos: E.D. Gómez L).

El acercamiento fenotípico se ha criticado en gran parte por su carencia de terminología estandarizada, estable y su alta subjetividad. Por otra parte, algunas características fenotípicas se han considerado inestables y dependiente de condiciones ambientales, como el crecimiento en cultivos artificiales. Otro problema notable de la clasificación basado en criterios morfológicos es el sistema dual, sin la correlación constante entre la taxonomía de los ascomicetes y los deuteromicetos. Esta es una dificultad importante para establecer las unidades taxonómicas del hongo en su totalidad (Leslie and Summerell, 2006).

En años recientes, las técnicas morfológicas han sido influenciadas por la taxonomía numérica, que permite estudios fenotípicos más fiables. La aplicación de programas informáticos y paquetes estadísticos eficaces al desarrollo de las claves de identificación, ofrecen algunas soluciones y la posibilidad de un renacimiento de los estudios morfológicos. Los analizadores de imagen automatizados, el estudio por microscopía electrónica y la geometría fractal pueden ofrecer mucho en el análisis de la morfología fúngica (Samson *et al.*, 2004; Leslie and Summerell, 2006).

### **2.3. Técnicas fisiológicas y bioquímicas**

Estas técnicas se han utilizado con éxito en el estudio de las levaduras. Diversas temperaturas de crecimiento se han utilizado como herramienta complementaria en la identificación de hongos asexuales y sexuales. El rango de crecimiento en medios definidos bajo condiciones controladas tienen también valor en estudios de géneros complejos tales como *Fusarium* y *Penicillium*. Los kits comercialmente disponibles, tales como el sistema API 20 C AUX<sup>®</sup>, se han utilizado para identificar hongos filamentosos y levaduras. Paterson *et al.* (1994) han publicado una compilación de las técnicas fisiológicas usadas en la identificación de hongos filamentosos y enumeran una gama de métodos bioquímicos que se extiendan desde pruebas en agar hasta métodos cromatográficos y electroforéticos sofisticados (Heard and Fleet, 1990; Deak and Beuchat, 1996)

**2.3.1. Metabolitos secundarios.** Los metabolitos secundarios son compuestos no esenciales para el crecimiento y no son parte del metabolismo primario de organismo, pero probablemente desempeñan cierto papel en la vida de los hongos y

se encuentran generalmente como mezcla de moléculas relacionadas con una estructura química peculiar. Los más comunes son esteroides, terpenos, alcaloides, ciclopeptidos y cumarinas. Algunos de éstos son micotoxigénicos. La producción de metabolitos secundarios ha estado durante mucho tiempo en uso en la identificación y la clasificación de líquenes y se ha utilizado menos en la taxonomía de ascomicetes y basidiomicetes, aunque es bien sabido que estos organismos producen un número extenso de estos compuestos. En estos órdenes, la especie individual se puede reconocer a menudo en base a perfiles particulares de metabolitos (Demain, 1996; Frisvad *et al.*, 1999).

**2.3.2. Ubiquinonas** (coenzima Q). Estos compuestos son importantes en la cadena de transporte de electrones en el sistema respiratorio. El número de unidades del isopreno unidas al núcleo de la quinona varía, y tales diferencias en estructura de la ubiquinona son indicadores excelentes de la clasificación de géneros y de taxa subgenérica en bacterias y levaduras. Aunque esta técnica se ha utilizado en la taxonomía de levaduras, en hongos filamentosos es poco común. Los resultados proporcionados por estas técnicas se correlacionan a veces con lo proporcionado por técnicas moleculares, aunque las conclusiones basadas solamente en la ubiquinona son discutibles, y dependiendo del método usado, pueden proporcionar datos variables (Yamada *et al.*, 1989; Shiosaki *et al.*, 2001)

**2.3.3. Composición de ácidos grasos.** El tipo de ácidos grasos presentes en la célula y su concentración relativa son características útiles para separar taxones, y se determinan rutinariamente en la sistemática bacteriana. Hasta hace poco tiempo, estas técnicas eran utilizadas raramente en taxonomía de hongos, pero en la actualidad estos análisis se utilizan cada vez más para distinguir los hongos. En comparación con las bacterias pocos son los ácidos grasos producidos por los hongos. La espectrometría, cromatografía de gases, y los sistemas bifásicos del polímero acuoso de partición, están entre los métodos usados para determinar estos compuestos. La cromatografía de gases, combinada con métodos de análisis estadístico multivariante se ha utilizado con éxito para estudiar ácidos grasos de numerosos hongos filamentosos, incluyendo oomycetes, zygomycetes, basidiomicetes, e incluso micelio estéril. Estas técnicas también han demostrado

ser útiles a nivel intraespecífico (Kock and Botha, 1999; Madan *et al.*, 2002; Lanoiselet *et al.*, 2005).

**2.3.4. Composición de la pared de celular.** Las diferencias en la estructura y la composición de la pared celular de hongos se han utilizado en la definición de los taxones. Por ejemplo, la celulosa es un componente particular de la fracción alcali insoluble de oomicetes, mientras que los ascomicetes y los basidiomicetes contienen la quitina y glucano en estas fracciones. Por contraste, los zigomicetes tienen ácido quitosano y poliglucurónico. Variaciones significativas en la composición del azúcar de las paredes de célula se han observado en los diversos géneros de dermatofitos (Phaff, 1998; Roeijmans, 1998; Ahrazem *et al.*, 2006).

**2.3.5. Composición proteica.** Refleja la organización genética de un organismo; por lo tanto, el análisis de diferentes perfiles de proteínas se puede utilizar como sistema de identificación o tipificación. Los patrones producidos por técnicas electroforéticas (zymogramas) permiten determinar relaciones entre géneros y distinguir especies. Aparte de la electroforesis, las técnicas inmunológicas también se pueden usar para la caracterización interespecífica. El análisis proteico se considera una técnica económica y práctica, aceptada generalmente para hongos con orígenes genéticos independientes. Los datos de isoenzimas alélicas se utilizan comúnmente en los estudios filogenéticos (Schulze, 2005).

### 3. TÉCNICAS MOLECULARES

Las características morfológicas que se distinguen en un hongo se limitan con frecuencia a permitir su identificación; a ello también se aplican las técnicas fisiológicas y bioquímicas. Sin embargo, en los hongos filamentosos estos métodos son laboriosos, variables y costosos. Avances técnicos importantes han estimulado el uso de técnicas moleculares que son universalmente aplicables, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha permitido el análisis molecular de células fúngicas o aún esporas, material seco, u organismos extintos, como también a la selección de oligonucleótidos específicos para hongos, que ha proporcionado el acceso fácil a las secuencias del ADN (Olive and Bean, 1999; Wassenaar and Newell, 2000; Leslie and Summerell, 2006).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, los estudios moleculares en hongos apuntan a: (i) estudios filogenéticos, (ii) estudios taxonómicos, sobre todo a nivel de géneros y de especies; (iii) usos de diagnóstico; y (iv) epidemiología y genética de la población. Cada una de estas orientaciones generales y niveles de diversidad, tiene su propio sistema de técnicas (Crous, 2005).

### 3.1. ADN ribosómico

La principal razón del uso del ADN ribosomal (ADNr) es que en eucariotas el ADNr usualmente está formado por varias cientos de copias repetidas en tándem de una unidad de transcripción, más varios espacios adyacentes no transcritos. El número de copias puede variar según el organismo. Además, existen fragmentos con distinto grado de conservación entre los organismos, como los genes 18S, 5.8S y 28S, y regiones variables, los espacios intergénicos (IGS) y las regiones internas que se transcriben (*internal transcribed spacers* o ITS). Estas regiones son variables en su composición y tamaño, lo cual sirve como una herramienta en la identificación, diferenciación y clasificación de hongos, y permite realizar estudios a diferentes niveles, como discriminar entre géneros, especies o a nivel intraespecífico. Otra característica que lo hace importante es que las regiones que lo componen poseen una evolución desigual, es decir, la tasa de sustitución nucleotídica presenta ritmos diferentes en las distintas regiones (Luque y Herráez, 2002). Además, los ribosomas están presentes en todos los organismos, con un origen evolutivo común. Hay secuencias de la molécula de ARNr que se conservan y sirven de referencia para la divergencia evolutiva (O'Donnell, 1992; Radford, 1993; Tsai *et al.*, 1994).

Para análisis filogenéticos las regiones comúnmente secuenciadas y comparadas son las porciones del ADNr, incluyendo los ITS1 y ITS2, IGS y el 18S y 28S. Estas regiones están altamente conservadas en una especie y son variables entre especies (Desjardins, 2006).

Los dominios variables 28S son informativos y permiten comparaciones de altos niveles taxonómicos, aunque solamente hay un número limitado de posiciones variables (Hernández, 2005; Martorell, 2006).

El gen 18S, se ha utilizado totalmente o en subunidades en estudios filogenéticos a nivel de órdenes o familias en hongos filamentosos. Bago *et al.*, 1998 señalan la existencia de distintos sitios informativos en este gen que pueden ser utilizados como "marcadores moleculares" que permitan discriminar y agrupar cepas a nivel de género (Okada *et al.*, 1997; de Hoog *et al.*, 1998; Bago *et al.*, 1998).

El gen 5.8S ADNr es fácilmente secuenciado por su tamaño (158-164 pb). Su uso para la realización de estudios filogénicos es limitado debido a la poca variabilidad e información que aporta el gen, por ello no es válido para estudios de especies cercanamente relacionadas (Martorell, 2006).

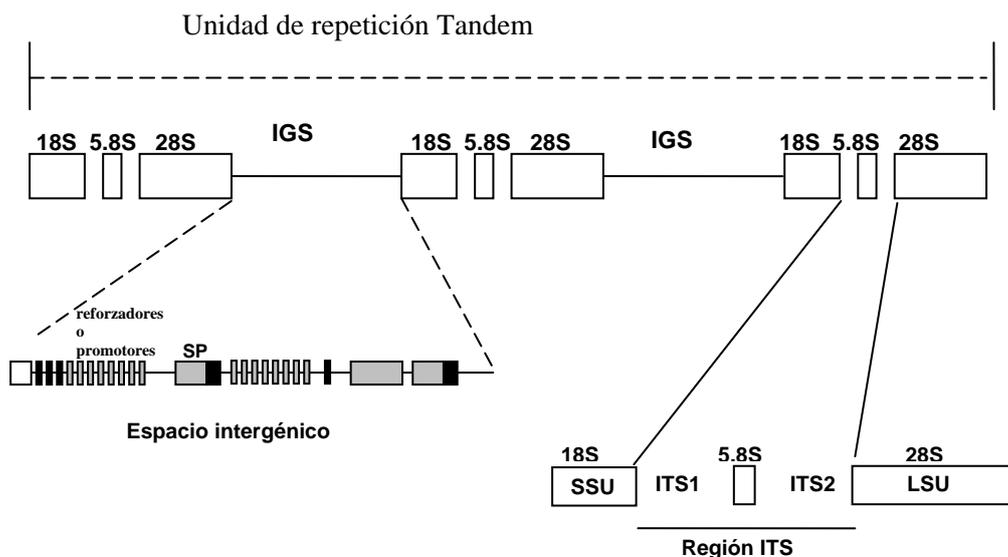
### **3.1.1. Región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) y Región Espaciadora Intergénica IGS**

La región ITS es una pequeña región espaciadora altamente polimórfica utilizada para estudios filogenéticos y taxonómicos, que consiste en dos fragmentos transcritos que se encuentran entre los genes nucleares 18S, 5.8S y 28S que codifican para el ARNr. Estos fragmentos son altamente variables, por lo cual se utilizan para estudiar las relaciones a nivel de especies y géneros cercanos, pero con mayor dificultad a nivel de familias distintas. Además, estos genes generalmente se encuentran juntos en una o varias series de tándem de una unidad de repetición (ADNr), que consiste en tres regiones de codificación separadas por espaciadores intergénicos (IGS).

Entre las secuencias altamente conservadas de esta región se encuentran también regiones variables, tales como los espaciadores internos ITS1 y ITS2, que son regiones no codificantes pero que se transcriben dentro de la unidad transcripcional. Individualmente, los ITS1 y ITS2 poseen un tamaño aproximado de 300 pb y el 5.8S ADNr es pequeño (158-164pb), haciendo la región entera ITS de 700 pb. Aunque ITS1 y ITS2 son parte de la unidad transcriptora ribosomal, estas secuencias no se incorporan en los ribosomas maduros. Dada la corta longitud y la naturaleza altamente conservada de los genes ribosomales de la subunidad que flanquean la región ITS, esta es amplificada fácilmente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Baldwin, 1992).

Por otra parte, esta región del ADNr experimenta una evolución relativamente rápida. Esta característica de la región ITS es la más importante desde el punto de vista filogenético y permite la reconstrucción exacta de las relaciones de la especie. Sin embargo, las copias de ADNr no homólogas están de vez en cuando presentes con mutaciones puntuales y/o con accidentes de inserción/borrado, causando una pequeña variación entre las copias dentro de una especie (Baldwin *et al.*, 1995).

Se ha comprobado que filogenéticamente, la región ITS1 posee más información que la región ITS2 en promedio, por poseer alrededor del 29% más nucleótidos variables. Los árboles filogenéticos basados en ITS1 o ITS2 solamente pueden indicar relaciones que no pueden ser representadas por el otro espaciador. Combinando los resultados de ITS1 y de ITS2, resultan árboles filogenéticos más robustos y más completos (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995).



**Figura 1. Región Espaciadora intergénica IGS y Región Transcritora Interna (ITS). Adaptado de Weider *et al.*, 2005**

La región espaciadora IGS incluye dos regiones espaciadoras externas ETS1 y ETS2 que no codifican, las cuales se pueden o no transcribir. Esta región contiene altos niveles de variabilidad de secuencia entre especies del mismo género y permite la diferenciación entre especies cercanas genéticamente relacionadas, en contraste con la región ITS que no presenta suficientes polimorfismos para permitir

el diseño de ensayos de este tipo (Abd-Elsalam *et al.*, 2003; Hatsch *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2005; Weider *et al.*, 2005).

Basándose en el análisis de la región IGS, se ha trabajado en la variabilidad intraespecífica en la producción de fumonisina, analizando el grado de semejanza en aislamientos dentro de la especie *F. verticillioides* y la relación de otras poblaciones estrechamente relacionadas dentro del complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*. También se han diseñado iniciadores específicos para detectar cepas productoras de fumonisinas (Patiño *et al.*, 2004, 2006).

Tanto la región IGS como la ITS han sido usadas para la elaboración de árboles filogenéticos de hongos filamentosos, así como para la identificación de cepas micotoxigénicas de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Uno de los enfoques fundamentales que ha dominado en este tipo de estudios ha sido el comparar los patrones de bandas generados por medio de amplificación de secuencias de ADN de las regiones de los espaciadores intragénicos transcritos ITS1 y ITS2 (Yli-Mattila *et al.*, 2004; González-Salgado *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2005).

### **3.1.2. Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP))**

La técnica PCR-RFLP consiste en la amplificación por PCR de una secuencia conocida del ADN, utilizando dos iniciadores homólogos en sus regiones extremas. Las secuencias de ADN amplificadas por PCR son digeridas por los llamados enzimas de restricción. Estas reconocen una secuencia de ADN y cortan las cadenas de ADN original en los puntos donde esté dicha secuencia, normalmente las secuencias son palindrómicas y las enzimas de restricción cortan las dos cadenas de ADN. Se obtienen fragmentos de diferentes tamaños, los cuales son visualizados en un gel de agarosa aplicando la técnica de electroforesis, en la que se genera un desplazamiento de los fragmentos de ADN después de aplicarles una diferencia de potencial eléctrico. El desplazamiento está en función del tamaño de los fragmentos, por lo que podemos basarnos en esta medición y en la cantidad de fragmentos para identificar parcialmente la muestra. Debido a que los patrones de

restricción se forman con base solamente al tamaño de los fragmentos de ADN generados y su número, es posible tener patrones de restricción iguales para hongos diferentes por lo que es necesario utilizar otras enzimas que discriminen esos hongos generando patrones diferentes (Hausner *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001).

Las endonucleasas de restricción son obtenidas principalmente de organismos procarióticos, que reconocen una secuencia entre 4-8 pb en ADN. El sitio de reconocimiento se llama sitio o diana de restricción y su principal función es cortar las dos cadenas de ADN en determinadas secuencias de nucleótidos. Existen más de 2300 endonucleasas de restricción disponibles para la tipificación (Mirhendi *et al.*, 2001; Hausner *et al.*, 2000). En hongos las más utilizadas son: *AluI*, *HhaI*, *HapII*, *MboI*, *EcoRI*, *PstI*, *XhoI*, *BsuRI*; *CfoI*, *BglII*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HincII*, *HindIII*, *HinfI*, *KpnI*, *MspI*, *NruI*, *PstI*, *SalI*, *SacI*, *Sau3AI*, *SmaI*, *SphI*, *StuI*, *TaqI*, *XbaI*, *NotI*, *RsaI* (Ferrer *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Mirhendi *et al.*, 2001; Carter *et al.*, 2002; De las Heras, 2004; Desjardins, 2006; Patiño *et al.*, 2006; Llorens *et al.*, 2006).

La aplicación de esta técnica en la región IGS del ADNr ha permitido agrupar, con un alto grado de similitud aislados de las especies *F. culmorum*, *F. graminearum*, y *F. crookwellense* como también para distinguir aislados de *G. fujikuroi* en diferentes hospedadores, así mismo en la identificación de especies del género *Fusarium* y estudios filogenéticos de *F. poae*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* y *F. kyushuense* (Mishra *et al.*, 2002; Hinojo *et al.*, 2004; Konstantinova and Yli-Mattila 2004). Así mismo, Patiño *et al.* (2006) hacen una caracterización y estudios filogenéticos de aislados de *F. verticillioides* analizando esta misma región. Esta técnica se ha usado también en la construcción del mapa genético de *G. fujikuroi* (Xu and Leslie, 1996). Y se ha utilizado con éxito en la diferenciación de *F. equiseti* aislados de cereales en Noruega, como también en variación intraespecífica en poblaciones de *F. culmorum* (Mishra *et al.*, 2002; Kosiak *et al.*, 2005).

Se considera una técnica rápida, sencilla, que no requiere de reactivos y equipamiento excesivamente costosos. Estas características hacen que sea una técnica de subtipificación muy aceptada (Soll, 2000; Moore *et al.*, 2002).

### 3.1.3. Secuenciación de nucleótidos

La secuenciación es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) que conforman una molécula de ADN. La importancia de poseer la secuencia del genoma de un organismo está relacionada con las posibilidades de manipulación de su información genética. Pues con la secuencia completa del genoma se tiene, al menos en teoría, acceso a todas las características que definen a un individuo (Woese, 2000; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Se han desarrollado varios métodos de secuenciación empezando con los métodos clásicos dentro de los que se encuentran: el método químico de Maxam y Gilbert y el método enzimático de Sanger. Se ha desarrollado la secuenciación automática empleando el método enzimático, ya sea con cebadores fluorescentes o con terminales fluorescentes, también se encuentran los secuenciadores automáticos que emplean capilares ó geles desnaturizantes, hasta tal punto que la secuenciación comparativa de genes homólogos es ahora un procedimiento estándar en la taxonomía, ya que la clasificación de microorganismos a nivel de especie, requiere el uso de métodos exactos e informativos, para la determinación precisa de las secuencias de nucleótidos (Woese, 2000; Stackebrandt *et al.*, 2002).

El concepto de homología sostiene que los análisis filogenéticos, pueden ser estimados por cambios en la secuencia del nucleótido de los genes homólogos de cepas representativas (cepas tipo) (Fitch, 2000; Baldauf, 2003). La elección de la macromolécula para ser secuenciada depende del rango taxonómico en consideración. Es así, como los genes conservados son usados para establecer relaciones en niveles taxonómicos más altos, como el género, la familia y orden, mientras que genes menos conservados o sumamente variables son usados para comparar organismos a nivel de especie y a niveles subespecíficos (Versalovic *et al.*, 1994; Gürtler and Mayall, 2001; Ludwig and Klenk, 2001).

### 4. MICOTOXINAS

Son productos naturales de bajo peso molecular, producidas como metabolitos secundarios por hongos, llegando a contaminar cereales y otros productos alimenticios, produciendo enfermedades y muerte en el hombre y otros vertebrados. Estos metabolitos secundarios no son necesarios para el crecimiento o reproducción del hongo en cuestión, a diferencia de los metabolitos primarios. Hasta el momento no se conoce bien la función biológica de los metabolitos secundarios, sin embargo, confieren ventajas selectivas, como aumentar la habilidad para competir con otros microorganismos por el sustrato e incrementar la capacidad parásita para infectar al hospedador, siendo muy activas frente a plantas (fitotoxinas), animales (micotoxinas) y microorganismos (antibióticos) inhibiendo su crecimiento e incluso produciendo su muerte cuando compiten con éstos por los nutrientes y por el hábitat. Por lo tanto, las micotoxinas se constituyen en factores de riesgo para la sanidad humana y animal (Bennett and Klich, 2003; Jestoi *et al.*, 2004b).

La mayoría de las micotoxinas de importancia agrícola son producidas principalmente por cuatro géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Estos géneros causan grandes pérdidas económicas en los cultivos de cereales y en procesos de alimentación. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) estima que entre el 10-30% de los granos cosechados se pierden debido a la infección por hongos y que aproximadamente un 25% de los cultivos de cereales del mundo están contaminados por micotoxinas (Cirillo *et al.*, 2003; Samson *et al.*, 2004). El grado de infección de los hongos que colonizan cereales en campo dependerá de varios factores, por ejemplo la temperatura, la humedad, la precipitación durante anthesis y poscosecha, el tratamiento de suelo y la rotación de cultivos (Snijders and Perkowski, 1990; Mesterhazy *et al.*, 1999).

#### 4.1. Historia de la Micotoxicosis

Las enfermedades producidas por la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas se denomina micotoxicosis, distinguiéndose dos tipos: micotoxicosis primaria, producida por el consumo directo de productos directamente contaminados

por el hongo y micotoxicosis secundaria, producida por el consumo de productos no directamente contaminados por el hongo, pero a los que han llegado las micotoxinas a través de la cadena alimentaria, como la carne y leche (Torondel, 2001; Bennett and Klich, 2003).

El conocimiento de la existencia de enfermedades en el hombre y animales domésticos, asociados al crecimiento de hongos en los alimentos, data de siglos atrás. En los siglos VII y VIII a.C. se instauró el festival de las “Robigalia” en honor al Dios Robigus, a quien era necesario alabar para proteger el grano y los árboles. Se celebra el 25 de abril, por esa época del año era más probable que las cosechas resultaran atacadas por roñas o mildú (Latorre, 2004).

En la edad media, los brotes de ergotismo, enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados con el cornezuelo del centeno, alcanzaron proporciones de epidemia. Se decía que las personas eran consumidas por el fuego sagrado y se ennegrecían como el carbón, por la inmensa sensación de quemazón que padecían las personas afectadas, por lo que la enfermedad se denominó “fuego sagrado” o “fuego de San Antonio”, en honor al beato en cuyo santuario se buscaba la curación (Zavaleta *et al.*, 2001). Las víctimas del ergotismo estaban expuestas a la dietilamida del ácido lisérgico (LSD o LSD-25), sustancia alucinógena que se producía durante el horneado del pan elaborado con trigo contaminado por cornezuelo del centeno y otras toxinas alucinógenas ergóticas. Alcaloides de la belladona procedentes del fruto de la mandrágora eran utilizados para tratar el ergotismo (Van Dongen *et al.*, 1995). Sólo en 1815 fue posible determinar la naturaleza fúngica del parásito del cornezuelo del centeno y en 1875 se identificaron los componentes tóxicos del hongo *Claviceps purpurea* como responsables del ergotismo (Laval, 2004).

Se sugiere que la última plaga, la muerte de los primogénitos mencionada en la Biblia, pudo deberse al consumo de cereales contaminados en gran medida no por las micotoxinas del género *Claviceps*, sino por tricotecenos, y que por razones culturales consumían en primer lugar los hombres mayores e hijos varones, lo que dio lugar a hemorragias y muerte (Soriano, 2007).

Durante la segunda guerra mundial, en 1940, el distrito de Orenburg (antigua URSS) se vio afectado por una epidemia de aleukia (leucopenia) tóxica alimentaria (ATA), debido al consumo de mijo contaminado. La enfermedad se caracteriza por manchas en la piel, angina necrótica, leucopenia extrema, múltiples hemorragias, agotamiento de la médula ósea y disminución de los glóbulos blancos. Se produjeron gran número de muertes, llegando hasta el 10 % de la población en algunas de las comarcas. La micotoxina que produce esta enfermedad fue aislada de *F. sporotrichioides* y más tarde de *F. poae* en trigo y se le denomina toxina T-2 (Laval, 2004; Doi *et al.*, 2006).

En 1960, la aparición de una enfermedad en granjas de pavos en Inglaterra, que llevó a la muerte a más de 100.000 de ellos, hizo cambiar la actitud adoptada frente a los hongos en los alimentos humanos y animales. La micotoxicosis fue denominada “enfermedad X” y el origen se encontró en tortas de prensado de cacahuets mezclado en el pienso. Se detectó el hongo responsable, *Aspergillus flavus*, y también fueron aislados los metabolitos tóxicos, las aflatoxinas. Pero fue a partir de 1961, con el aislamiento de dichas micotoxinas, cuando se evidenció la importancia de los hongos saprofitos en el desarrollo de procesos patológicos en animales y la posible conexión en la patología humana (Bennett and Klich, 2003).

A raíz de las observaciones anteriores, tanto la medicina humana como la veterinaria han dado cada vez más importancia a las micotoxinas, sobre todo después de saber que, cantidades muy pequeñas pueden comprometer no sólo la salud animal, sino también la salud humana.

## **5. MICOTOXINAS MÁS FRECUENTES PRODUCIDAS POR *Fusarium* spp.**

### **5.1. Tricotecenos**

Los tricotecenos son metabolitos fúngicos de la familia de los sesquiterpenoides, caracterizados por un núcleo 12,13-epoxitricotec-9-eno tetracíclico. Constituyen un grupo de aproximadamente 180 sesquiterpenos, agrupados en 4 tipos, A, B, C y D en función de los grupos funcionales, que tienen diferentes constituyentes en las posiciones 3, 4, 7, 8 y 15 de la molécula. Sus

estructuras químicas varían en función de la posición y número de grupos hidroxilos así como del número, posición y complejidad de las esterificaciones. El anillo 12, 13 epoxitricotec, el C-9 y 10 se consideran importantes para su toxicidad (Desjardins *et al.*, 1993; Eriksen and Pettersson, 2004).

El primer miembro conocido de este grupo fue la “tricotecina”, aislada de *Trichothecium roseum* en 1948 por Freeman y Morison, originalmente descubierta como antifúngico. Su estructura química no se determinó hasta quince años después (Josephs *et al.*, 2004; Eriksen *et al.*, 2004). Hoy en día se sabe que los tricotecenos más comunes son: el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, toxina HT-2, toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS). Aunque se han identificado más de 45 compuestos de tricotecenos relacionados estructuralmente, los estudios toxicológicos más importantes han sido realizados con toxina HT-2, toxina T-2, deoxinivalenol (DON) y diacetoxiscirpenol (DAS) (Krska *et al.*, 2001; Desjardins, 2006).

Se ha demostrado que la contaminación por tricotecenos se produce generalmente en cereales como el maíz, trigo, cebada, avena, arroz, y productos derivados de éstos (cereales de desayuno, aperitivos, cerveza, etc.) y los materiales ricos en celulosa como son la paja y el heno ( Al-Julaifi and Al- Falih, 2001). También son conocidas la aparición en sorgo, patatas, bananas y semillas de girasol, entre otros. Dentro de los cereales existen cultivos más propensos a sufrir el ataque de determinadas especies de *Fusarium*, tal es el caso de la fuerte afinidad por parte de *F. graminearum* hacia el cultivo del maíz. Una de las razones de esta afinidad podría recaer en la mayor estabilidad física de los tallos del maíz, en oposición a las cañas de cultivos como el trigo o similares (Obst *et al.*, 1997).

Este tipo micotoxinas no solamente es producido por hongos del género *Fusarium*, que son los principales productores de tricotecenos, sino por una diferente gama de hongos, entre los que se encuentran los géneros *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* y *Stachybotrys* (Ueno, 1983; Ehrlich and Daigle, 1987; Gledhill *et al.*, 1991).

### 5.1.1. Estructura química de los tricotecenos

Los tricotecenos son divididos en cuatro categorías según el grupo funcional, los no macrocíclicos son: tipo A, B y C, y el macrocíclico tipo D (Ueno, 1977; 1985). El Tipo A tiene un hidrógeno, hidroxilo o una función éster en el carbono 8. Este es el grupo más grande e incluye toxinas como: toxina T-2, toxina HT-2, diacetoxiscirpenol DAS y neosolaniol (NEO). Se encuentran sobre todo, en cereales y derivados contaminados por cepas del género *Fusarium*, principalmente *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* y *F. poae*. El tipo B contiene una función carbonilo en el carbono 8 e incluye tricotecenos como deoxinivalenol (DON) el más extendido, nivalenol (NIV), toxinas como 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol y fusarenon X. Producidos por cepas del género *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. crookwellense* (Logrieco *et al.*, 2003), la tercera categoría Tipo C posee un grupo funcional epóxido entre los carbonos 7, 8 ó 9, 10. Generalmente son producidos por los géneros *Acremonium* y *Tricothecium*. La cuarta categoría o Tipo D contienen un anillo macrocíclico entre el carbono 4 y 15 con dos acoplamiento éster, y son producidos por hongos del género *Myrothecium*, *Stachybotrys* y *Tricothecium* (Desjardins, 2006; Desjardins *et al.*, 2008) Tabla 2.

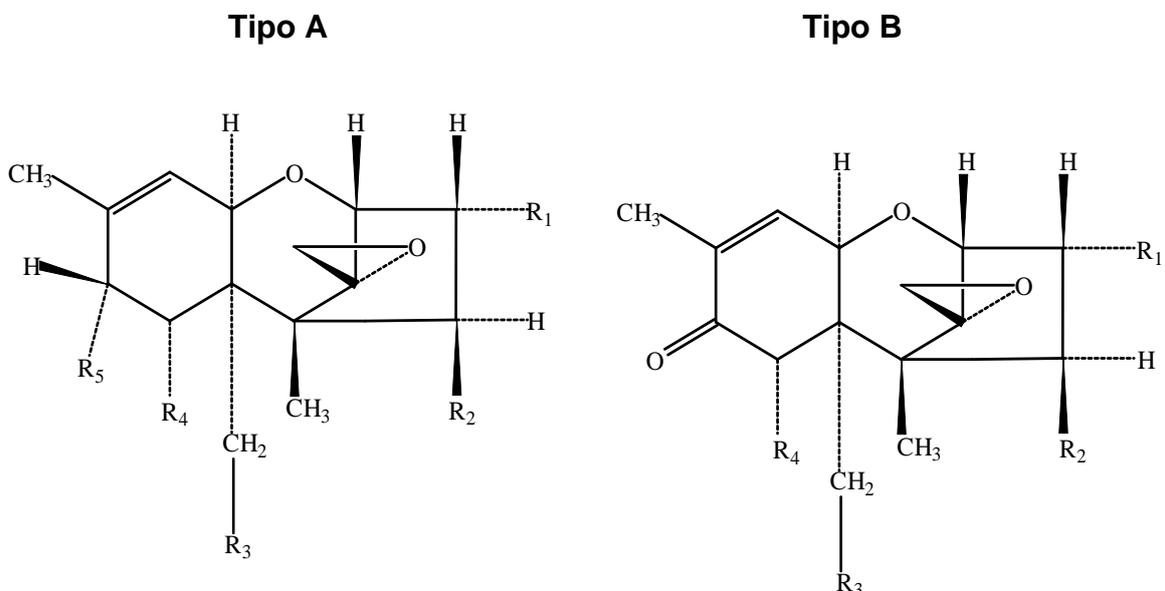


Figura 2. Estructura química de los tricotecenos tipo A y B

**Tabla 2. Estructuras químicas de los sustituyentes R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> de los tricotecenos Tipo A y Tipo B**

Tricoteceno	Sustituyentes en				
	C-3 (R <sub>1</sub> )	C-4 (R <sub>2</sub> )	C-15 (R <sub>3</sub> )	C-7 (R <sub>4</sub> )	C-8 (R <sub>5</sub> )
<b>Tipo A</b>					
Toxina T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Toxina HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Acetyl T-2 toxina	OAc	OAc	OAc	H	O-Isoval
T-2 triol	OH	OH	OH	H	O-Isoval
T-2 tetraol	OH	OH	OH	H	OH
8-acetoxineosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OAc
Acuminatina	OH	OH	OAc	H	OAc
Tetracetoxo T-2 tetraol	OAc	OAc	OAc	H	OAc
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH
4,8-diacetoxo T-2 tetraol	OH	OAc	OH	H	OAc
Diacetoxiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
<b>Tipo B</b>					
Fusarenon-X	OH	OAc	OH	OH	=O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O
Deoxinivalenol	OH	H	OH	OH	=O
15-acetyldeoxinivalenol	OH	H	OAc	OH	=O
3-acetyldeoxinivalenol	OAc	H	OH	OH	=O

Ueno, 1977; Forsell and Pestka, 1985; Betina, 1989; Feinberg and Mclaughlin, 1989; Weidenbömer, 2001

### 5.1.2. Propiedades Físico-Químicas de los tricotecenos

Los tricotecenos son incoloros, cristalinos, químicamente estables (Ueno, 1983) y con actividad óptica. Los de tipo A (T-2, HT-2, DAS), B (DON, NIV y fusarenon X) y C no tienen propiedades de absorción ultravioleta, por tanto no se observa fluorescencia bajo lámpara de 366 nm.

No son volátiles y por ello es necesaria su derivatización para poder detectarlos en cromatografía de gases. Son las micotoxinas más activas bioquímicamente, muy solubles en agua y pueden hallarse en forma de aerosoles en el medio ambiente. En solución diluida son estables bajo la acción de la luz, al contrario de las aflatoxinas, que se degradan (Cossette *et al.*, 1992). Son estables en el medio ambiente, se sabe que son resistentes a la presión, calor de cocción, autoclavado 120 °C (Hughes *et al.*, 1999; Lauren and Smith, 2001), a la molienda y a otros procesos a los que son sometidos los sustratos contaminados para la elaboración de productos derivados como piensos (Lori y Rizzo, 2007).

La toxina T-2 y el DAS son solubles en solventes no polares (acetil acetato y dietil éter), mientras que el DON y el NIV son solubles en solventes polares tales como acetonitrilo, metanol, acetato de etilo y ligeramente solubles en agua y agua con cloroformo (Alonso *et al.*, 2002).

### 5.1.3. Toxicidad de los Tricotecenos

En general los tricotecenos provocan una amplia variedad de efectos tóxicos en animales y humanos, incluyendo mortalidad, irritación, necrosis gastrointestinal y de piel, desordenes hematológicos (inicialmente leucocitosis seguida de leucopenia), diarreas, vómitos, pérdida de apetito, dolores de cabeza, vértigos, pérdida de coordinación muscular y letargo (D'Mello *et al.*, 1999; Josephs *et al.*, 2004). Con un consumo continuado de alimentos contaminados, los tricotecenos pueden suprimir la función inmune, provocando la pérdida de resistencia frente a enfermedades, hipersensibilidad y otras alteraciones inmunológicas (Scott, 1989; IARC, 1993; Rotter *et al.*, 1996; JECFA, 2001a).

Bioquímicamente, son altamente tóxicos a nivel subcelular, celular y orgánico. Son citotóxicos sobre células eucariotas, causando lisis celular e inhibición de mitosis. Las principales propiedades tóxicas están atribuidas a la presencia del grupo 12,13-epóxido que se une irreversiblemente a la subunidad ribosomal 60S en mamíferos, originando una inhibición de la síntesis de proteínas. Los tricotecenos son especialmente tóxicos en tejidos con un alto ratio de división celular, provocando lesiones en células del timo, bazo, médula ósea, ovarios, ganglios linfáticos y mucosa intestinal (Eriksen and Pettersson, 2004).

Además de su toxicidad en vertebrados, los tricotecenos han estado implicados en factores de virulencia en algunas enfermedades de plantas (Desjardins *et al.*, 1993).

### 5.1.4. Deoxinivalenol (DON)

Químicamente se denomina 12,13-epoxi-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,15-trihidroxitricotec-9-ene-8-ona. Su peso molecular es de 296.3 gmol<sup>-1</sup> y corresponde a la fórmula molecular

$C_{15}H_{20}O_6$ . Cristaliza como agujas sin color con un punto de fusión de 151-153 °C. Fue aislado y caracterizado de hongos procedentes de maíz en Japón (Yoshizawa and Morooka, 1975). Posee dos derivados acetilados, 3-acetildesoxinivalenol (3-AcDON) 3 $\alpha$ -acetoxi-7 $\alpha$ ,15-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-ene-8-one un compuesto de fórmula molecular  $C_{17}H_{22}O_7$  y punto de fusión entre 185-187 °C y 15-acetildesoxinivalenol (15-AcDON) 15-acetoxi-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-12,13epoxitricotec-9-en-8-one, cuya fórmula molecular es  $C_{17}H_{22}O_7$  y puntos de fusión entre 138-140 °C. Ambos metabolitos son solventes en metabolitos orgánicos polares como el acetonitrilo, metanol y acetato de etilo, ligeramente solubles en agua y cloroformo (Eriksen and Alexander, 1998; Wolf-Hall *et al.*, 1999; Eriksen *et al.*, 2004).

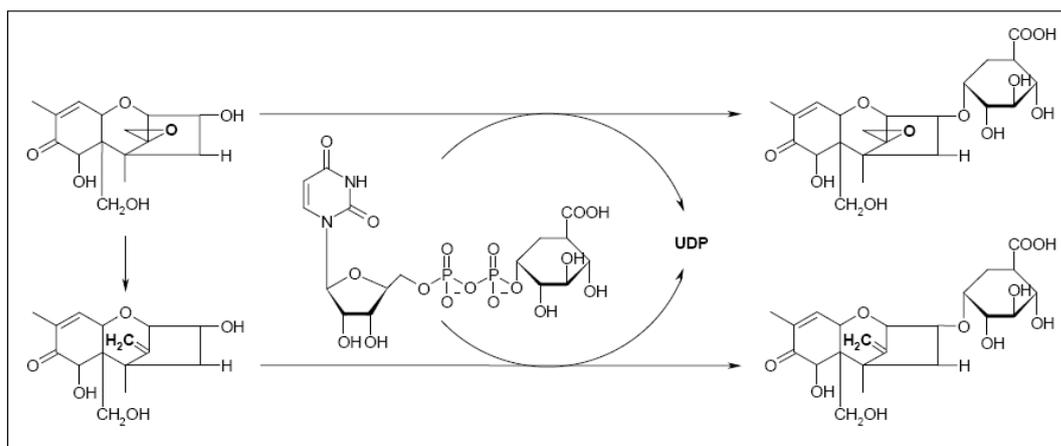
Es producido principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*. El último tiene un crecimiento óptimo a 21 °C y se encuentra principalmente en Escandinavia y Norte de Europa, mientras que *F. graminearum* tiene un crecimiento óptimo a 25 °C y es más extendido en climas más cálidos, por ejemplo Norte América, China y Japón (Scott, 1989; Placinta *et al.*, 1999; JECFA, 2001a).

El deoxinivalenol, es probablemente la micotoxina más común producida por algunas especies de *Fusarium*, contamina diversos cereales como el maíz, trigo, arroz, centeno, cebada y granos procesados como cereales de desayuno, aperitivos extrusionados y fritos, malta, cerveza y pan, tanto en países desarrollados como en desarrollo (European Commission, 1999).

Debido a los brotes de síndromes eméticos en el ganado ocasionados por la presencia de deoxinivalenol en los piensos, se conoce vulgarmente como vomitoxina (Omurtag and Beyoglu, 2003). Químicamente pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos y en concreto a los de tipo B, que se caracterizan por tener un carbonilo en el carbono 8. Es un componente muy estable durante el almacenamiento, molienda y procesado para la obtención de alimentos, es estable a 121 °C, moderadamente estable a 180 °C y parcialmente estable a 210 °C. Se logra una completa inactivación a 370 °C por 10 min., o a 205 °C por 30 min. Se mantiene estable bajo condiciones ligeramente ácidas y la inactivación química se logra con

una solución de hipoclorito de sodio al 3-5% (Ehling *et al.*, 1997; Cirillo *et al.*, 2003b; Hazel and Patel, 2004; Lori y Rizzo, 2007).

El deoxinivalenol inhibe la síntesis de ADN, ARN y la síntesis de proteínas a nivel ribosomal. La toxina tiene un efecto hemolítico en eritrocitos. A altas dosis puede inducir émesis (vómitos) en cerdos, mientras que bajas concentraciones en la dieta reducen el crecimiento y el consumo de alimentos (anorexia) (Trenholm *et al.*, 1989) Fig. 3.



**Figura 3. Metabolismo de DON en el sistema digestivo** (Yoshizawa *et al.*, 1983)

Datos de la Comisión Europea (1999) indican que la toxicidad oral aguda del deoxinivalenol se estudia mediante experimentos realizados sobre diversos animales. Así pues, se estiman valores de  $DL_{50}$  (dosis de micotoxina a la cual muere el 50% de los individuos expuestos) entre 46 y 78 mg/kg peso corporal para ratones. Para los cerdos, la mínima dosis que provoca efectos eméticos oscila entre 0.05-0.2 mg/kg peso corporal. Los efectos críticos que produce esta micotoxina se basan en el índice NOAEL (Non Observed Adverse Effects Level / estimación del nivel de micotoxina al cual no se observan efectos tóxicos) cuyos valores se encuentran entre 0.04-0.375 mg/kg peso corporal/día, en ratones y cerdos.

Con respecto a la toxicidad en humanos, la infección de trigo en la India en el año 1989, afectó a 50.000 personas. En ese momento se estimó un NOAEL de 0.44  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal, usando una media de consumo en trigo de 67 g y un peso corporal medio de 53 kg. También es conocido que los granos de cereales

contaminados con deoxinivalenol a niveles entre 3 y 93 mg/kg han sido relacionados con micotoxicosis agudas en Japón, India y China con un cuadro sintomático de náuseas, vómitos, trastornos gastrointestinales, vértigos y dolor de cabeza (Anadón *et al.*, 2005). Otros síntomas descritos en humanos incluyen dolor abdominal, vértigo, dolor de cabeza, diarrea e irritación de garganta entre otros.

La presencia de DON en alimentos ha sido sujeto de varias revisiones (Scott, 1989; Placinta *et al.*, 1999). Una compilación exhaustiva de DON en cereales ha sido preparada por JECFA (2001a) donde en un promedio mundial, este tricoteceno ha sido encontrado en el 57 % de las muestras de trigo, el 40% de las muestras de maíz, el 68 % de las muestras de avena, el 59% de muestras de cebada, el 49 % de muestras de centeno y el 27 % de las muestras de arroz. DON también fue encontrado en productos de trigo y maíz, por ejemplo harina, pan y cereales de desayuno. Las concentraciones de DON en muestras de cereal mostraron grandes variaciones anuales, concentraciones en los límites de detección (5-50 µg/kg) a más de 30 mg/kg (JECFA, 2001a). Según Trucksess *et al.*, (1995), aproximadamente el 40 % de las muestras de trigo y el 57 % de las muestras de cebada de la cosecha 1993 en EE. UU contenía DON que excedían los niveles para el consumo humano.

#### 5.1.5. Nivalenol (NIV)

Es otra de las moléculas pertenecientes a los tricotecenos B y junto con DON constituyen dos compuestos altamente tóxicos. Químicamente se denomina tricotec-9-en8-one,12,13-epoxi-3,4,7,15-tetahidroxi-,(3- $\alpha$ ,4- $\beta$ ,7- $\alpha$ ), su fórmula molecular es C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> y su punto de fusión se encuentra entre 222- 223 °C.

*F. crookwellense* y *F. poae* son los principales productores de nivalenol, aunque también lo producen otras especies como *F. culmorum* y *F. graminearum* (Eriksen and Alexander, 1998). El nivalenol fue aislado de *F. nivale* Fn2B, que posteriormente se reclasificó como de *F. tricinctum*. Las especies de *Fusarium* antes mencionados afectan comúnmente a varios cereales (trigo, maíz, cebada, avena y arroz) y alimentos procesados (malta, cerveza, pan, cereales de desayuno y aperitivos) (European Comisión, 2000).

Se han llevado a cabo pocos estudios para poder elaborar los mecanismos de toxicidad del nivalenol. Es conocido que inhibe *in vitro* la síntesis de proteínas en conejos, con una DL<sub>50</sub> de 2,5 µg/mL, probablemente por interferir en la función ribosomal. También inhibe la síntesis de ácidos nucleicos *in vitro* (Ueno and Fukushima, 1968).

Los efectos críticos producidos por nivalenol se basan en el índice de toxicidad LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level/ Nivel más bajo de micotoxina al cual se observan efectos tóxicos). Un ejemplo son los estudios realizados por Ohtsubo *et al.*, (1989) en ratones alimentados durante 2 años con dicha micotoxina, muestran leucopenia y retardo en el crecimiento con un LOAEL de 0.7 mg/kg peso corporal/día. Sólo los índices LOAEL son válidos a la hora de valorar los efectos tóxicos que afectan a la reproductividad del individuo afectado a largo plazo.

La información sobre la genotoxicidad provocada por el nivalenol es muy limitada y lo concerniente a los humanos es prácticamente nula, pero sumando los resultados de experimentos en animales, los factores críticos de dicha micotoxina son la inmunotoxicidad y la hematotoxicidad (Bretz *et al.*, 2005). Se sabe que *F. poae* es el productor principal de nivalenol en Suecia (Pettersson *et al.*, 1995). Esta toxina es más común en Europa, Australia y Asia que en América, donde la presencia de NIV es limitada. Pero su presencia es más bajas con respecto a DON hasta en los países nórdicos y Europa (Eriksen y Alexander, 1998). NIV puede encontrarse junto con fusarenon X (FUS X), el C4 acetilado derivado de NIV, y otras toxinas producidas por hongos del género *Fusarium*. En contraste con DON, NIV se encuentra más con frecuencia durante años con períodos secos y calientes (Pettersson, 1995; Pronk *et al.*, 2002).

### 5.1.6. 3-Acetildeoxinivalenol (3-AcDON)

El tricoteceno 3-acetildeoxinivalenol es sintetizado por las especies *F. roseum*, *F. culmorum* y *F. graminearum* (Betina, 1989). Químicamente, el 3-acetildeoxinivalenol, pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos y en concreto a los de Tipo B (Krska *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007).

El 3-acetildeoxinivalenol cristaliza como agujas. Su fórmula química es  $C_{17}H_{22}O_7$  y su punto de fusión está en el intervalo 135-136 °C. Su estructura se presenta en Fig. 2 y Tabla 2. La dosis intraperitoneal ( $DL_{50}$ ) es de 49.4 y 49.9 mg/kg en macho y hembra de ratón, respectivamente (Betina, 1989).

#### 5.1.7. 15-Acetildeoxinivalenol (15-AcDON)

El 15-acetildeoxinivalenol es producido principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum*. Químicamente, el 15-acetildeoxinivalenol, pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos y a los de Tipo B (Krska *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007).

Su estructura se presenta en Fig. 2 y Tabla 2. La fórmula molecular es  $C_{17}H_{22}O_7$  y sus puntos de fusión se encuentran en el intervalo 138-140 °C. Esta micotoxina es soluble en disolventes orgánicos polares como el acetonitrilo, metanol y acetato de etilo y ligeramente solubles en agua y cloroformo (Eriksen y Alexander, 1998).

#### 5.1.8. Fusarenon X (FUS X)

La micotoxina fusarenon X (4-acetil-nivalenol) fue aislada a partir de *F. nivale*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *F. lateritium*, *F. avenaceum*, *F. episphaeria*, *F. oxysporum* y *Giberella zeae* (Betina, 1989). Químicamente se denomina 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihidroxi-4 $\beta$ -acetoxi-8-oxo-12-13-epoxi-tricotec-9-ona, su fórmula química es  $C_{17}H_{22}O_8$  y su peso molecular 354.35178 g/mol, se cristaliza como transparentes bipirámides, su punto de fusión está en el intervalo 91-92 °C. Químicamente, pertenece a los tricotecenos no macrocíclicos de Tipo B. Es una toxina citotóxica, emética, inmunosupresiva, carcinogénica, origina diarrea e hipotermia. La dosis intraperitoneal ( $DL_{50}$ ) es de 3.3 mg/kg en machos de ratón. Se detectó irritación de la piel y vómitos en conejos, porcinos y ratones (Larsen *et al.*, 2004; Tóth *et al.*, 2005).

#### 5.1.9. Neosolaniol (NEO)

El neosolaniol es producido por cepas de *F. culmorum*, *F. solani*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. lateritium*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* y *F. rigidiusculum* (McCormick *et al.*, 1996; McCormick and Alexander, 2002).

Su fórmula química es  $C_{19}H_{26}O_8$  y su punto de fusión está en el intervalo 171-172 °C. Su estructura se presenta en Fig. 2 y Tabla 2.

La dosis intraperitoneal ( $DL_{50}$ ) es de 14.5 mg/kg en ratones y de 5  $\mu$ g por huevo en test de embrión de pollo; La  $DL_{50}$  para la síntesis de proteínas en eritrocitos de conejos (células intactas) y para un sistema de célula libre de hígado de rata es 0.25 y 20  $\mu$ g/mL, respectivamente. La  $DL_{50}$  para *Tetrahymena pyriformis* es de 0.5  $\mu$ g/mL. La dosis mínima causante de irritación de la piel en conejos es de 1  $\mu$ g. Además, se han detectado ciertos problemas ambientales (Ueno, 1983).

## 6. BIOSÍNTESIS DE TRICOTECENOS

El primer paso en biosíntesis es la formación de isopentenilpirofosfato (IPP): del Acetyl-CoA. Éste es sintetizado por el organismo o del piruvato vía glucosa o por otras vías de cambio de material primario. El piruvato es intercambiado por una reacción de oxidación empleando la coenzima A y  $NAD^+$  en Acetyl-CoA (Desjardins, 2006).

Sin embargo el organismo puede ganar Acetyl-CoA también directamente mediante el desdoblamiento del ácido graso. Dos moléculas Acetyl-CoA se condensan y forman el Acetoacetyl-CoA. Luego el Acetoacetyl-CoA reacciona con otra molécula Acetyl-CoA y agua lo que da origen al 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. Que luego es catalizado por una reductasa a mevalonato y esa transformación es irreversible (Ehrlich and Daigle, 1987; Desjardins *et al.*, 1993; Desjardins, 2006).

El mevalonato es intercambiado por tres reacciones dependientes en 3-Isopentenilpirofosfato. En el último paso tiene lugar la descarboxilación donde nace C5-Isopreno. Dos de estas unidades C5 se condensan a una subunidad C10. Tras una isomerización se forma el Dimetilalilpirofosfato y con la adición del Isopentenilpirofosfato se obtiene el Geranilpirofosfato. Este paso se repite y nace una unidad C15, farnesil pirofosfato (FPP) (Stryer, 1996).

Por la reacción intramolecular del anillo, que se hace por medio de la enzima catalizadora tricodeno sintetasa la cual necesita iones de  $Mg^{2+}$  como cofactor, surge

el farnesil pirofosfato tricodeína, el primer paso del tricoteceno. La biosíntesis siguiente a tricotecenos más complejos se debe a una serie de oxigenaciones, isomeraciones, ciclaciones y esterificaciones (Desjardins *et al.*, 1993; Desjardins, 2006) Fig.4.

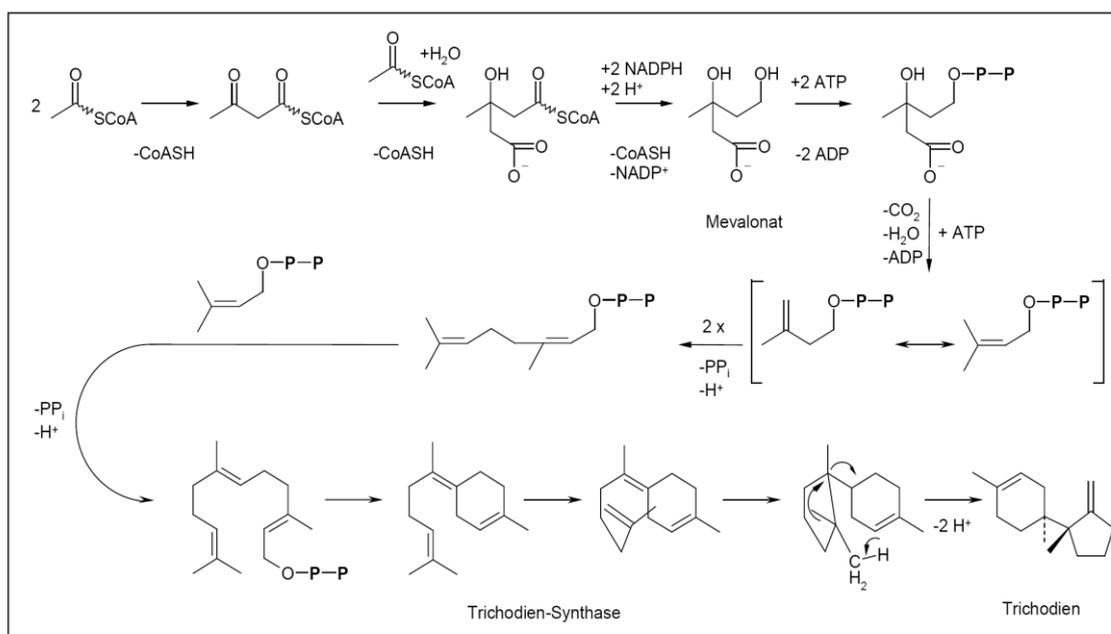


Figura 4. Biosíntesis de tricodieno (Stryer, 1996)

### 6.1. Genes involucrados en la biosíntesis de tricotecenos (Genes *Tri*)

Los tricotecenos son biosintetizados por un complejo que incluyen una serie de pasos como oxigenación, isomerización y esterificación. Pero para que suceda todo esto, se debe tener la información genética necesaria. Hasta el momento se sabe que muchos de los genes de biosíntesis de tricotecenos están localizados en un grupo génico de al menos 10 genes, los cuales se incluyen los de tricodieno sintetasa (*Tri5*), Fig. 2, aunque su presencia no asegura la producción de DON, su ausencia imposibilita la producción, P450 oxigenasa (*Tri4* y *Tri11*), acetiltransferasa (*Tri3* y *Tri7*), factores de transcripción (*Tri6* y *Tri10*), más de seis genes involucrados en la síntesis de tricotecenos (*Tri3*, *Tri7*, *Tri8*, *Tri9*, *Tri11*, y *Tri12*) los cuales son regulados por *Tri10*, una toxina transporte (*Tri12*), dos proteínas hipotéticamente no identificadas (*Tri8* y *Tri9*), otra acetiltransferasa (*Tri101*) (Hohn *et al.*, 1995; Desjardins *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001; Schnerr *et al.*, 2001; 2002; Brown *et al.*, 2002.; Peplow *et al.*, 2003; Covarelli *et al.*, 2004; Niessen *et al.*, 2004; Desjardins, 2006) Fig. 5.

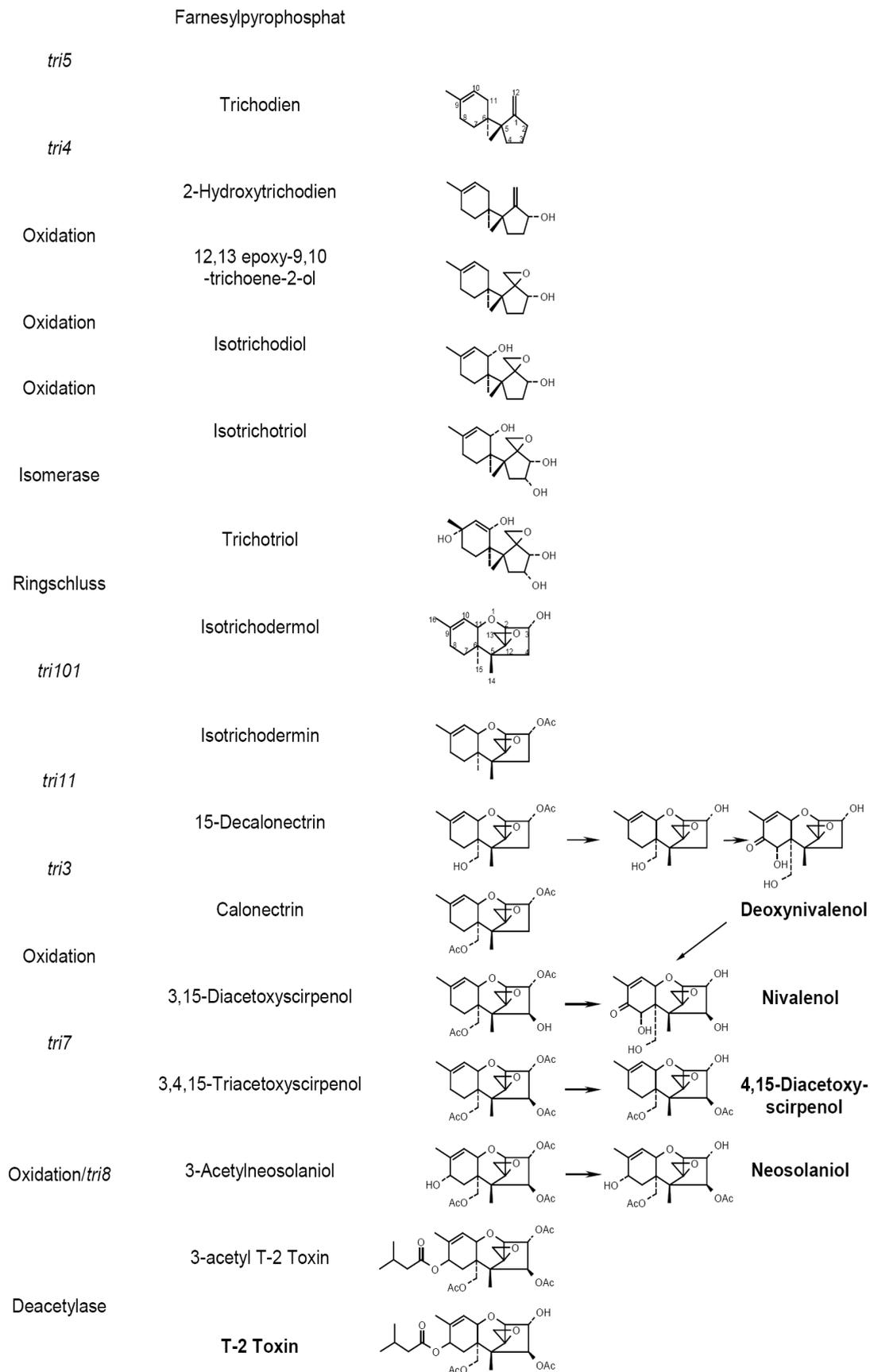


Figura 5. Genes *Tri* implicados en la producción de Tricotecenos (Desjardins *et al.*, 1993; Desjardins, 2006)

En trabajos realizados por Lee *et al.* (2001; 2002) y Brown *et al.* (2001) han identificado los genes *Tri13* y *Tri7* de la biosíntesis de tricotecenos en *Fusarium* los cuales son los responsables de la conversión de DON a NIV por el gen *Tri13* y la acetilación de NIV a 4-acetil-nivalenol (4-AcNIV) por el gen *Tri7*. La secuenciación de estos genes en *F. graminearum* reveló que la inserción 11 del nucleótido esta repetida dentro de un intrón del gen *Tri7*, interrumpiendo la función génica en la producción de DON (Lee *et al.*, 2001) y tres deleciones dentro de la secuencia génica de *Tri13* en productores de DON (Brown *et al.*, 2002).

## 6.2. Especies micotoxigénicas de *Fusarium*

Como se mencionó anteriormente, muchas de las especies de *Fusarium* poseen la capacidad de producir metabolitos tóxicos como micotoxinas, lo que supone un riesgo para la salud, tanto del hombre como de los animales (Li *et al.*, 2000; Bluhm *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2004). Este género, además, juega un papel importante en la industria microbiológica, ya que puede ser explotado como fuente de metabolitos y de proteínas microbianas, útiles en algunos casos como fungicidas, insecticidas, enzimas, acaricidas o antibióticos, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2006).

El género *Fusarium* es conocido por producir un gran número de compuestos volátiles, pero sin lugar a dudas, es su capacidad de sintetizar metabolitos tóxicos lo que va a repercutir en la calidad del alimento. Dentro de este concepto se ha encontrado los siguientes metabolitos contaminantes en especies del género *Fusarium*: Nivalenol (NIV), Zearalenona (ZEA), Deoxinivalenol (DON), 3-Acetildeoxinivalenol (3-AcDON), Toxina T-2 (T-2), Fusarenon X (FUS X), Diacetoxiscirpenol (DAS), Monoacetoxiscirpenol (MAS), Escirpenol (SCR), 4,15-diacetoxiscirpenol (4,15 DAS), Aurofusarina (AUF), Moniliformina (MON), Equisetina, Toxina HT-2 (HT-2), Fumonisina B1 (FB<sub>1</sub>), Fumonisina B2 (FB<sub>2</sub>), Beauvericina (BEA), Ácido Fusarico (FUSA), Zearalenol (ZOL), Neosolaniol (NEOS), Tricotecenos A y B, Butenolida, Eniatina B (EB), Fusarocromanona (FUSCHR), Aurofusarina (AUF), Fusarina C (FUS-C), 15-Acetildeoxinivalenol (15-AcDON), Fumonisina (FUM), Wortmannin (WOR), Calonectrina (Marasas *et al.*, 1984; Thrane and Hansen, 1995; Niessen and Vogel, 1998; Eriksen and Alexander, 1998; Morrison *et al.*, 2002;

Logrieco *et al.*, 2002; Thrane *et al.*, 2004; Kosiak *et al.*, 2005; McCormick *et al.*, 2002; 2006; Patiño *et al.*, 2006) Fig. 6, Tabla 3.

**Tabla 3. Micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium* (Marasas *et al.*, 1984; Thrane and Hansen, 1995 ; Niessen and Vogel, 1998; Eriksen and Alexander, 1998. ; Morrison *et al.*, 2002; Logrieco *et al.*, 2002 ;Thrane *et al.*, 2004 ; Kosiak *et al.*, 2005 ; McCormick *et al.*, 2002 ; 2006 ; Patiño *et al.*, 2006; Desjardins, 2006 )**

Sección	Especie	Micotoxina
<i>Discolor</i>	<i>F. crookwellense</i> ( <i>F. cerealis</i> )	NIV, ZEA, ZOL, FUS X, FUS C
	<i>F. culmorum</i>	DON, ZEA, T-2, NIV, 15-AcDON, FUS X, FUS C
	<i>F. flocciferum</i>	
	<i>F. graminearum</i>	DON, ZEA, NIV, FUS X, 15-AcDON, 3-AcDON; Butenolida,
	<i>F. heterosporum</i>	ZEA, ZOL
	<i>F. lunulosporum</i>	
	<i>F. reticulatum</i>	
	<i>F. robustum</i>	
	<i>F. sambucinum</i>	DAS, T-2, NEOS, EB, Butenolida, MAS
	<i>F. sulphureum</i>	
	<i>F. trichotehecioides</i>	
	<i>F. tumidum</i>	NEOS
<i>F. venenatum</i>	DAS, E B	
<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	T-2, HT-2, NEOS, Butenolida, 4,15 DAS, FUS-C, AUF
	<i>F. chlamydosporum</i>	MON
	<i>F. poae</i>	T-2, DAS, HT-2, NEOS, AUF, FUS-C, monoacetoxiscirpenol, SCR, NIV, FUS X, MAS, BEA
	<i>F. tricinatum</i>	FUS C
<i>Roseum</i>	<i>F. avenaceum</i>	MON, FUS C
<i>Arthrosporiella</i>	<i>F. camptoceras</i>	NEOS
	<i>F. semitectum</i>	ZEA, DAS, MAS, Butenolida
	<i>F. semitectum</i>	Butenolida, DAS, ZEA
<i>Gibbosum</i>	<i>F. equiseti</i>	Butenolida, DAS, ZEA, equisetina, tricotecenos A y B, FUSCHR, ZOH, MAS, NIV, BEA
	<i>F. acuminatum</i> ( <i>spp.armeriacum</i> )	EB, T-2, HT-2, DAS, MAS MON, NEO
<i>Liseola</i>	<i>F. verticillioides</i> <i>syn.: F. moniliforme</i>	FB <sub>1</sub> , MON, BEA, FB <sub>2</sub> , FUM, FUS C
	<i>F. proliferatum</i>	FB <sub>1</sub> , MON, FUM, BEA, FUP, FB <sub>2</sub>
	<i>F. subglutinans</i>	FUSA, MON, BEA
<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>	MON
	<i>F. torulosum</i>	WOR, Antibiotic Y

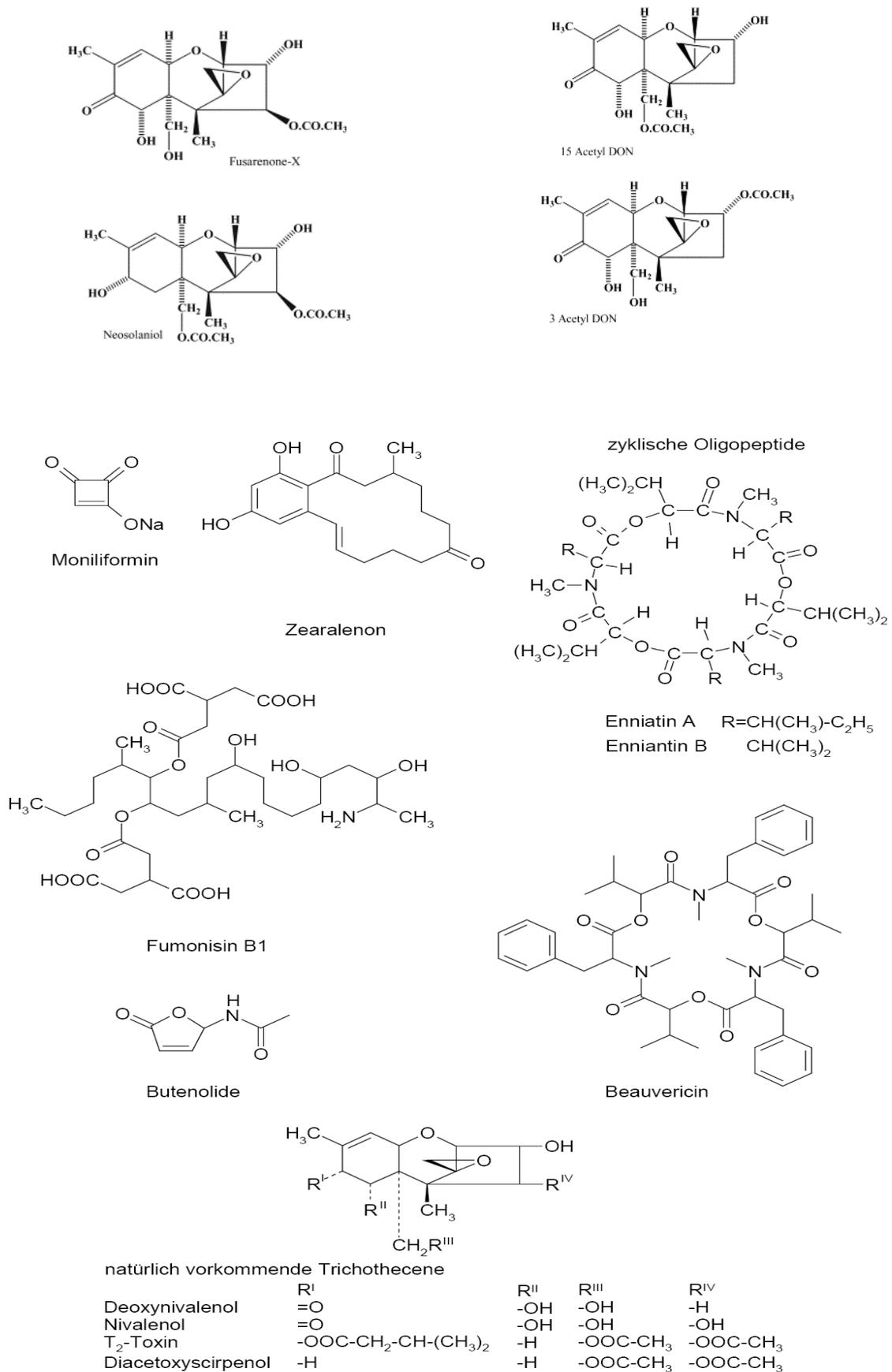


Figura 6. Toxinas producidas por hongos del género *Fusarium* (Desjardins, 2006)

## 7. FACTORES DETERMINANTES EN LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS POR HONGOS DEL GÉNERO *Fusarium*

Son muchos los estudios realizados que tratan de determinar las condiciones ambientales que favorecen la contaminación fúngica y la biosíntesis de micotoxinas producidas por el género *Fusarium*, tanto en campo como durante el almacenamiento de productos agroalimentarios, ya que su producción está influenciada en gran parte por factores ambientales entre los que se encuentran la actividad del agua ( $a_w$ ), temperatura, pH y composición gaseosa de la atmósfera (niveles de oxígeno y dióxido de carbono), otros factores como la composición del sustrato, interacciones microbianas, vectores invertebrados y las condiciones físicas del grano (Magan and Lacey, 1984; Mateo *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2004).

Aunque el crecimiento fúngico y biosíntesis de micotoxinas son el resultado de la interacción de los factores anteriormente citados, el entendimiento de cada factor es esencial para la comprensión del proceso global, lo que facilita su predicción y prevención de la producción de micotoxinas.

### 7.1. Actividad del agua ( $a_w$ ) y contenido de agua

El agua es quizás el factor más determinante y limitante de la colonización fúngica de un determinado sustrato, y aún más para el crecimiento de las especies del género *Fusarium*, que necesitan un mayor contenido de agua libre. La disponibilidad de agua para el hongo determina si las esporas fúngicas podrían o no germinar, la velocidad con que lo harán y su tasa respiratoria. Desde el punto de vista microbiológico el término más adecuado para expresar el agua del sustrato es la actividad del agua ( $a_w$ ), término que contempla únicamente el agua libre en equilibrio con la humedad relativa ambiental. De ese modo la  $a_w$  mínima para el desarrollo de la mayoría de las especies fúngicas que colonizan los granos de cereales está sobre 0.70. Así, los valores óptimos de  $a_w$  para la producción de toxinas por parte de este género oscila entre 0.93 y 0.98, no detectándose toxinas por debajo de un valor de 0.71. Muchos estudios efectuados han demostrado que la producción de micotoxinas como fumonisinas, zearalenona y tricotecenos aumentan con la actividad del agua, siendo óptima a 0.97, 0.98 y 0.99, respectivamente (Lacey

and Magan, 1991; Marín *et al.*, 1999; Velluti *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2002; Doohan *et al.*, 2003; Soriano and Dragacci, 2004).

## 7.2. Temperatura

Como ocurre con el agua, cada especie fúngica tiene una temperatura mínima óptima y máxima para su crecimiento. Los hongos en general crecen en un amplio rango de temperaturas, que pueden ir desde -4 °C hasta una temperatura máxima de 50 °C. Diversos estudios han determinado que la mayoría de los hongos que producen toxinas lo hacen a unos valores entre 12-42 °C, produciendo el máximo entre 25-32 °C según el sustrato. Además, los ciclos de temperatura favorecen la síntesis de toxinas (Marín *et al.*, 2001; Llorens *et al.*, 2004; Bellí *et al.*, 2005).

En el caso de las especies del género *Fusarium*, para la producción de micotoxinas la temperatura óptima es de 20-26 °C, aunque el crecimiento y la esporulación de los hongos se ven favorecidos a una temperatura de 30 °C. No obstante, muchos estudios tratan de determinar qué temperaturas favorecen la producción de micotoxinas específicas, con el fin de evitarlas. Por ejemplo, la producción de tricotecenos y zearalenona, se ve favorecida a temperaturas inferiores a 28 °C y superiores de 15 °C, temperaturas medias frecuentes en las áreas de cultivo y en los almacenes de cereales (Velluti *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 2006). Otro ejemplo, es el caso de la producción de fumonisinas, favorecida en el intervalo de 15-30 °C (Marín *et al.*, 1999; Soriano and Dragacci, 2004).

## 7.3. pH

El pH no influye marcadamente sobre el crecimiento de los hongos, pues éstos toleran amplios rangos de pH. Ejemplo de ello es el caso de *F. verticillioides*, que tolera valores desde 3 a 9.5, aunque el pH óptimo de casi todas las especies contaminantes de vegetales es aproximadamente de 5.6. La capacidad de poder desarrollarse a pH ácidos evita la competencia con bacterias. En cambio, la formación de micotoxinas se ve favorecida por valores de pH que oscilen entre 3.4 y 5.5. En ocasiones, el crecimiento de los hongos toxigénicos puede provocar una

disminución en la acidez del medio, favoreciendo la síntesis de micotoxinas (Carrillo, 2003; Bennett and Klich, 2003; Doohan *et al.*, 2003; Soriano and Dragacci, 2004; Benítez *et al.*, 2006).

### 7.4. Niveles de oxígeno (O<sub>2</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

Los hongos toxigénicos, en general, son microorganismos aerobios. Por ello, en condiciones anaeróbicas no crecen, aunque *F. oxysporum* puede crecer incluso en estas condiciones. Se sabe que la mayoría de los hongos que contaminan granos se ven influenciados por las concentraciones de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y en menor grado nitrógeno (N<sub>2</sub>). La cantidad de O<sub>2</sub> también influye en la síntesis de micotoxinas, por ejemplo, la producción de aflatoxinas fue restringida a una concentración de O<sub>2</sub> de menos del 1% (Narasaiah *et al.*, 2006). Por otra parte, si la atmósfera se suplementa con CO<sub>2</sub>, se produce un descenso, tanto en el crecimiento del hongo como en la producción de micotoxinas. De igual modo, el N<sub>2</sub> también puede inhibir el crecimiento de hongos, pero este efecto sólo se consigue cuando prácticamente todo el O<sub>2</sub> del aire es sustituido por N<sub>2</sub>. En general, el crecimiento fúngico puede controlarse manteniendo niveles altos de CO<sub>2</sub> y baja concentración de O<sub>2</sub>. Sin embargo el control más efectivo se lleva a cabo cuando además de lo anterior hay una disminución de la *a<sub>w</sub>* del grano (Munkvold, 2003; Samson *et al.*, 2004; Soriano and Dragacci, 2004).

### 7.5. Composición del substrato

La composición química y física del substrato influye de forma determinante en su susceptibilidad para la producción micotoxinas, tanto en lo que se refiere a la naturaleza como a la cantidad de metabolitos tóxicos que se producen y en consecuencia que se acumulen en el mismo. Es así como medios ricos en hidratos de carbono y relativamente pobres en proteínas y grasas son más apropiados para la producción de micotoxinas por parte de hongos del género *Fusarium*. Este es el caso de los granos de maíz, trigo, cebada, avena y sorgo, que toman los carbohidratos proporcionados por el almidón y la celulosa (Madhyastha *et al.*, 1990; Anadón *et al.*, 2005).

Otros parámetros físicos que influyen es la  $a_w$  intrínseca del sustrato, o un determinado tratamiento, resistencia mecánica al embalaje, lo que determina su integridad y aire residual y por ende la disponibilidad de oxígeno y la conductividad térmica (Anadón *et al.*, 2005; Soriano and Dragacci, 2004).

## 7.6. Interacción con otros microorganismos

La producción de metabolitos secundarios se ve afectada drásticamente cuando otras especies comparten el mismo nicho ecológico (Marín *et al.*, 2001). Generalmente, en los alimentos, las especies toxigénicas coexisten con bacterias y con otras especies fúngicas (incluyendo levaduras), cuya presencia puede inhibir o favorecer la producción de micotoxinas. Estas interacciones puede ser intra e interespecíficas. Por ejemplo, la producción de fumonisinas en presencia de *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *P. implicatum*, es inhibida, excepto a altas actividades de agua (0.98) donde se ve estimulada. Por otra parte, la producción de zearalenona disminuye cuando crece con *A. flavus* a 16 °C, pero no a 25 °C. Además, la producción de ZEA por *F. graminearum* no se ve afectada por *F. verticillioides* ni por *F. proliferatum*, sin embargo, la producción de fumonisinas por estas especies disminuye en presencia de *F. graminearum*, excepto a 25 °C y entre 0,95-0,98  $a_w$  donde la producción de fumonisinas aumenta por que se estimula *F. verticillioides* (Sanchis *et al.*, 2000; Velluti *et al.*, 2000; Soriano and Dragacci, 2004).

## 7.7. Insectos

Es uno de los principales factores de deterioro de granos, antes, durante y después de la cosecha, ya que producen daño mecánico, estropeando y alterando la integridad de la cubierta de la semilla. Interaccionan con la microbiota presente en el grano de diferentes formas, ya que puede causar un ambiente propicio para el crecimiento de hongos debido al calentamiento y liberación de agua como consecuencia de su actividad metabólica y respiración. Cuando la larva se desarrolla en el interior del grano, pueden actuar como vectores, ya que pueden transportar esporas fúngicas ya sea en sus pelos, boca e intestino, contaminando el producto (Edwards, 2004; Aldred and Magan, 2004; Neethirajan *et al.*, 2007).

Por su parte, los hongos pueden atraer o inhibir la presencia de insectos a través de compuestos volátiles o micotoxinas e incluso pueden servir como alimento para ellos (Aldred and Magan, 2004).

## 8. ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

El análisis de las micotoxinas puede realizarse por métodos químicos, biológicos e inmunológicos. Los métodos biológicos aprovechan las propiedades de las micotoxinas, tales como: irritación cutánea, actividad fungicida, fitotóxica, citotóxica e inhibición de la síntesis proteica. Éstos se han empleado para la detección y aislamiento de nuevas micotoxinas mientras que los métodos químicos se emplean para su posterior caracterización, por ser fácilmente cuantificables y más sensibles.

Los métodos químicos se prefieren cuando la micotoxina ya está caracterizada y se dispone de patrones de referencia. Son también rápidos, específicos y muy reproducibles que los bioensayos.

Actualmente también se emplean los inmunoensayos como el método ELISA, el radioinmunoensayo (RIA) y la cromatografía de inmunoafinidad, todos ellos tienen la ventaja de ser técnicas de fácil realización y aplicables a la determinación de micotoxinas en cereales y alimentos.

### 8.1. Métodos químicos

#### 8.1.1. Muestreo

Debido a la heterogeneidad en la distribución de la micotoxina en las muestras, se debe tomar una muestra lo suficientemente grande para que sea representativa. La principal fuente de variación existente en un método analítico la ofrece el proceso de muestreo, mientras que el sub-muestreo y el análisis, poseen variabilidades que son más o menos independientes de la concentración de la micotoxina (Freese *et al.*, 2000).

### **8.1.2. Extracción**

Consiste en la agitación o mezclado de la muestra con la solución de extracción, con el fin de separar las micotoxinas del resto de componentes de la matriz.

El comportamiento en solubilidad de las micotoxinas cristalizadas, químicamente puras, es muy diferente al de las propias micotoxinas presentes en cualquier contaminación natural, por lo que los disolventes utilizados deben ser los adecuados para ser capaces de realizar una extracción completa en un alimento. Por ello es necesario el empleo de disolventes orgánicos con diferente grado de polaridad, dado que las micotoxinas presentan solubilidades desiguales en los diversos disolventes. En la práctica, se usan el cloroformo, acetonitrilo, acetona, metanol, etanol y diclorometano, bien solos, mezclados entre sí o, más frecuentemente, con agua y/o pequeñas cantidades de ácido. La presencia de agua en la solución de extracción permite una mayor penetración de la misma en los medios hidrofílicos, y potencia la extracción de la toxina.

La extracción se realiza agitando la mezcla muestra-disolvente durante un periodo que puede variar entre 30-90 min., ó 1-3 min., si se utilizan homogeneizadores de alta velocidad.

### **8.1.3. Purificación**

Tras la extracción, junto con las micotoxinas, es de suponer que en el extracto se encuentren muchas sustancias que por su propia naturaleza pueden interferir en la detección, por lo tanto es necesario eliminarlas antes de continuar con las siguientes etapas del proceso de análisis. La purificación separa las micotoxinas de aquellos compuestos químicos que han sido extraídos junto con ellas. Actualmente podemos distinguir diferentes técnicas de purificación: líquido-líquido, adsorción física, tecnología de membranas y técnicas cromatográficas. Nos centraremos en este último grupo de técnicas, ya que es al que pertenecen las que utilizaremos en el presente estudio.

### 8.1.4. Técnicas cromatográficas

Mediante el uso de columnas cromatográficas o más recientemente, cartuchos rellenos de florisil, sílica gel, sílice enlazada con grupos octadecilo (comúnmente conocido como C<sub>18</sub>), resina de amberlita XAD. Algunos métodos para la determinación de deoxinivalenol en cereales de desayuno mediante cromatografía de gases, incluyen una columna con alúmina-carbón-celita y un cartucho C<sub>18</sub> para eliminar la gran cantidad de azúcares que contienen (Gilbert, 1993). Actualmente se dispone de cartuchos de extracción en fase sólida comerciales con gran variedad de rellenos para pequeños volúmenes de muestra, que permiten una mayor rapidez y automatización en el desarrollo del método, como por ejemplo los cartuchos MycoSep<sup>®</sup>.

También se ha incrementado el uso de columnas de inmunoafinidad, que ofrecen una gran selectividad, son fáciles de manejar y su aplicación en la purificación de muestras contaminadas con diversas micotoxinas ha sido muy bien investigada (European Mycotoxin Awareness Network, 2005).

### 8.1.5. Detección y cuantificación

Para la detección y cuantificación de micotoxinas existen dos tipos principales de metodologías, los métodos inmunológicos (ELISA, RIA, inmunoafinidad) y los cromatográficos (cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases).

### 8.1.6. Métodos cromatográficos

Dirigidos a la separación de dos o más sustancias. Se consigue mediante la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase fija (fase estacionaria) y otra que se desplaza (fase móvil). La separación entre dos sustancias empieza cuando una es retenida más fuertemente por la fase estacionaria que la otra, que tiende a desplazarse más rápidamente por la fase móvil.

El procedimiento más común usado para la determinación de tricotecenos es la cromatografía de gases (CG) con detector de ionización de llama (FID), detector de captura de electrones (ECD) o detector de espectrometría de masas (MS). Para los tricotecenos, el análisis por CG tiene mayor sensibilidad y especificidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Gilbert, 1993).

Después de la derivatización de los grupos hidroxilo libres de las micotoxinas a formas trimetilsilil éteres (TMS), heptafluorobutiril ésteres (HFB), pentafluoropropionil y trifluoroacetil ésteres, éstas llegan a ser lo suficientemente volátiles para el análisis por cromatografía de gases.

El detector de ionización de llama (FID) tiene mayor sensibilidad que la cromatografía en capa fina, sin embargo es poco específico, presentándose problemas en la identificación de los picos como pertenecientes a una micotoxina, sobretodo en matrices complejas como las de los cereales. Por lo general, es resistente y fácil de utilizar. Responde a compuestos que producen iones cuando se queman en una llama aire-hidrógeno. Esto incluye a todos los compuestos orgánicos, aunque unos pocos (por ejemplo el ácido fórmico, acetaldehído) exhiben poca sensibilidad.

El detector de captura de electrones (ECD), mejora la sensibilidad frente al FID para los tricotecenos. El sistema se basa en la electronegatividad de las sustancias eluidas, y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones. Es un detector muy selectivo, y es sensible a la presencia de moléculas con grupos electronegativos como halógenos, peróxidos, quinonas, y grupos nitro. Otros grupos como el alcohol, amina e hidrocarburos no dan señal. Se aplica en la detección de moléculas que contienen halógenos, principalmente cloro, de ahí que sea importante en ensayos medioambientales para la detección y determinación de insecticidas clorados.

El detector de captura de electrones tiene la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia del detector de llama). En el caso de los tricotecenos, objetos de este estudio, hay que decir que no son compuestos

volátiles, por lo que para realizar un análisis de ellos por CG/ECD y CG/FID han de ser previamente derivatizados.

El detector de espectrometría de masas (MS) es un instrumento que permite analizar con una gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ).

En términos generales, moléculas diferentes tienen masas distintas, hecho utilizado por un espectrómetro de masas para determinar qué moléculas están presentes en una muestra. En el caso de una micotoxina, se vaporiza y se analizan los iones en la primera parte del espectrómetro de masa. Estos iones tienen pesos moleculares específicos. También tienen una carga, que significa que debido a ella tendrán movimiento bajo la influencia de un determinado campo eléctrico. Los iones se envían en un compartimiento de aceleración y se pasan a través de una lámina metálica. Se aplica un campo magnético a un lado del compartimiento que atrae a cada uno de los iones con la misma fuerza (suponiendo carga idéntica) y los desvía sobre un detector. Naturalmente, los iones más ligeros se desviarán más que los iones pesados ya que tienen menos masa. El detector mide exactamente cuan lejos se ha desviado cada ion y dependiendo de esto, se calcula el "cociente masa por unidad de carga ( $m/z$ )". Con esta información es posible determinar con un alto nivel de la probabilidad cuál era la composición química de la muestra original.

El acoplamiento técnico cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) ha revolucionado el análisis de muestras complejas, ya que las características del alto poder de resolución que da la cromatografía de gases con la alta sensibilidad suministrada por el espectrómetro de masas, convierte a este acoplamiento GC-MS en un método altamente poderoso para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas volátiles (Gámiz, 2006).

## II. OBJETIVOS

---



## II. OBJETIVOS

Las micotoxinas suponen un riesgo potencial para la salud humana y animal, motivo por el cual muchos estudios tratan de establecer medidas de control y prevención de su presencia en alimentos. Entre estas medidas se encuentra el desarrollo de métodos que permitan la detección de cepas micotoxigénicas en los alimentos con anterioridad a su crecimiento y consiguiente producción de micotoxinas.

Uno de los principales géneros productores de micotoxinas es *Fusarium* que sintetiza, entre otras, las micotoxinas denominadas tricotecenos. Éstos pueden hallarse comúnmente en cereales como el maíz y sus productos. Con un consumo continuado de alimentos contaminados, los tricotecenos pueden suprimir la función inmune, provocando la pérdida de resistencia frente a enfermedades, hipersensibilidad y otras alteraciones inmunológicas.

Por tanto, este trabajo de investigación se centrará en el estudio de la contaminación fúngica en maíz cultivado o comercializado en España, así como en el aislamiento e identificación de cepas pertenecientes al género *Fusarium* potencialmente micotoxigénicas. Sus objetivos serán:

- Estudio de la contaminación fúngica y de la incidencia de cepas pertenecientes al género *Fusarium* en maíz de distintos orígenes y atendiendo a su distribución geográfica.
- Evaluación estadística de la efectividad de diversos medios de cultivo para el aislamiento de *Fusarium* spp., a partir de granos de maíz.
- Aislamiento de *Fusarium* spp., a partir de distintos tipos de maíz, e identificación macroscópica, microscópica y molecular de las mismas.

Caracterización molecular de los aislados de *Fusarium* spp., encontrados en este trabajo, empleando técnicas de biología molecular como PCR, PCR-RFLPs y secuenciación.

- Aplicación de técnicas moleculares a la detección de aislados de *Fusarium* spp., productores de tricotecenos.
- Desarrollo y puesta a punto de un método para la comprobación de la producción de tricotecenos por aislados de *Fusarium* spp., potencialmente toxigénicos, directamente a partir del medio de cultivo.
- Evaluación de la efectividad de diversos medios sólidos de cultivo para detectar la producción de tricotecenos por aislados de *Fusarium* spp., potencialmente toxigénicas.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium* spp., PROCEDENTES DE MAÍZ

#### 1.1. Procedencia de las muestras de maíz

El maíz utilizado para el presente estudio procedió de diferentes comunidades de España y se agrupó en tres grandes grupos: El primero corresponde a 10 muestras de granos de maíz seco (*Zea mays* L.), 9 de las cuales pertenecen a la variedad *indentata* y una de ellas a la variedad *everta*. Todas ellas fueron obtenidas de diversos comercios de piensos de la Comunidad Valenciana. En este trabajo de investigación, a este grupo de muestras se le designará con el nombre de “maíz almacén”. La variedad y origen de las muestras de maíz se presentan en la Tabla 4.

El segundo grupo corresponde a 100 muestras de maíz dulce (*Zea mays* L. subsp. *saccharata*). Las mazorcas, que procedían de distintas regiones de España y cultivadas convencionalmente para el consumo humano, fueron proporcionadas por una empresa agroalimentaria de la Comunidad Valenciana. Se emplearon 63 muestras procedentes de Castilla la Mancha, 5 de Extremadura, 8 de Murcia, 11 de Madrid y 13 de la Comunidad Valenciana. A este grupo de muestras se les designará como “maíz campo” (Tabla 5).

Por último, el tercer grupo corresponde a tres variedades comerciales de maíz (*Zea mays* L. subsp. *indentata*): Panamá, Cridor y Net, facilitadas por una casa comercial. El cultivo se realizó en parcelas en la Universidad Politécnica de Valencia y sólo recibió las prácticas culturales de desyerbe, sin que se utilizaran fertilizantes ni fungicidas. Se realizaron un total de 16 muestreos; en cada uno de ellos se cogieron 2 mazorcas de cada variedad, de las dos líneas centrales, escogiendo aleatoriamente la mazorca superior o inferior de cada planta (en caso de que hubiera dos mazorcas). El número total de mazorcas recolectadas fue de 96 y se les designó con el nombre de “maíz experimental”.

**Tabla 4. Variedad y origen de las muestras de maíz almacén**

Nombre de la muestra	Variedad de Maíz	Comprada en	Origen	Destinada a consumo
1	<i>identata</i>	Castellar	Desconocido	Animal
2	<i>identata</i>	Valencia	Desconocido	Animal
3	<i>everta</i>	Valencia	Desconocido	Humano
4	<i>identata</i>	Gandia	Albacete	Animal
5	<i>identata</i>	Gandia	Almussafes	Animal
6	<i>identata</i>	Algemesí	Jaén	Animal
7	<i>identata</i>	Carcaixent	Desconocido	Animal
8	<i>identata</i>	Catarrosa	C. Valenciana	Animal
9	<i>identata</i>	Picassent	C. Valenciana	Animal
10	<i>identata</i>	La Pobla Llarga	Andalucía	Animal

---

### 1.2. Medios de cultivo

Para el cultivo y aislamiento de hongos del género *Fusarium* se emplearon distintos medios de cultivo: Patata Dextrosa Agar (PDA) con y sin cloramfenicol y Agar Verde de Malaquita (AVM) (medio selectivo para *Fusarium* spp.). También se utilizaron agar Czapeck (Cz) y agar sacarosa extracto de levadura (YES) (Burgess *et al.*, 1994; Castella *et al.*, 1997) Anejo 1.

### 1.3. Obtención de aislados de *Fusarium* spp.

De cada muestra de maíz almacén se seleccionaron 100 granos de forma aleatoria. Para desinfectar los granos, éstos se llevaron a una disolución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y después se lavaron dos veces con agua estéril durante periodos de un minuto. Para realizar todas estas operaciones se utilizaron gasas y pinzas estériles.

Tras la desinfección, se depositaron 50 granos de maíz en la superficie de 10 placas de Petri con medio de cultivo PDA-CL (cinco granos por placa). De igual forma se procedió con el medio de cultivo Agar Verde de Malaquita, para obtener un total de 100 granos.

Tabla 5. Procedencia de las muestras analizadas de maíz campo

Muestra	Origen	Muestra	Origen	Muestra	Origen	Muestra	Origen
1	C. Mancha	27	C. Mancha	52	C. Mancha	77	Madrid
2	C. Mancha	28	C. Mancha	53	C. Mancha	78	Madrid
3	Extremadura	29	Valencia	54	C. Mancha	79	C. Mancha
4	Extremadura	30	Valencia	55	Valencia	80	C. Mancha
5	Extremadura	31	C. Mancha	56	Valencia	81	C. Mancha
6	Extremadura	32	C. Mancha	57	C. Mancha	82	Valencia
7	Murcia	33	C. Mancha	58	C. Mancha	83	C. Mancha
8	Murcia	34	C. Mancha	59	C. Mancha	84	C. Mancha
9	Extremadura	35	C. Mancha	60	C. Mancha	85	C. Mancha
10	Murcia	36	C. Mancha	61	C. Mancha	86	C. Mancha
11	Murcia	37	C. Mancha	62	C. Mancha	87	C. Mancha
12	C. Mancha	38	C. Mancha	63	C. Mancha	88	C. Mancha
13	Valencia	39	Valencia	64	C. Mancha	89	C. Mancha
14	C. Mancha	40	Valencia	65	Madrid	90	C. Mancha
15	C. Mancha	41	C. Mancha	66	Valencia	91	C. Mancha
16	Valencia	42	C. Mancha	67	Madrid	92	C. Mancha
17	Valencia	43	C. Mancha	68	Madrid	93	C. Mancha
19	C. Mancha	44	C. Mancha	69	Madrid	94	C. Mancha
20	Murcia	45	Valencia	70	Madrid	95	C. Mancha
21	Murcia	46	C. Mancha	71	C. Mancha	96	C. Mancha
22	Murcia	47	C. Mancha	72	C. Mancha	97	C. Mancha
23	C. Mancha	48	C. Mancha	73	Madrid	98	C. Mancha
24	Murcia	49	C. Mancha	74	Madrid	99	C. Mancha
25	Valencia	50	C. Mancha	75	Madrid	100	C. Mancha
26	C. Mancha	51	C. Mancha	76	Madrid	101	C. Mancha

\* La muestra 18 se excluyó el estudio por no tratarse de maíz dulce

Los granos procedentes de mazorcas de maíz campo se seleccionaron de forma aleatoria, tomando 50 granos por muestra. En cada una de las mazorcas se realizó un corte rectangular a lo largo de las mismas con ayuda de un bisturí estéril, dejando al descubierto los granos de maíz. Posteriormente, se extrajeron los granos con ayuda de unas pinzas estériles y, sin realizar ningún tipo de lavado, se colocaron de 5 en 5 sobre la superficie de las placas con medio de cultivo. De los 50 granos extraídos por muestra, 25 se colocaron en placas con agar PDA-CL y los otros 25, en las placas con medio AVM, obteniendo por tanto 10 placas de cada muestra (5 en PDA-CL y 5 en AVM), con 5 granos cada una.

Para el maíz experimental (variedades Panamá, Cridor y Net), se utilizó la metodología descrita anteriormente en el análisis de maíz campo. De cada mazorca se utilizaron 50 granos: 25 granos se depositaron en 5 placas con PDA-CL y 25 granos en 5 placas con AVM (5 granos por cada placa). En total, se utilizaron 20 placas (10 placas por mazorca), 100 granos por muestreo y variedad.

Todas las placas se incubaron a 28 °C de 7 a 10 días.

### **1.4. Cultivo puro de hongos pertenecientes al género *Fusarium*, identificación y conservación**

Los hongos obtenidos se sembraron individualmente en dos placas, una con medio PDA-CL y otra con medio AVM, incubándolas a 28 °C de 7 a 10 días, hasta que el crecimiento de cada aislado fuera completo, y asegurando que se hubiera logrado un cultivo puro. Una vez crecidos los aislados, se hizo una selección visual y al microscopio, para identificar los hongos del género *Fusarium* según los criterios propuestos por Nelson *et al.* (1983), Samson *et al.* (2004) y Leslie and Summerell, (2006).

Con los aislados pertenecientes al género *Fusarium* se obtuvieron cultivos monospóricos en el medio de cultivo PDA que se conservaron a 4 °C y en crioviales con caldo nutritivo con 20% de glicerina a -80 °C. Para cada aislado se tuvo en cuenta su procedencia, número de placa y número de grano de donde se aisló el hongo, definiendo la nomenclatura que se indica a continuación:

#### **1.4.1. Nomenclatura de las placas**

Para cada uno de los aislados obtenidos del maíz almacén se utilizó un código que consta de una letra P o V, según el medio utilizado para el crecimiento de los hongos sea PDA-CL (P) o AVM (V) y de tres números, que van del 1 al 10. El primero hace referencia a la muestra, el segundo a la placa donde se aisló y el tercero al grano de maíz.

Para nombrar cada uno de los aislados obtenidos de las mazorcas provenientes de maíz campo se utilizó un código que consta de la letra F seguida del número correspondiente a la muestra, la letra P o V, según el medio utilizado para el crecimiento de los hongos sea PDA-CL (P) o AVM (V), y de dos números, que van del 1 al 5. El primero hace referencia a la placa y el segundo, al grano de maíz. Algunos de los aislados llevan al final de su código una letra minúscula, a o b; ésta hace referencia a que en el mismo grano habían dos hongos diferentes, pudiendo ser ambos identificados como *Fusarium* sp.

Para los aislados procedentes del maíz experimental se utilizó la siguiente nomenclatura, indicando: Variedad/ N° de mazorca/ Medio de cultivo/ N° de siembra/ N° de placa

### 1.5. Cepas de referencia

En este trabajo se utilizaron un total de 10 cepas de referencia suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), tal y como se indica en la Tabla 6. Estas cepas se emplearon para la identificación macroscópica de las especies del género *Fusarium*, y su ADN se empleó como control positivo en las reacciones de PCR.

Las cepas se sembraron en medio PDA y se incubaron a 28 °C de 7 a 10 días, dependiendo del crecimiento de la cepa. A continuación se conservaron a -80 °C en crioviales con caldo nutritivo con 20% de glicerol.

Tabla 6. Cepas de referencia

Referencia	Especie
CECT 2150	<i>G. zeae</i>
CECT 2148	<i>F. culmorum</i>
CECT 2715	<i>F. oxysporum</i>
CECT 20166	<i>F. sporotrichioides</i>
CECT 2982	<i>F. verticillioides</i>
CECT 20165	<i>F. poae</i>
CECT 2218	<i>F. roseum</i>
CECT 20232	<i>F. solani</i>
CECT 20150	<i>F. tricinctum</i>
CECT 2149	<i>F. equiseti</i>

## 2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Fusarium*: Método CTAB

### 2.1. Preparación de los aislados para la extracción de ADN

Todos los aislados seleccionados provenientes de cultivos monospóricos se sembraron en placa con medio PDA en cámara de flujo laminar vertical. Una vez sembrados se sellan las placas con Parafilm y se incubaron a 28 °C durante unos 7-10 días hasta que el desarrollo del hongo es completo.

#### 2.1.1. Procedimiento

El procedimiento utilizado para la extracción del ADN cromosómico fue el descrito por Wilson, (1987) con algunas modificaciones, como se explica a continuación.

Para la extracción de ADN, se recogió el micelio del aislado de *Fusarium* sp., con una espátula metálica estéril, depositándolo en un mortero de porcelana previamente esterilizado; se añadió nitrógeno líquido e inmediatamente se molió hasta obtener un polvo fino. Este micelio molido se colocó en un microtubo Eppendorf de 2 mL al que se añadió 750  $\mu$ L de la solución tampón (250 mL Tris-HCl 100mM pH 7.2; 250 mL EDTA 100mM y 250 mL dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, se agitó y se mantuvo todo en frío. Después, se añadió 3  $\mu$ L de una solución de proteinasa K (20 mg/mL), se agitó y se incubó a 37 °C durante 1 h.

A continuación se añadieron 100  $\mu$ L de NaCl 5M con el fin de proporcionar la concentración salina necesaria para que el Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) no se acompleje con el ADN. Se adicionó 80  $\mu$ L de solución CTAB/NaCl (CTAB al 10% en NaCl 0.7 M), de nuevo se agitó en homogenizador vortex y se incubó a 65 °C durante 10 min.

Para la purificación del ADN se añadió 700  $\mu$ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min., para eliminar los complejos formados por el CTAB. El sobrenadante se transfirió a un nuevo

microtubo, al que se le añadió un volumen equivalente (entre 600-700  $\mu\text{L}$ ) de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), agitándolo después. El fenol desnaturaliza las proteínas y las precipita, separándose del ADN que se mantiene disuelto. A continuación la mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min., para eliminar los restos del complejo CTAB, repitiéndolo si es necesario. Las proteínas quedan en la interfase y los ácidos nucleicos en la fase superior acuosa.

El sobrenadante (500-700  $\mu\text{L}$ ), que contiene los ácidos nucleicos, se transfirió a otro microtubo al que se le añadió entre 500-600  $\mu\text{L}$  de isopropanol para precipitar el ADN; se agitó suavemente y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se eliminó el isopropanol y se añadió 500  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70%; se agitó y se centrifugó durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se elimina el etanol y se seca la muestra al vacío.

Finalmente, se resuspende el ADN en 50  $\mu\text{L}$  de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) y se añaden 3  $\mu\text{L}$  de RNAsa (25 mg/mL) para eliminar los restos de RNA, dejando el ADN extraído a 5  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

### **2.1.2. Detección del ADN por electroforesis y visualización del producto de PCR**

Para comprobar que la extracción ha sido correcta se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % (p/v) en tampón TAE 1X, a 90 voltios, durante 30 min. El ADN extraído (5  $\mu\text{L}$  de ADN) se carga en el gel después de mezclarlo con 1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (Loading Dye Solution). Acabada la electroforesis, se tiñe el gel con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 10-12 min. Tras la tinción se visualiza el gel en un transiluminador de luz UV.

Esta misma metodología sirve para visualizar el producto de PCR, utilizando un volumen de muestra de 5  $\mu\text{L}$  previamente mezclado con 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga. En los geles se incluye uno o varios marcadores de pesos moleculares (Gene Ruler™ 100 pb ADN Ladder Plus, Gene Ruler™ 50 pb ADN Ladder Plus) como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

Finalmente, los fragmentos se visualizan en un transiluminador de luz UV tras teñir el gel con bromuro de etidio.

### 2.1.3. Conservación del ADN

El ADN extraído se conserva en los microtubos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante varios meses, o durante varios días a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 3.1. Preparación del ADN

La valoración del ADN total obtenido se realizó mediante espectrofotometría (BioPhotometer de Eppendorf). Para ello se tomaron varias medidas de absorbancia, obteniéndose el valor medio. En el momento de la utilización del ADN todas las muestras de ADN se llevaron a una concentración de 100-180 ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.2. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la reacción de PCR fueron proporcionados por las empresas Ecogen (Barcelona, España), y Thermo Electron Corporation (Alemania). En la Tabla 7 y 8 se encuentran recogidas las secuencias de los oligonucleótidos, así como las condiciones para la amplificación.

### 3.3. PCR para el género *Fusarium*

La identificación a nivel de género de los aislados se realizó mediante la amplificación de un fragmento específico del género *Fusarium* de 389 pb de la región ITS del 28S ADNr, utilizando los iniciadores ITS-Fu-f y ITS-Fu-r (Abd-El salam, *et al.*, 2003, Gómez *et al.*, 2006).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 47  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contenía, 5  $\mu\text{L}$  de tampón 10x (500

mM KCl, 100 mM Tris HCl pH 9.0, 1% Triton X-100), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Eppendorf) y 0.5  $\mu$ L de una solución 20  $\mu$ M de cada iniciador, ITS-Fu-f y ITS-Fu-r y 3  $\mu$ L de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng/ $\mu$ L.

Cada reacción de amplificación incluyó un control negativo, en el que el ADN se reemplazó por agua ultrapura estéril y un control positivo con ADN de las cepas de referencia antes mencionadas. El proceso de amplificación se llevo a cabo en un termociclador modelo PTC-100® Peltier Thermal Cycler (MJ Research), según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### 3.4. PCR para *F. graminearum*

La identificación de la especie *F. graminearum* se llevó a cabo mediante el empleo de los iniciadores 217Fg y 170Fg (Hye-Seon and Lee, 2003), que amplifican un fragmento específico para dicha especie de 600 pb del gen *Tri5*.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 47  $\mu$ L de mezcla de reacción y 3  $\mu$ L de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng, incluyendo un control negativo y un control positivo con el ADN de la cepa CECT 2150 (*G. zeae*). La mezcla de reacción contenía 5  $\mu$ L de tampón 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl pH 9, 1% Triton X-100), 3 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.4  $\mu$ L de cada iniciador a una concentración de 20  $\mu$ M.

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

También se utilizaron para la identificación de la especie *F. graminearum* los iniciadores Fgr-F y Fgc-R (Jurado *et al.* 2005) que amplifican un fragmento de la región IGS de 500 pb.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 47  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción con 5  $\mu\text{L}$  de tampón 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100), 3  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 50 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Añadiendo 3  $\mu\text{L}$  de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng. Se incluyó un control negativo y un control positivo con el ADN de la cepa CECT 2150 (*G. zeae*).

El proceso de amplificación se llevo a cabo en un termociclador modelo Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### 3.5. PCR para *F. verticillioides*

Para identificar la especie *F. verticillioides* se emplearon los iniciadores VER1 y VER2 que amplifican un fragmento de 578 pb de la secuencia del gen calmodulina específico para dicha especie (Mulé *et al.*, 2004 b). Este gen codifica la proteína calmodulina.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 47  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción con 5  $\mu\text{L}$  de 10x tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 50 mM, 0.4  $\mu\text{L}$  de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.4  $\mu\text{L}$  de 20  $\mu\text{M}$  de cada iniciador VER1/ VER2. Añadiendo 3  $\mu\text{L}$  de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng. Se incluyó un control negativo y un control positivo con el ADN de la cepa CECT 2982 (*F. verticillioides*). El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### 3.6. PCR para *F. culmorum*

Los iniciadores Fcu-F y Fgc-R fueron utilizados para la identificación de la especie *F. culmorum*, que amplifican un fragmento específico de 200 pb de la región IGS del ADNr localizado en los genes 28S y 18S (Jurado *et al.*, 2005).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 47  $\mu$ L de mezcla de reacción con 5  $\mu$ L de 10x tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 0.2  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 3 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.4  $\mu$ L de 20  $\mu$ M de cada iniciador Fcu-F / Fgc-R. Añadiendo 3  $\mu$ L de ADN molde concentración entre 100 y 180 ng. Se incluyó un control negativo y un control positivo con el ADN de la cepa CECT 2148 (*F. culmorum*). El proceso de amplificación se llevo a cabo en un termociclador modelo Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### 3.7. PCR para *F. oxysporum*

Para la identificación de la *F. oxysporum* se utilizaron los iniciadores Clox1 y Clox2, que amplifican un fragmento específico de 534 pb de la secuencia del gen que codifica para la proteína calmodulina (Mulé *et al.*, 2004 a).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 47  $\mu$ L de mezcla de reacción y 3  $\mu$ L de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng., incluyendo un control negativo y un control positivo con el ADN de la cepa *F. oxysporum* CECT 2715. La mezcla de reacción contenía 5  $\mu$ L de 10x PCR tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100mM en total, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.4  $\mu$ L de 20  $\mu$ M de cada iniciador Clox1/Clox2. El proceso de amplificación se llevo a cabo en un termociclador Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### 3.8. PCR múltiple para *Fusarium* spp.

Para la identificación simultánea las especies *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. sporotrichioides*, se utilizaron tres pares de iniciadores en la misma reacción de PCR, Fg16F/Fg16R, para *F. graminearum*; FC01F/FC01R, para *F. culmorum* y AF330109CF/AF330109CR, para *F. sporotrichioides*, de los cuales se obtienen bandas de 570, 450, 332 pb respectivamente Demeke *et al.* (2005).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 47  $\mu$ L de mezcla de reacción y 3  $\mu$ L de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng, incluyendo un control negativo y un control positivo con el ADN de cada cepa. La mezcla de reacción contenía 5  $\mu$ L de 10x PCR tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 1.3  $\mu$ L de KCl, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.4  $\mu$ L de 20  $\mu$ M de cada iniciador. El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf - AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### 3.9. PCR para detección de aislados productores de tricotecenos

Una vez identificados los aislados pertenecientes al género *Fusarium*, se llevó a cabo la detección de aislados productores de tricotecenos. Para ello, se utilizaron los iniciadores Tox5-1 y Tox5-2, que amplifican un fragmento de 650 pb de la región del gen *Tri5* (Bakan *et al.*, 2002), gen que codifica el tricodieno sintetasa, enzima que cataliza el primer paso en la biosíntesis de tricotecenos.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 47  $\mu$ L de mezcla de reacción, con 5  $\mu$ L de 10x PCR tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 3 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 3  $\mu$ L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 3  $\mu$ L KCl, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Eppendorf) y 0.5  $\mu$ L de 20  $\mu$ M de cada iniciador Tox5-1 y Tox5-2 y 3  $\mu$ L de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng., se incluyó un control negativo y dos controles positivos con el ADN de las

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este estudio**

	<b>Iniciador</b>	<b>Zona amplificada</b>	<b>Secuencia del iniciador</b>	<b>Medida del producto (pb)</b>
Género <i>Fusarium</i>	ITS-Fu-f ITS-Fu-r	ITS 28S	5'-CAA CTC CCA AAC CCC TGT GA-3'	389
			5'-GCG ACG ATT ACC AGT AAC GA-3'	
<i>F. graminearum</i>	217Fg 170Fg	<i>Tri5</i>	5'-CAGAGTGATCTCATGGCAGG-3'	600
			5'-GGCATGGTTGTATACAGC-3'	
<i>F. graminearum</i>	Fgr-F. Fgc-R	IGS	5'-GTTGATGGGTAAGGTGTG-3'	500
			5'-CTCTCATATACCCTCCG-3	
<i>F. verticillioides</i>	Ver1 Ver2	<i>Calmodulina</i>	5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3'	578
			5'-ATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3'	
<i>F. culmorum</i>	Fcu-F Fgc-R	28S y 18S	5'-GACTATCATTATGCTTGCGAGAG-3'	200
			5'-CTCTCATATACCCTCCG-3'	
<i>F. oxysporum</i>	CLOX1 CLOX2	<i>Calmodulina</i>	5'-AGCAAAGCATCAGACCACTATAACTC-3'	534
			5'-CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT-3'	
<i>Tricotecenos</i>	Tox5-1 Tox5-2	<i>Tri5</i>	5'-GCTGCTCATCACTTTGCTCAG-3'	658
			5'-CTGATCTGGTCACGCTCATC-3'	
DON - NIV	ToxP1 ToxP2	<i>Tri5- Tri6</i>	5'-GCCGTGGGRTAAAAGTCAAA-3'	300 -DON 360 -NIV
			5'-TGACAAGTCCGGTCGCACTAGCA-3'	
PCR-RFLPs	CNL12 CNS1	IGS	5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3'	2800/2600
			5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3'	
Secuenciación	ITS1 ITS4	ITS1-5.8S-ITS2	5 - TTCGTAGGTGAACCTGCGG-3	550-570
			5 - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
PCR Multiple	FC01F FC01R	ITS	5'-ATGGTGAAGTTCGTCGTGGC-3'	570pb
			5'-CCCTTCTTACGCCAATCTCG-3'	
			5'-CTCCGGATATGTTGCGTCAA-3'	
PCR Multiple	Fg16F Fg16R	ITS	5'-GGTAGGTATCCGACATGGCAA-3	450pb
			5'-AAAAGCCCAAATTGCTGATG-3'	
			5'-TGGCATGTTCAATTGTCACCT-3'	
PCR Multiple	AF330109CF AF330109CR	ITS	5'-AAAAGCCCAAATTGCTGATG-3'	332pb
			5'-TGGCATGTTCAATTGTCACCT-3'	
			5'-AAAAGCCCAAATTGCTGATG-3'	

**Tabla 8. Condiciones de temperatura para las reacciones de amplificación**

Iniciadores	Desnaturalización inicial		Ciclos	Segunda desnaturalización		Primer alineamiento		Extensión ADN		Extensión Final ADN	
ITS-Fu-f/ITS-Fu-r	95 °C	2 min.	30	94 °C	1 min.	61 °C	30 seg	72 °C	1 min.	72 °C	5 min.
217Fg/170Fg	94 °C	2 min.	30	94 °C	30 seg	53 °C	30 seg	72 °C	1 min.	72 °C	10 min.
Fgr-F/Fgc-R	94 °C	120 seg	25	95 °C	35 seg	53.2 °C	30 seg	72 °C	30 seg	72 °C	5 min.
VER1/ VER2	94 °C	3 min.	35	94 °C	50 seg	57 °C	50 seg	72 °C	1 min.	72 °C	7 min.
Fcu-F/Fgc-R	94 °C	85 seg	30	95 °C	35 seg	54 °C	30 seg	72 °C	30seg	72 °C	5 min.
CLOX1/CLOX2	94 °C	5 min.	35	94 °C	50 seg	61 °C	1 min.	72 °C	1 min.	72 °C	7 min.
Tox5-1/ Tox5-2	95 °C	2 min.	35	95 °C	1 min.	63 °C	51 seg	72 °C	1 min.	72 °C	5 min.
ToxP1/ToxP2	95 °C	5 min.	30	94 °C	1 min.	54 °C	1 min.	72 °C	50 seg	72 °C	6 min.
CNL12/CNS1	94 °C	85 seg	35	95 °C	35 seg	58 °C	55 seg	72 °C	120 seg	72 °C	10 min.
ITS1/ITS4	95 °C	60 seg	35	95 °C	30 seg	55 °C	60 seg	72 °C	60 seg	72 °C	6 min.
PCR Múltiple	95 °C	3 min.	38	95 °C	30 seg	61.6 °C	20 seg	72 °C	45 seg	72 °C	5 min.

cepas CECT 2150 (*G. zeae*) y la CECT 2148 (*F. culmorum*), por ser cepas productoras de tricotecenos.

El proceso de amplificación se llevo a cabo en un termociclador modelo PTC-100® Peltier Thermal Cycler (MJ Research), según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### **3.10. PCR para detección de aislados de *Fusarium* spp., productores de deoxinivalenol (DON) y nivalenol (NIV)**

Se utilizaron los iniciadores ToxP1 y ToxP2 para amplificar la secuencia intergénica de los genes *Tri5* - *Tri6*, involucrados en la producción de micotoxinas, detectando simultáneamente dos fragmentos: uno de 300 pb para el quimiotipo de *F. graminearum* productor de deoxinivalenol (DON) y otro fragmento de 360 pb para el quimiotipo de *F. graminearum* productor de nivalenol (NIV) (He-Ping *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 50  $\mu$ L, que contenía 47 $\mu$ L de mezcla de reacción con 5  $\mu$ L de 10x PCR tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 50 mM, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 0.5  $\mu$ L de 20  $\mu$ M de cada iniciador ToxP1/ToxP2. Añadiendo 3  $\mu$ L de ADN molde concentración entre 100 y 180 ng. Se incluyó un control negativo y un control positivo con el ADN de la cepa CECT 2150 (*G. zeae*). El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### **3.11. PCR para amplificación de la región IGS**

La región IGS del ADNr fue amplificada con los iniciadores universales CNL12 y CNS1 (Anderson and Stasovski, 1992). Para la amplificación se realizó una mezcla de 50 $\mu$ L que contenía 5  $\mu$ L de 10x PCR tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng, 0.4  $\mu$ L de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2.5

unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) y 6  $\mu\text{L}$  de 20  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, CNL12 y CNS1.

El proceso de amplificación se lleva a cabo en un termociclador Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### **3.12. PCR para amplificación de la región ITS1- 5.8S - ITS2 y posterior secuenciación**

La región ITS del ADNr fue amplificada con los iniciadores universales ITS1 y ITS4 (White *et al.*, 1990). La mezcla para la amplificación se realizó en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  que contenía 5  $\mu\text{L}$  de 10x PCR tampón (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 9), 1% Triton X-100), 3  $\mu\text{L}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3  $\mu\text{L}$  de ADN a una concentración entre 100 y 180 ng., 0.4  $\mu\text{L}$  de cada dNTP's a una concentración de 100 mM en total, 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Eppendorf) y 1  $\mu\text{L}$  de 20  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, ITS1/ITS4. Se realizaron tres repeticiones de cada reacción de PCR para obtener un volumen de 150  $\mu\text{L}$  ya que se necesitan al menos 100  $\mu\text{L}$  de producto amplificado para purificar previo a la secuenciación.

El proceso de amplificación se lleva a cabo en un termociclador Eppendorf-AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 8.

### **3.13. Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción amplificados por PCR (PCR-RFLP) de la región IGS**

Los fragmentos amplificados obtenidos de *F. graminearum* y *F. verticillioides*, se digirieron con enzimas de restricción, para poder observar cambios dentro de la región IGS. Los enzimas elegidos fueron cinco de 4-pb: *Mbol*, *Hin6I*, *HhaI*, *AluI*, *BsuRI* y tres de 6-pb: *XhoI*, *EcoRI*, *Hind III* (Fermentas) (Kim *et al.*, 2001; Ferrer *et al.*, 2001; Llorens *et al.*, 2006; Patiño *et al.*, 2006). Las digestiones se realizaron empleando el tampón correspondiente a cada enzima a la concentración de uso, 10  $\mu\text{L}$  del amplificado y 2  $\mu\text{L}$  de enzima, en un volumen final de 30  $\mu\text{L}$ . Se incubaron las digestiones a 37 °C toda la noche. Para la electroforesis se emplearon 15  $\mu\text{L}$  del

volumen de la restricción en un gel de agarosa al 2.5% en tampón TAE 1X, que se sometió a 60 V durante tres horas y media, y luego fue teñido con bromuro de etidio para ser visualizado con luz UV. Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se determinaron por comparación con dos estándares de pesos moleculares de 100 pb ADN y 50 pb ADN (MBI Fermentas).

Una vez calculado el peso molecular de cada banda, para el análisis estadístico fue computada la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda para el cálculo de una matriz de similitud mediante el coeficiente de Dice (Soll, 2000), que excluye las dobles ausencias, según la fórmula:

$$\frac{2a}{2a+b+c}$$

Donde *a* indica concordancia y *b* y *c*, discordancia. Dicha matriz fue transformada en un árbol taxonómico basándose en el agrupamiento mediante el algoritmo UPGMA (Sneath and Sokal, 1973). Todos los cálculos fueron realizados a través del programa NTSYSpc-2.02h (Applied Bioestatistics Inc).

#### **4. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DE LA REGIÓN ITS1– 5.8S – ITS2**

Los productos amplificados de la región ITS1–5.8S–ITS2 de los aislados de *F. graminearum* y *Fusarium* spp., provenientes de maíz se purificaron usando el Kit GenElute™ PCR clean-Up (SIGMA). Se conservó el ADN purificado a -20 °C hasta su uso. Aproximadamente 2 µL del producto de la PCR purificada fueron requeridos en cada secuenciación. La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa Sistemas Genómicos S. L. de Valencia (España).

Los productos se analizaron mediante secuenciación de cadena simple. La reacción de cada secuenciación consistía en aproximadamente 500 a 600 nucleótidos. La secuencia de datos fue proporcionada en formato alfabético como archivo ABI, mostrando la secuencia completa, y como electroferograma, que es legible mediante el programa informático CHROMAS versión 1.45 (C. McCarthy, School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia). Para obtener la

secuencia del fragmento completo se ensamblaron manualmente los fragmentos continuos generados por los iniciadores “forward” y “reverse”, usando el programa PHYDIT. Los extremos de cada secuencia que contienen datos mal resueltos deben ser suprimidos antes del ensamblaje. De esta manera se obtiene una secuencia casi completa.

La identificación más probable o más próxima fue determinada en la base de datos del National Center for Biotechnology Information, utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron alineadas para generar árboles filogenéticos y matrices de similitud de nucleótidos usando el programa PHYDIT (<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>). Los árboles filogenéticos fueron elaborados usando “neighbour-joining” (el vecino más próximo) (Saitou and Nei, 1987), y el algoritmo utilizado fue el de Jukes and Cantor (1969) el cual es un modelo de distancia para generar una matriz de distancia evolutiva.

La topología de los arboles filogenéticos fue evaluada por “bootstrap” (inferencia estadística por remuestreo) (Felsenstein, 1985) basado en el método de neighbour-joining. Los datos filogenéticos fueron presentados como los árboles usando el programa TREECON (Van de Peer and DeWachter, 1994). La raíz del árbol se basó en método “neighbour-joining” usando secuencias de cepas tipo de *Fusarium*, el cual permite la detección de la topología interna del árbol (Swofford y Olsen, 1990).

## **5. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MICOTOXINAS: Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, 15-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X y Nivalenol**

El método empleado para la determinación de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol en muestras, es el desarrollado por Eskola *et al.* (2000), con una serie de modificaciones realizadas en el laboratorio de Microbiología de Universidad Politécnica de Valencia.

El presente estudio incluyó la creación de una biblioteca de micotoxinas derivatizadas con Sylon BTZ. Las micotoxinas son deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON), fusarenon X (FUS X), 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) y nivalenol (NIV), las cuales se adquirieron en forma cristalina en viales de 1 mg (Sigma). Los disolventes utilizados fueron acetonitrilo p.a. (Scharlab) y n-hexano p.a. (Scharlab); los reactivos y productos químicos utilizados fueron:

- filtros Whatman grado 2V
- cartuchos MycoSep® 227 Trich (Romer labs)
- agente derivatizante (Sylon BTZ): mezcla de N, O-bis (trimetilsilil)
- acetamida + trimetilclorosilano + trimetilsilimidazol (BSA + TMCS + TMSI) (3:2:3), 25 mL) (Sigma)
- Neosolaniol (patrón interno) (Sigma)
- tampón fosfato 1 M, pH = 7
- nitrógeno seco (Abelló Linde, S.A.)

Tanto los disolventes como los reactivos y productos químicos utilizados son de calidad analítica si no se especifica lo contrario.

El instrumental utilizado se enumera a continuación:

- material de vidrio de laboratorio
- balanza analítica Mettler Toledo XS204
- homogeneizador Ultra-turrax Ika T-25 basic
- cromatógrafo de gases/masas provisto de inyector automático y control de vacío
- Agilent Technologies 5975 inert mass selective detector; 6890 N network GC system ; 7683 B series inyector

Todo el material de vidrio volumétrico utilizado es de clase A.

Para la creación de la biblioteca de micotoxinas, se analizó en el cromatógrafo de gases con detector de masas, un patrón de cada una de las seis micotoxinas por separado. Se obtuvo por una parte el cromatograma de iones totales correspondiente a la inyección de la micotoxina en cuestión, conociendo así su

tiempo de retención, y por otra, el espectro de la micotoxina, en el cual se observan las masas de sus iones, tanto el cuantitativo como los cualitativos. Toda esta información queda archivada para el reconocimiento de las micotoxinas en las futuras muestras a analizar.

### 5.1 Extracción y purificación

Se sembraron los aislados de *F. graminearum* en tres medios de cultivo PDA, YES y Czapeck. Se analizaron las muestras a los 7, 14 y 21 días de incubación a 20 °C. Para ello, se pesó 1 g de muestra de la placa en cuestión y se depositó en un tubo Falcon. A continuación se añadieron 25 ml de mezcla disolvente CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (acetonitrilo:agua) 84:16 y se agitó durante 3 minutos en un homogeneizador dispersador ultraturax a 17500 rpm. Transcurrido ese tiempo se procedió a la filtración con papel de filtro plegado (Whatman 2V). Del extracto se tomaron 8 mL que se purifican a través de cartucho Mycosep<sup>®</sup> 227, y el extracto purificado obtenido se recogió en un tubo de ensayo. El cartucho Mycosep<sup>®</sup> 227 es de nuevo lavado con 8 mL de acetonitrilo puro para incrementar la recuperación de los compuestos más polares (Jestoi, 2005). El volumen de lavado recogido se une al extracto puro obtenido previamente. Posteriormente el extracto se evapora a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno seco, en baño termostático a 50 °C. El extracto seco se mantiene en congelador hasta su posterior análisis.

### 5.2. Derivatización de las micotoxinas

Las micotoxinas estudiadas requieren la formación de derivados con el fin de aumentar su volatilidad y poder ser analizadas por cromatografía de gases/masas. La derivatización consiste en introducir en las moléculas de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol, grupos trimetilsililo (TMS), frecuentemente en sustitución de un hidrógeno activo, lo que reduce la polaridad del compuesto y disminuye el número de enlaces de hidrógeno. El derivado sililado es más volátil y mejora la estabilidad térmica del compuesto.

Al residuo seco anterior se añadió 50 µL del agente derivatizante Sylon BTZ (mezcla de N, O-bis (trimetilsilil) acetamida + trimetilclorosilano + trimetilsilimidazol);

BSA + TMCS + TMSI 3:2:3), manteniéndolo a 80 °C durante 30 min., en un baño termostático. Tras la derivación, se deja atemperar. Posteriormente se le añadió 175 µL de n-hexano y se agita en vortex 30 seg, para luego adicionar 1mL de tampón fosfato 1M (pH = 7) y se agitó de nuevo en el homogenizador vortex otros 30 seg. Finalmente se adicionaron 75 µL de disolución neosolaniol derivatizado 10 ppm en n-hexano y se homogenizo en agitador vortex. Con dichos volúmenes de hexano y de neosolaniol obtenemos una concentración de patrón interno (neosolaniol) de 3 ppm, que es la que se ha considerado adecuada tras un estudio para la optimización de su concentración. De esta manera se obtuvo la fase hexánica, que es trasvasada a un vial, rechazándose la fase acuosa. La fase orgánica así separada se reserva para su posterior inyección en el cromatógrafo.

### **5.3. Determinación de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol, por Cromatografía de Gases con Detector de Masas**

#### **5.3.1. Condiciones del cromatógrafo y del detector de masas**

Las condiciones elegidas para el cromatógrafo y más concretamente para las temperaturas del detector, inyector y horno fueron optimizadas en el laboratorio de Micología de la Universidad Politécnica de Valencia, con la finalidad de obtener la máxima separación posible entre las diferentes micotoxinas a estudiar, especialmente 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X y 15-acetildeoxinivalenol, ya que sus tiempos de retención son muy próximos. Las condiciones del cromatógrafo son las siguientes:

- columna HP5 de 30 m de longitud, 250 µm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de film
- flujo de 1.8 mL/min.
- el gas portador es helio
- volumen de inyección de muestra de 2 µL
- programa de temperatura del horno:
  - 80 °C durante 1 min.
  - de 80 a 240 °C a 30 °C/min.

de 240 a 280 °C a 5 °C/min.

- Columna HP5 30 m x 250 µm x 0.25 µm nominal

Las condiciones del detector son las siguientes:

- Temperatura del cuadrupolo: 150 °C
- Temperatura de la fuente de ionización: 230 °C

### **5.3.2. Cuantificación de Deoxinivalenol, 3- Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol por patrón interno**

Las concentraciones de micotoxina, tanto en los patrones como en los aislados, se cuantifican mediante la técnica de patrón interno. Un patrón interno es una sustancia empleada para establecer relaciones matemáticas con los analitos a determinar, con el objeto de mejorar la precisión del método y del instrumento. Además, no debe encontrarse en las muestras a analizar, debe ser separable de los otros componentes de la muestra y no debe reaccionar químicamente ni con los componentes de la muestra ni con los analitos a determinar (Woodget and Cooper, 1995).

Para poder cuantificar la concentración de micotoxina presente de forma natural en las muestras se calcula, a partir de una concentración conocida de patrón de micotoxina, a la que se le añade una concentración constante de patrón interno, un factor de respuesta (Fr), el cual relaciona las abundancias de ambas sustancias. La fórmula de cálculo es la siguiente:

$$Fr = \frac{C_i \cdot A_{pi}}{A_i \cdot C_{pi}}$$

donde:  $C_i$ : concentración de micotoxina i

- $A_i$ : abundancia ión de la micotoxina i
- $A_{pi}$ : abundancia ión del patrón interno
- $C_{pi}$ : concentración de patrón interno

Una vez conocido el Fr, podremos cuantificar la concentración de micotoxina presente en una muestra despejando de la formula anterior:

$$C_x = \frac{Fr \cdot A_x \cdot C_{pi}}{A_{pi}}$$

donde.  $C_x$ : concentración de la micotoxina en la muestra  
 $A_x$ : abundancia ión de la micotoxina en la muestra

Los iones empleados para la identificación y determinación de las diversas micotoxinas son de dos tipos: cuantitativos y cualitativos. Los primeros los utilizamos para cuantificar su abundancia y se eligen por ser los que proporcionan una respuesta analítica alta y además no son comunes como ión principal al resto de analitos. Los iones cualitativos se utilizan para confirmar la presencia de la micotoxina correspondiente. Todos ellos se muestran en la Tabla 9.

#### **5.4. Estudio de los parámetros analíticos del método**

##### **5.4.1. Intervalo de linealidad**

El estudio de linealidad se llevaron a cabo mediante la elaboración de rectas de calibrado para cada micotoxina. El intervalo de concentraciones de micotoxina se eligió teniendo en cuenta:

- la concentración de micotoxina presente de forma natural en las muestras de estudio
- las concentraciones establecidas como máximos permisibles en las diferentes legislaciones vigentes

Por último, las concentraciones inferiores del intervalo se eligen cercanas a los límites de cuantificación.

**Tabla 9. Tiempos de retención e iones característicos de las micotoxinas**

Micotoxina	Tiempo de retención aproximado (min.)	Ión cuantitativo	Iones cualitativos
DON	9.031	235	259 / 295
3-AcDON	9.819	377	295 / 467
FUS X	9.886	480	450
15-AcDON	9.953	392	350 / 407
NIV	10.164	289	349 / 379
NEO	11.119	290	252

DON: deoxinivalenol; 3-AcDON: 3-acetildeoxinivalenol; FUS X: Fusarenon X; 15-AcDON: 15-acetildeoxinivalenol; NIV: nivalenol; NEO: neosolaniol

El comportamiento lineal debe ser demostrado dentro del intervalo en el cual se va a trabajar. Debido a ello, y basándonos en datos bibliográficos sobre deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol, optamos por trabajar en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 5 mg/kg (Jestoi, 2004; 2005).

Para verificar la linealidad de la respuesta del detector de masas con respecto a la concentración de las micotoxinas se confecciono una curva de calibrado con 6 puntos (0.1, 0.5, 1, 2, 3 y 5 mg de micotoxina/kg), a partir de la cual se hallo la ecuación de regresión que relaciona las concentraciones de micotoxina con el valor de la abundancia de ión detectada por el cromatógrafo y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), parámetro que cuantifica el grado de correlación lineal entre las variables concentración de micotoxina y abundancia de ión.

#### 5.4.2. Límite de cuantificación o determinación

El límite de cuantificación es la mínima concentración cuantificable con una precisión y exactitud aceptable. Tomamos como valor de este límite la cantidad de micotoxina que corresponde al valor medio del ruido de fondo del cromatograma más 6 veces la desviación estándar.

El valor medio del ruido de fondo es proporcionado por el software del equipo, que evalúa la relación señal/ruido de fondo para los diferentes iones obtenidos para cada micotoxina. El valor del límite de cuantificación se expreso en  $\mu\text{g}$  de micotoxina/kg de muestra.

#### **5.4.3. Exactitud y precisión del método: ensayos de fortificación y recuperación de micotoxina**

Para evaluar la exactitud y precisión del método analítico se realizaron ensayos de recuperación de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol en los cuales se compararon las concentraciones detectadas de las micotoxinas con las concentraciones teóricas añadidas a las muestras.

Se toma una muestra de un 1g por cada medio de cultivo analizado (PDA, YES, Czapeck a la que se adiciona una concentración conocida de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol. Se fortificaron tres muestras independientes para cada nivel de concentración de micotoxina y tipo de matriz. Los niveles de fortificación fueron:

- a) 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de cada micotoxina.
- b) 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de cada micotoxina.

Las muestras así fortificadas se procesan por el método de extracción, purificación, detección y cuantificación descrito anteriormente y se halló el porcentaje de recuperación en cada uno de los medios de cultivo.

Todas las muestras fueron analizadas previamente para comprobar la ausencia de micotoxinas. Las muestras sin fortificar se utilizan como control o blanco negativo.



## IV. RESULTADOS

---



## IV. RESULTADOS

### 1. CONTAMINACIÓN FÚNGICA DE LOS GRANOS DE MAÍZ

#### 1.1. Maíz almacén

Después de 7 días de incubación a 28 °C, se evaluó el crecimiento fúngico de las 10 muestras de maíz almacén en los medios de cultivo PDA-CL y AVM, estudiando cualitativa y cuantitativamente los granos donde habían crecido hongos. El porcentaje de granos contaminados se calculó teniendo en cuenta el total de los granos sembrados (100 granos de cada muestra). Los granos presentan un nivel medio de contaminación de 43% en PDA-CL y un 44.4% en AVM. Destacaba una de las muestras, que alcanzó un nivel de contaminación del 98% de los granos sembrados en PDA-CL.

Cuando diferenciamos los granos contaminados con *Fusarium* spp., del resto de contaminación fúngica (Tabla 10), se observa que el número de granos contaminados por *Fusarium* spp., es prácticamente igual en los dos medios, 162 (32.4%) en PDA y 170 (34%) en AVM, y el porcentaje de contaminación para las distintas muestras varía entre 22 y 70%, en medio PDA-CL y entre 18 y 78% en medio AVM.

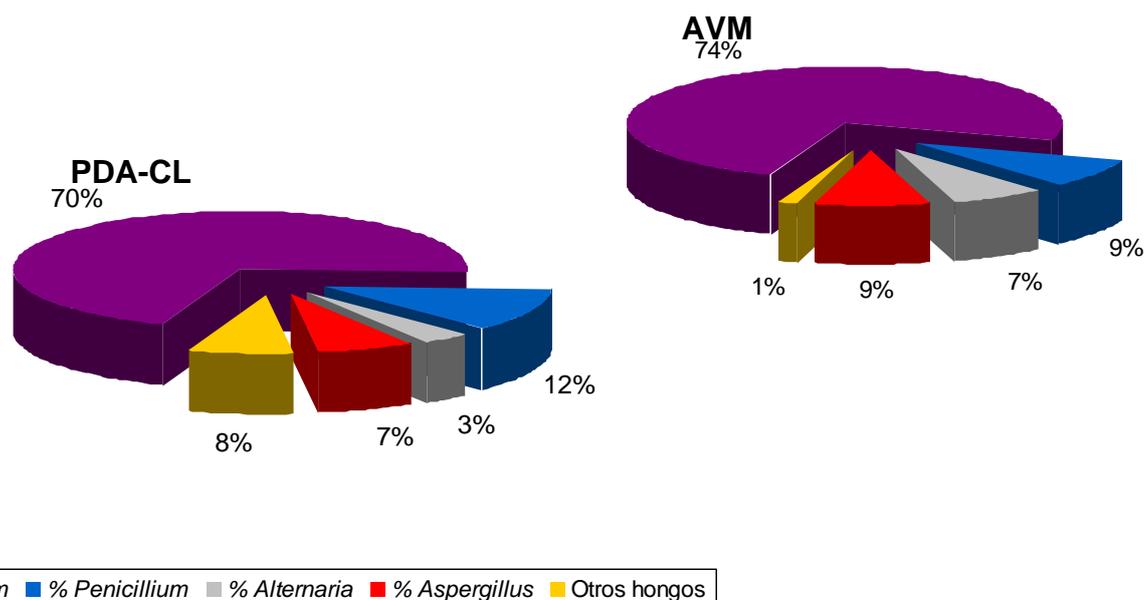
Respecto a la identificación de los hongos aislados, los datos muestran que el género predominante en estas muestras es *Fusarium* (Fig. 7, Tabla 11). De 236 hongos aislados en medio PDA, el 12.28% corresponde a *Penicillium* spp., 3.38% a *Alternaria* spp., 6.78% a *Aspergillus* spp., y el 70% a *Fusarium* spp. En el medio de cultivo AVM de 238 hongos aislados, el 8.82% corresponde a *Penicillium* spp., 6.72% a *Alternaria* spp., 8.82% a *Aspergillus* spp., y un 74.36% a *Fusarium* spp.

De los 1000 granos analizados encontramos 474 aislados, de los cuales 342 pertenecían al género *Fusarium*, lo que corresponde al 72% de la contaminación fúngica.

## Resultados

**Tabla 10. Número de granos de maíz almacén contaminados por hongos en los dos medios de cultivo utilizados PDA-CL y AVM**

Nº de muestra	Nº de granos contaminados por algún tipo de hongo y %		Nº de granos contaminados con <i>Fusarium</i> spp., y %		Nº de granos contaminados por algún tipo de hongo y %		Nº de granos contaminados con <i>Fusarium</i> spp., y %	
	PDA-CL		PDA-CL		AVM		AVM	
1	38	(76%)	16	(32%)	42	(84%)	25	(50%)
2	49	(98%)	35	(70%)	41	(82%)	39	(78%)
3	0		0		2	(4%)	0	
4	34	(68%)	32	(64%)	28	(56%)	25	(50%)
5	31	(62%)	29	(64%)	33	(66%)	33	(66%)
6	2	(4%)	0		5	(10%)	0	
7	0		0		0		0	
8	13	(26%)	11	(22%)	19	(38%)	9	(18%)
9	13	(26%)	13	(26%)	13	(26%)	13	(26%)
10	35	(70%)	26	(52%)	39	(78%)	26	(52%)
Total	215	(43%)	162	(32.4%)	222	(44.4%)	170	(34%)



**Figura. 7. Porcentaje de cada género fúngico obtenidos de maíz almacén en los medios de cultivo PDA-CL y AVM**

**Tabla 11. Micobiota de granos de maíz de almacén en los dos medios de cultivo utilizados PDA-CI y AVM**

N°. de muestra	PDA-CL					AVM				
	N°. de hongos	% <i>Penicillium spp.</i>	% <i>Alternaria spp.</i>	% <i>Aspergillus spp.</i>	% <i>Fusarium spp.</i>	N°. de hongos	% <i>Penicillium spp.</i>	% <i>Alternaria spp.</i>	% <i>Aspergillus spp.</i>	% <i>Fusarium spp.</i>
1	49	30.6	6.12	20.41	36.76	62	11.11	17.46	25.39	39.70
2	59	11.86	6.78	5.08	57.63	42	4.76	0	0	95.24
3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	100
4	34	2.94	0	0	91.17	27	3.70	0	0	96.30
5	31	3.22	0	0	93.55	33	2.94	0	0	97.06
6	2	100	0	0	0	5	100	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	13	7.69	7.69	0	84.62	15	26.67	6.66	0	60
9	13	0	0	0	100	13	0	0	0	100
10	35	5.71	0	8.57	85.71	39	0	10.26	10.26	79.49
Total	236	12.38	3.38	6.78	70	238	8.82	6.72	8.82	74.36

## 1.2. Maíz campo

Para las 100 muestras de maíz campo se analizaron un total de 5000 granos, 2500 en PDA-CI y 2500 en AVM, en 500 placas de cada medio. Después de 7 días de incubación a 28 °C, se evaluó el nivel de contaminación fúngica en los granos, estimando su porcentaje. En la Tabla 12 se exponen los valores totales de granos contaminados y su respectivo porcentaje para cada una de las muestras analizadas. (Anejo 2).

Tabla 12. Número y porcentaje de granos de maíz campo contaminados por hongos.

PDA-CI		AVM		Granos totales contaminados
Nº granos	%	Nº granos	%	
974/2500	38.96	32/2500	29.28	1706/5000

El porcentaje de granos contaminados por algún tipo hongo es del 38.96%. Básicamente, la micobiota encontrada en el maíz campo se compone de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, y del grupo de mucorales, principalmente del género *Rhizopus*. Otros géneros, como *Alternaria*, *Cladosporium*, y *Geotrichum*, han aparecido de forma puntual (Anejo 2). El número y porcentaje de los géneros encontrados para cada medio de cultivo se resume en la Tabla 13. Para el medio PDA-CI los porcentajes más altos corresponden a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, mientras que en el medio AVM destaca el alto porcentaje del género *Fusarium*.

En la Fig. 8 se representan los porcentajes obtenidos para cada género en medio PDA-CI, ya que este medio es general para el desarrollo de los hongos y donde se obtuvo el mayor aislamiento de hongos, dando unos valores reales de toda contaminación fúngica existente en las muestras de maíz campo analizadas. Se comprueba que los géneros predominantes son *Penicillium* con un 40%, *Fusarium* con un 22% y *Aspergillus* con un 21%, seguido por el grupo de los mucorales con un 11%.

Tabla 13. Distribución de la contaminación fúngica en granos de maíz campo

Géneros	PDA-CI	Porcentaje (%)	AVM	Porcentaje (%)	Total
<i>Fusarium</i>	283	22.2	351	40,34	634
<i>Alternaria</i>	47	3.69	21	2.41	68
<i>Aspergillus</i>	263	20.65	141	16.20	404
<i>Cladosporium</i>	12	0.94	0	0	12
<i>Geotrichum</i>	12	0.94	28	3.21	40
Mucorales	142	11.15	94	10.80	236
<i>Penicillium</i>	515	40.45	235	27	750
<b>Nº total hongos</b>	1273		870		2143

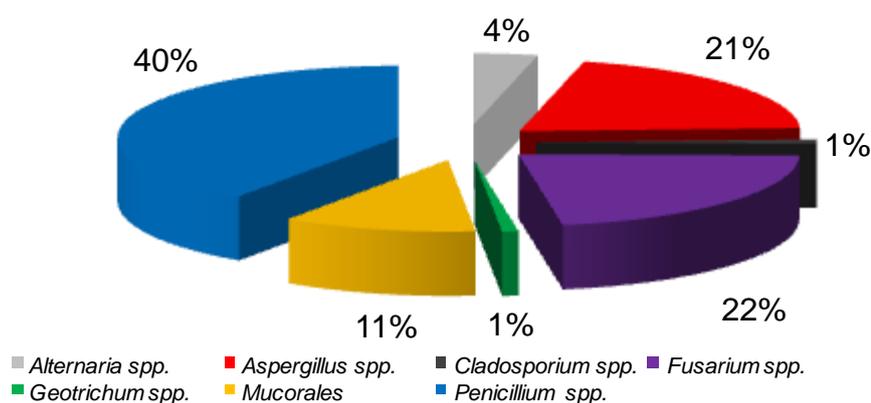


Figura 8. Porcentajes para cada género fúngico de maíz campo obtenidos en medio PDA-CI

Como se observa en la Fig. 9, en todos los casos el porcentaje obtenido para cada uno de los géneros fúngicos hallados en los granos de maíz, es superior en el medio PDA-CI, excepto para los géneros *Geotrichum* y *Fusarium*, cuyos porcentajes son mayores en AVM.

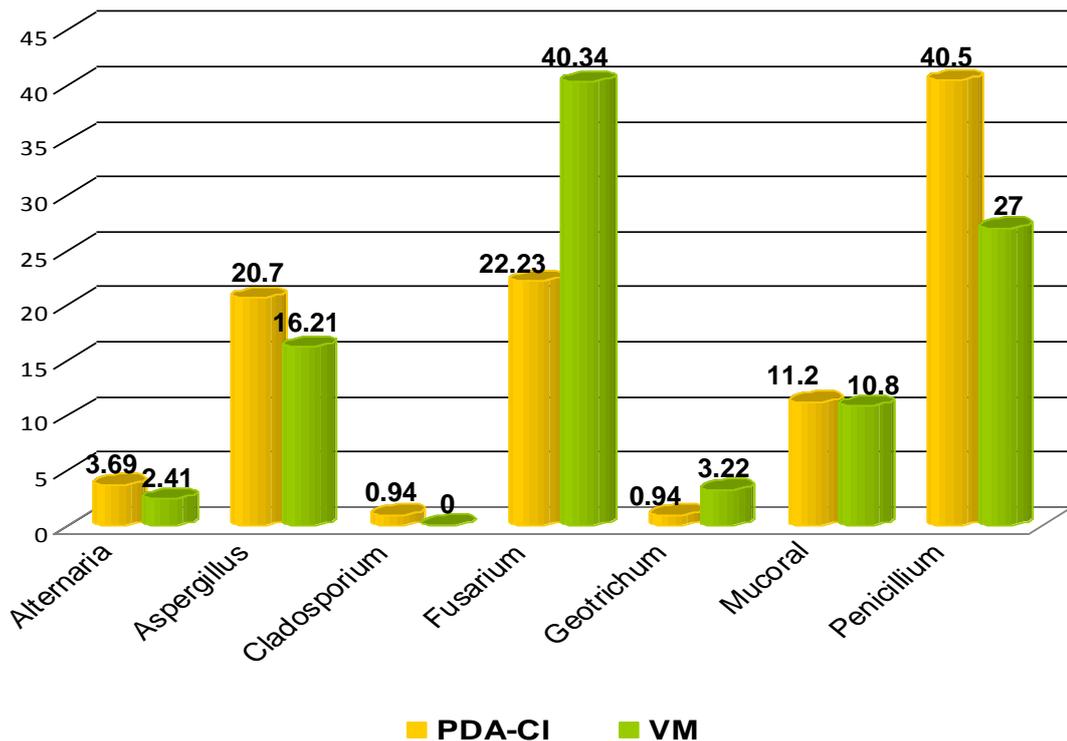
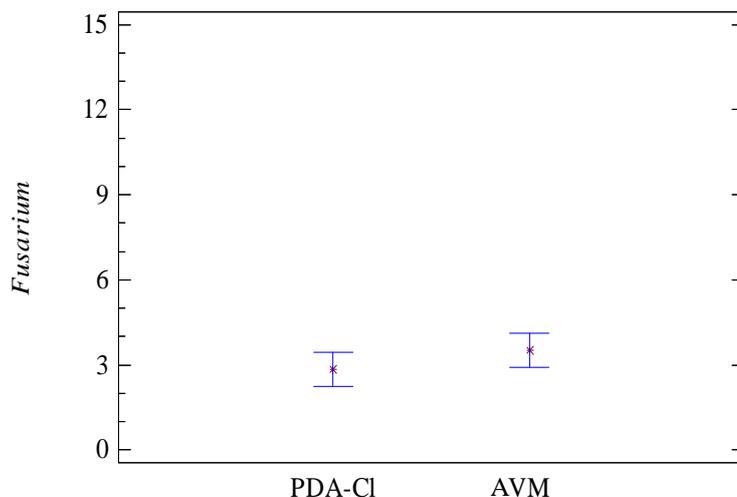


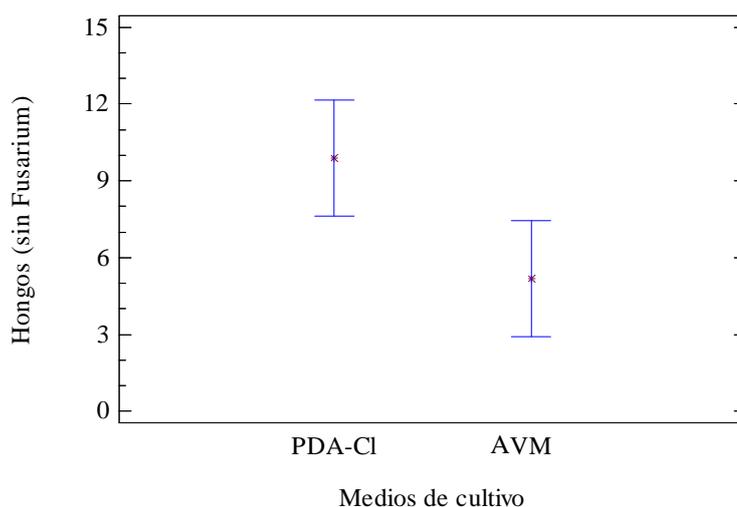
Figura 9. Distribución en porcentaje de la contaminación fúngica según el medio de cultivo, para granos de maíz campo

Se realizó un estudio estadístico basado en el análisis de la varianza, utilizando el programa Statgraphics versión 5.0. Para ello, se emplearon los datos correspondientes al número de aislados de *Fusarium* spp., y al número de aislados pertenecientes a otros géneros, obtenidas con cada medio de cultivo. Los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), para un nivel de confianza del 95%, entre los valores medios para el género *Fusarium* respecto al medio de cultivo empleado ya que se presenta solapamiento en intervalos LSD (*Least Significant Differences*), para cada medio de cultivo (Fig. 10). Sin embargo, sí existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para el resto de hongos, en función al medio de cultivo ( $p < 0.05$ ), ya que no se presenta solapamiento entre los intervalos LSD correspondientes al medio PDA-CI y al AVM (Fig. 11).

En la Fig. 10 se observa que la media obtenida en AVM para el número de cepas del género *Fusarium* es ligeramente superior al medio PDA-CL, mientras que en la Fig. 11, la media obtenida del número de géneros fúngicos es marcadamente superior en PDA-CL.



**Figura 10. Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de *Fusarium* aislado de maíz campo en los medios de cultivos**



**Figura 11. Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de hongos no pertenecientes al género *Fusarium*, aislado de maíz campo en los medios cultivo PDA-CL y AVM**

Se determinó si existían diferencias para los géneros de hongos encontrados dentro de las diferentes Comunidades Autónomas, comparando los resultados obtenidos en el medio PDA-CL, puesto que es el medio general que no tiene ningún agente selectivo o inhibidor. En la Tabla 14 se exponen los porcentajes obtenidos para cada género fúngico estudiado respecto a la Comunidad Autónoma, y se indica el número de muestras estudiadas en cada una de ellas. Los porcentajes se han calculado en función al número de hongos obtenidos.

Los porcentajes obtenidos para cada género fúngico hallado en las muestras procedentes de la Comunidad Autónoma de Castilla la Mancha, indican que los géneros predominantes son: *Penicillium* con 47%, *Fusarium* con 23.1%, *Aspergillus* 16.9%, *Alternaria* 3.8%, *Cladosporium* 1.48%, *Geotrichum* 1.2% y mucorales 6.6%.

Dentro de la Comunidad Valenciana, los géneros predominantes son *Penicillium* con 46.9%, *Aspergillus* 26.1%, *Fusarium* 16.4%, *Alternaria* 2.6%, y mucorales 8 %.

En la Comunidad de Extremadura el género predominante es *Aspergillus* con 48%, seguido por el grupo de mucorales que representa un 31%, *Fusarium* 18.3%, *Geotrichum* 2.82%. No se detectaron los géneros *Penicillium*, *Alternaria*, ni *Cladosporium*.

En la Comunidad de Madrid, los aislados pertenecientes al género *Alternaria*, son los predominantes, con un porcentaje del 37%, seguido del género *Fusarium*, el grupo de los mucorales, *Penicillium* y *Aspergillus* con un 22.2%, 22.2%, 11.1%, 7.4% respectivamente. En este caso no se hallaron hongos de los géneros *Cladosporium* ni *Geotrichum*.

En la Comunidad de la Región de Murcia, los géneros fúngicos predominantes son mucorales con un 30.9%, *Fusarium* 28.7%, *Aspergillus* 22.8% y *Penicillium* 17.6%. En este caso, las muestras no registraron ningún aislado perteneciente a los géneros *Geotrichum*, *Alternaria* y *Cladosporium*.

Los porcentajes obtenidos para el género *Fusarium* (en PDA-CL) en todas las Comunidades Autónomas muestran valores similares, comprendidos en un intervalo de 16.4% a 28.7%, correspondiendo el mayor valor a la región de Murcia y el menor a la Comunidad Valenciana.

De 100 muestras estudiadas de granos de maíz campo, en 64 de ellas se encontraron hongos pertenecientes al género *Fusarium*, con un total de 228 aislados, los cuales se identificaron morfológicamente.



Fotografía 2.1. *Fusarium* sp., y *Aspergillus* sp., en PDA-CI



Fotografía 2.2. *Aspergillus* sp., en medio AVM



Fotografía 2.3. *Penicillium* sp., en PDA-CI



Fotografía 2.4. *Fusarium* sp., y *Alternaria* sp., en AVM



Fotografía 2.5. *Fusarium* sp., en PDA-CI



Fotografía 2.6. *Fusarium* sp., en AVM

Fotografía 2. Desarrollo de algunas de las especies fúngicas contaminantes en maíz campo

## Resultados

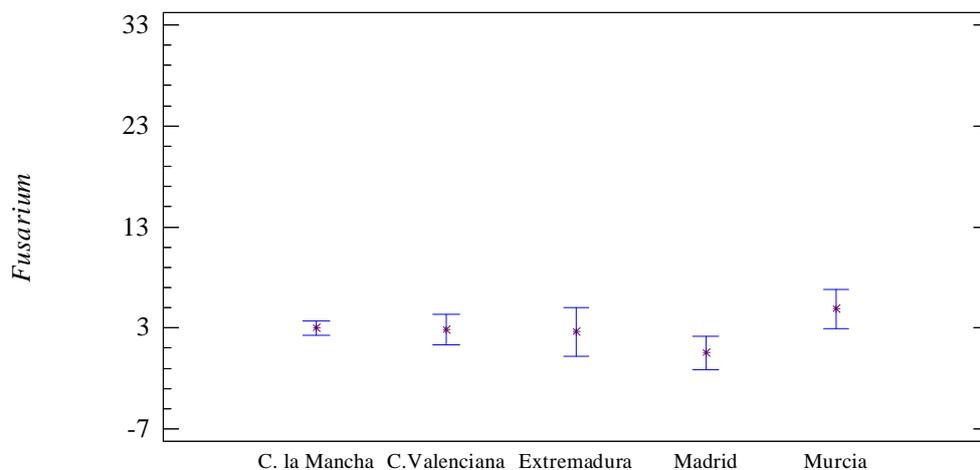
**Tabla 14. Porcentajes de hongos aislados de maíz campo en función de la Comunidad Autónoma estudiada**

	Comunidades Autónomas									
	Castilla la Mancha		C. Valenciana		Extremadura		Madrid		Murcia	
	PDA-CL	AVM	PDA-CL	AVM	PDA-CL	AVM	PDA-CL	AVM	PDA-CL	AVM
<b>Géneros</b>	%		%		%		%		%	
<i>Alternaria</i>	3.8	1.8	2.6	1.4	0	0	37	40.9	0	0
<i>Aspergillus</i>	16.9	10	26.1	20.9	48	57	7.4	0	22.8	25.7
<i>Cladosporium</i>	1.48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>Fusarium</i></b>	<b>23.1</b>	<b>44.1</b>	<b>16.4</b>	<b>30.2</b>	<b>18.3</b>	<b>26.5</b>	<b>22.2</b>	<b>40.9</b>	<b>28.7</b>	<b>40</b>
<i>Geotrichum</i>	1.2	3.6	0	2.9	2.82	0	0	0	0	3.81
Mucorales	6.6	8.1	8	5.8	31	16.3	22.2	18.2	30.9	27.6
<i>Penicillium</i>	47	32.1	46.9	38.9	0	0	11.1	0	17.6	2.9
Muestras analizadas	63		13		5		11		8	

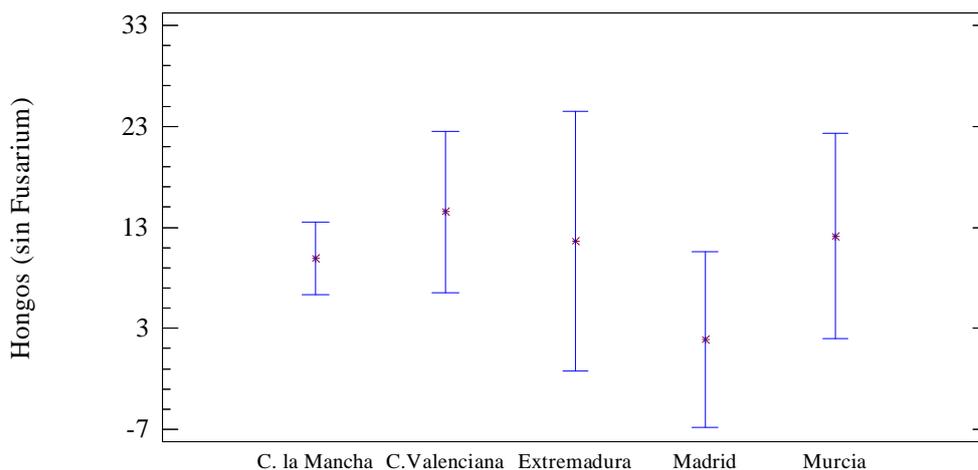
Se realizó el análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas con respecto a las comunidades autónomas y el grado de incidencia de especies del género *Fusarium*. Para ello, se emplearon los datos correspondientes al número de aislados de *Fusarium* spp., y el número de aislados pertenecientes a otros géneros, obtenidos en cada comunidad autónoma en medio PDA-Cl.

Los resultados muestran diferencias significativas para los valores medios de *Fusarium* spp., entre Madrid y Murcia; entre el resto de comunidades no existen diferencias significativas. En la Fig. 12, se presentan los intervalos LSD en el único caso donde no hay solapamiento (entre las comunidades de Madrid y Murcia).

Para los aislados no pertenecientes al género *Fusarium*, no existen diferencias significativas entre ninguna de las Comunidades Autónomas estudiadas, tal y como se aprecia en la Fig. 13, que representa los intervalos LSD, produciéndose solapamiento en todos los casos.



**Figura 12. Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de *Fusarium* spp., para las Comunidades Autónomas**



**Figura 13. Intervalos LDS para la comparación de los valores medios de hongos distintos a *Fusarium* spp., para las Comunidades Autónomas**

### 1.3. Maíz experimental

El recuento y aislamiento a partir de estas muestras se realizó en los medios de cultivo PDA-CL y AVM, especificando el número de hongos que crecieron en cada grano y los géneros que aparecían en cada placa. Estos datos han servido como base para evaluar el grado de contaminación del maíz, calculando los porcentajes de crecimiento de cada hongo (Anejo 2).

En los muestreos realizados en las variedades de maíz Panamá, Cridor y Net, se encuentra una microbiota compuesta principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, y otros géneros que han aparecido de forma puntual, como *Acremonium*, *Alternaria*, y hongos del orden mucorales. En las Tablas 15, 16, 17 se recogen el porcentaje de hongos crecidos en los granos de maíz de las variedades Panamá, Cridor y Net, en el medio PDA-CI.

En promedio, la contaminación de los granos del maíz experimental fue de un 93%: en la variedad Panamá, con una contaminación del 100% de los granos, los géneros que predominan son *Aspergillus* con 38.58%, *Fusarium* 31.3% y *Penicillium* 18.9%; para la variedad Cridor, el porcentaje de granos contaminados es del 90% y sobresale el género *Fusarium* con un 40.5%, *Penicillium* con un 26.6% y *Aspergillus* con 24.59%; para la variedad Net el género *Fusarium*, representa un 47.7% del total de hongos encontrados, el género *Penicillium* un 31.2% y *Aspergillus* un 18.42%, con un total de granos contaminados del 88%.

De un total de 860 placas se obtuvieron 222 aislados pertenecientes al género *Fusarium*, de los cuales 83 provienen de la variedad Panamá, 78 de la variedad Cridor y 61 de la variedad Net. A cada una de ellas se le realizó la comprobación macroscópica y microscópicamente.

### **1.3.1. Comparación de *Fusarium* spp., respecto a la microbiota fúngica total, según la variedad de maíz**

Los datos obtenidos del recuento total de *Fusarium* spp., por variedades se han analizado mediante cálculos estadísticos. Los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre medias de cada variedad, para un nivel de confianza del 95%, y que los niveles de *Fusarium* spp., de cada variedad de maíz son similares (Tabla 18, Fig. 14).

Tabla 15. Porcentajes de géneros que han crecido en la variedad Panamá

Variedad Panamá					
Muestreo	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Sin identificar
1	36.40	0.80	16.40	46.40	-
2	9.76	-	65.85	3.66	20.73
3	31.90	-	52.76	2.45	12.88
4	36.87	-	44.95	9.09	9.09
5	26.32	-	52.64	3.16	17.89
6	21.47	-	66.87	11.66	-
7	28.22	-	46.47	12.86	12.45
8	40.31	-	25.20	26.74	7.75
9	39.72	-	51.06	9.22	-
10	8.84	-	25.12	40.93	25.12
11	33.33	-	34.59	12.50	19.58
12	34.07	-	32.29	11.06	22.57
13	47.91	-	24.19	27.91	-
14	34.82	-	31.98	26.72	6.48
<b>% Total</b>	<b>31.26</b>	<b>0.07</b>	<b>38.58</b>	<b>18.93</b>	<b>11.16</b>

Tabla 16. Porcentajes de géneros que han crecido en la variedad Cridor

Variedad Cridor					
Muestreo	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Sin identificar
1	16.67	8.33	41.67	33.33	-
2	6.49	-	87.01	6.49	-
3	31.93	-	60.5	2.52	5.04
4	82.95	-	17.05	-	-
5	71.62	-	25	3.38	-
6	71.95	-	26.83	1.22	-
7	31.75	-	33.33	23.81	11.11
8	50.91	-	13.94	20.00	15.15
9	36.82	-	7.1	37.16	18.92
10	47.53	-	31.48	-	20.99
11	30.74	-	19.63	32.59	17.03
12	31.17	-	20.46	47.73	0.65
13	33.83	-	25.56	40.60	-
14	45.87	-	13.76	32.11	8.26
15	25.11	-	28.09	37.87	8.94
16	59.44	-	18.88	21.68	-
<b>% Total</b>	<b>40.53</b>	<b>0.04</b>	<b>24.59</b>	<b>26.60</b>	<b>7.16</b>

Tabla 17. Porcentajes de géneros que han crecido en la variedad Net

Variedad Net					
Muestreo	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Sin identificar
1	56.25	-	41.67	-	-
2	27.78	-	87.01	14.44	-
3	71.56	-	60.5	3.67	2.75
4	67.77	-	17.05	22.31	-
5	65.85	-	25	12.20	-
6	64.32	-	26.83	29.19	-
7	24.06	-	33.33	53.38	3.76
8	25.23	-	13.94	57.34	2.29
9	58.86	-	7.1	22.29	-
10	69.43	-	31.48	1.91	21.02
11	59.24	-	19.63	28.26	-
12	36.93	-	20.46	58.89	-
13	38.27	-	13.76	8.02	3.09
<b>% Total</b>	<b>47.65</b>	<b>-</b>	<b>18.42</b>	<b>31.24</b>	<b>1.10</b>



Fotografía 3.1. *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Fusarium spp.*, en PDA, placa C.1.P.16-1



Fotografía 3.2 *Fusarium spp.*, en AVM, placa C.1.V.16-4



Fotografía 3.3. *Aspergillus sp.*, en PDA, placa C.1.P.1-2



Fotografía 3.4. *Aspergillus sp.*, en AVM, placa C.1.V.2-4



Fotografía 3.5. *Penicillium spp.*, en medio PDA

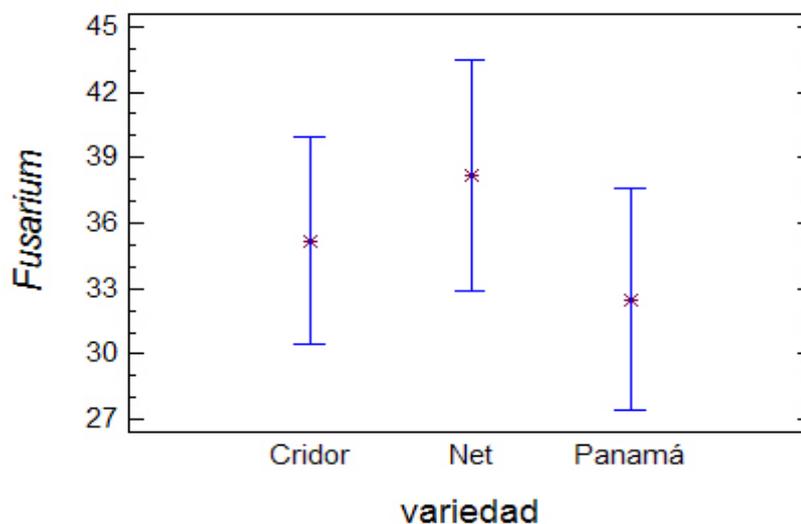


Fotografía 3.6. *Rhizopus sp.*

Fotografía 3. Micobiota fúngica de maíz experimental

Tabla 18. Recuento total de hongos del género *Fusarium* y otros hongos, según variedad

Variedad	<i>Fusarium</i>	Otros
PANAMÁ	910	2001
CRIDOR	1126	1652
NET	993	1091
Total	3029	4744

Figura 14. Gráfico de medias de *Fusarium* spp., según la variedad de maíz

Para el resto de hongos que no pertenecen al género *Fusarium* sí se encuentran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las medias de las variedades para un nivel de confianza del 95%: la variedad Panamá sobresale por encima de las otras dos variedades, y las medias de las variedades Cridor y Net son más próximas, como se aprecia en la Fig. 15.

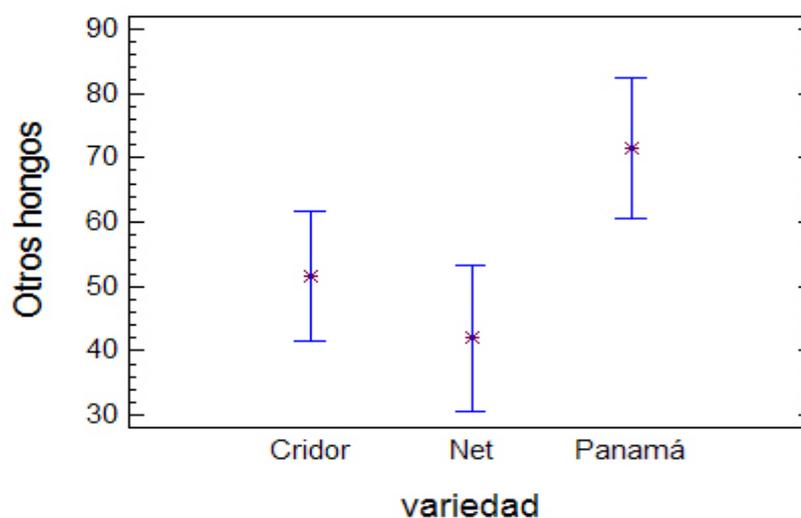


Figura 15. Gráfico de medias de otros hongos según la variedad de maíz

**1.3.2. Comparación de *Fusarium* spp., respecto a la microbiota fúngica total, según los medios de cultivo**

Cuando se analizan mediante cálculos estadísticos, el número de aislados obtenidos según el medio de cultivo (Anejo 2) indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios (para un nivel de confianza del 95%) obtenidos para los diferentes medios de cultivo (Fig. 16 y 17).

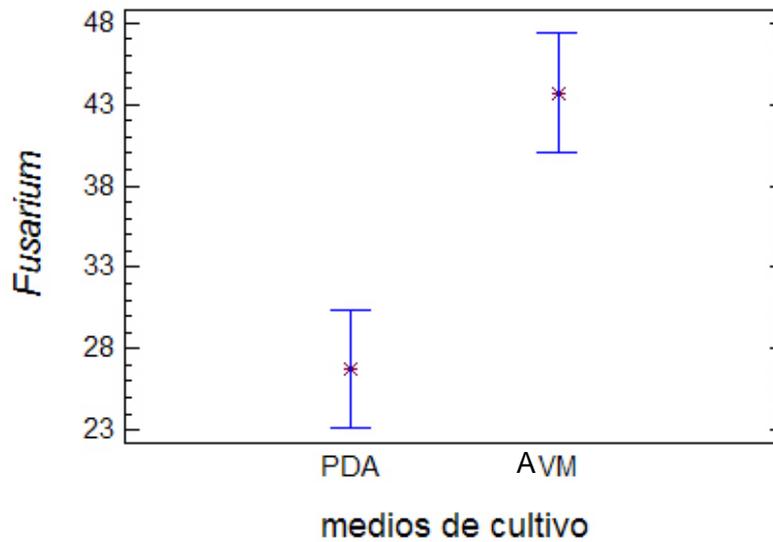


Figura 16. Gráfico de medias de *Fusarium* spp., según medios de cultivo

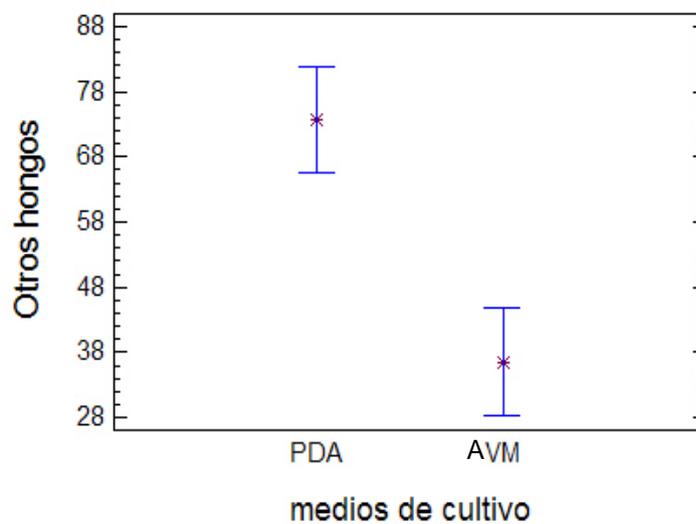


Figura 17. Gráfico de medias de otros hongos según medios de cultivo

## 2. AISLADOS DE HONGOS DEL GÉNERO *Fusarium* DE GRANOS DE MAÍZ

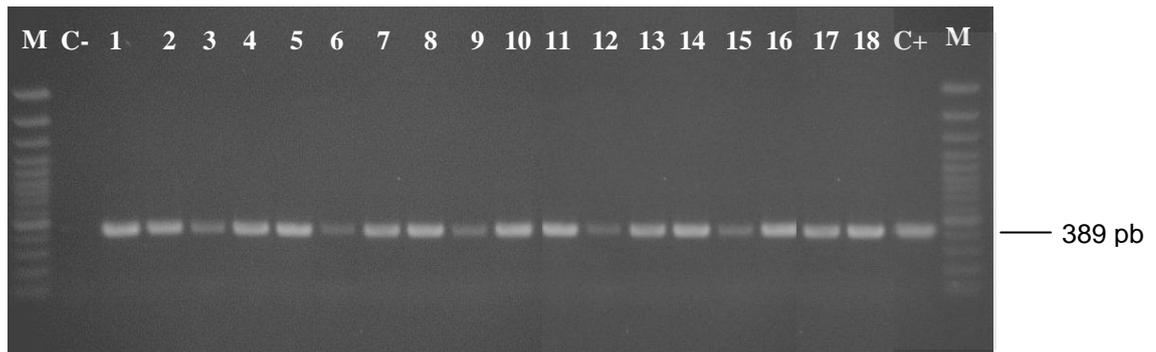
Una vez identificadas morfológicamente los aislados pertenecientes al género *Fusarium*, en cada una de las muestras utilizadas en este estudio, se procedió a la selección de las mismas: de maíz almacén, 150 de 342 aislados; de maíz campo, 127 de 634 aislados y de maíz experimental se seleccionaron 100 (38 de la variedad Panamá, 28 de Cridor y 34 de Net) de 222. Los criterios de selección de los aislados fueron de carácter morfológico. Los 377 aislados seleccionados se sembraron como cultivo monospórico, y una vez crecidos se utilizaron en los diferentes análisis.

## 3. IDENTIFICACIÓN POR PCR

Para la detección e identificación rápida y específica de aislados toxigénicos del género *Fusarium* se han desarrollado metodologías basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, entre las que destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez. Mediante esta técnica se ha llevado a cabo la identificación a nivel de género y especie de los aislados de *Fusarium* spp., así como la identificación de aislados productores de tricotecenos (Desjardins, 2006).

### 3.1. Identificación del género *Fusarium*

La identificación molecular a nivel de género se efectuó mediante el empleo de los iniciadores ITS-Fu-f y ITS-Fu-r (Abd-Elsalam *et al.*, 2003), que detectan y amplifican un fragmento de 389 pb de la región ITS del gen ribosomal ARN 28S (ADNr) específico para las especies del género *Fusarium*. Para comprobar la efectividad de este tipo de PCR se probaron todas las cepas de referencia empleadas en este trabajo de investigación, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (Tabla 6), obteniéndose en todas ellas la amplificación del fragmento esperado. También se analizaron 5 aislados pertenecientes a los géneros fúngicos *Acremonium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, que fueron todas negativas. Las 377 aislados analizados en este trabajo fueron positivos para este ensayo. En la fotografía 4 puede observarse el producto de amplificación obtenido.



Fotografía 4. Identificación de *Fusarium* spp., mediante PCR. M: marcador; C-: control negativo *Acremonium* sp ; 1: F3-P-5-1 , 2: F3-P-5-1, 3: P.1.P.1-2, 4:F8-V-3-1, 5: P 10.4.3, 6: P 10.4.3, 7: P.2.V.2-4, 8: P 4.9.2, 9: P 2.5.1, 10: N.2.P.1-1, 11: F30-P-5-1, 12: P.2.V.2-5, 13: V 10.3.7,14: P 8.6.4, 15: V 2.3.1,16:F35-V-3-2,17:F11-P-1-5,18: P.1.P.1-5: aislados, C+: control positivo, CECT 2715 (*F. oxysporum*)

### 3.2. Identificación a nivel de especie

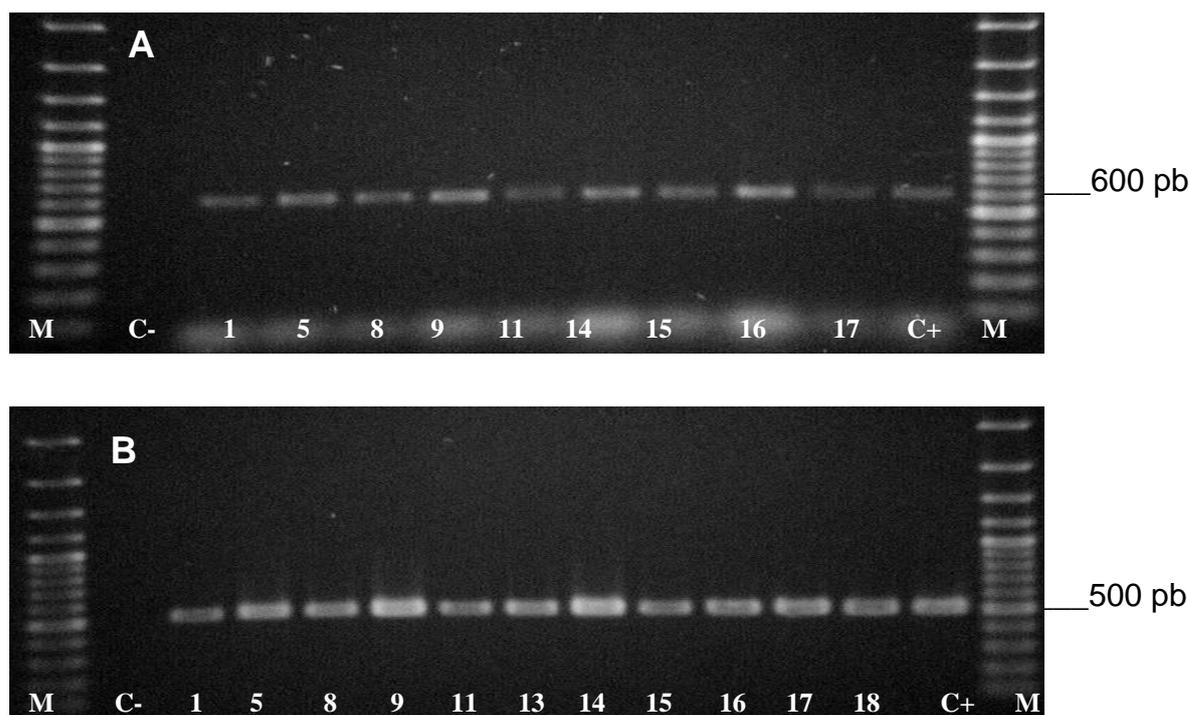
Con el fin de identificar a qué especies corresponden los aislados de *Fusarium* spp., se probaron diversos tipos de PCR para la identificación de especie, que fueron puestas a punto en nuestro laboratorio mediante el empleo de cepas de referencia de cada especie.

Para facilitar el trabajo se agruparon los aislados de *Fusarium* spp., en función a su origen (maíz almacén, maíz campo y maíz experimental), y cepas de referencia.

#### 3.2.1. PCR para *F. graminearum*

Para su identificación se han seguido varios protocolos y utilizado diferentes iniciadores como el 217Fg /170Fg, utilizado por Hye-Seon *et al*, (2003) con la que se obtiene una banda de 600 pb del gen *Tri 5* y Fgr-F/ Fgc-R utilizada por Jurado *et al*. (2005) que amplifica una banda de 500 pb de la región IGS (fotografía 5).

Después de utilizar estos iniciadores, el total de aislados identificados como *F. graminearum* fueron 14 de maíz almacén y 5 de maíz campo. En maíz experimental no se detectó esta especie en particular.



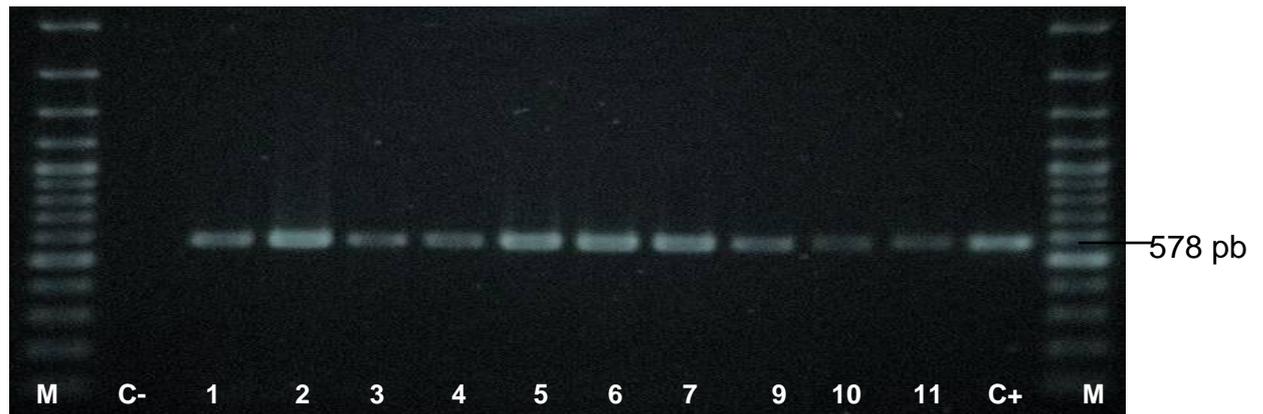
Fotografía 5. Amplificación de los aislados de *F. graminearum* con los iniciadores 217Fg/170Fg (A) y Fgr-F/Fgc-R (B), C- = *Acremonium*, 1, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18: aislados, C+: 2150 CECT, M: marcador

### 3.2.2. PCR para *F. verticillioides*

La identificación de la especie *F. verticillioides* se llevó a cabo mediante el empleo de los iniciadores VER1 y VER2 (Mulé *et al.*, 2004b), que detectan y amplifican un fragmento específico para dicha especie de 578 pb localizado en el gen *calmodulin* (fotografía 6).

Esta PCR se realizó en las 377 aislados, identificándose como *F. verticillioides* un total de 167 aislados: 81 aislados en maíz almacén, 16 aislados en maíz campo y 70 aislados en maíz experimental.

Estos resultados confirmaban la identificación macroscópica, ya que los aislados crecidos en medio PDA, poseían características similares a la cepa de referencia *F. verticillioides* CECT 2982, que de acuerdo con la clave taxonómica (Samson *et al.*, 2004), presentan un reverso rosa pálido-violeta claro.



Fotografía 6. Identificación de *F. verticillioides* mediante PCR. C-: Control -, 1: F23-V-1-1, 2: V.4.9.3, 3: C.2.P.3.2, 4: P.2.6.4, 5: C.2.V.3-1, 6: N.2.V.4-5, 7:P4.6.1: cepas, C+: *F. verticillioides* CECT 2982, M: marcador

### 3.2.3. PCR para *F. culmorum*

La identificación de la especie *F. culmorum* se llevó a cabo mediante el empleo de los iniciadores Fcu-F y Fgc-R (Jurado *et al.*, 2005), que amplifican un fragmento específico para dicha especie de 200 pb de la región IGS del ADNr localizado en los genes 28S y 18S.

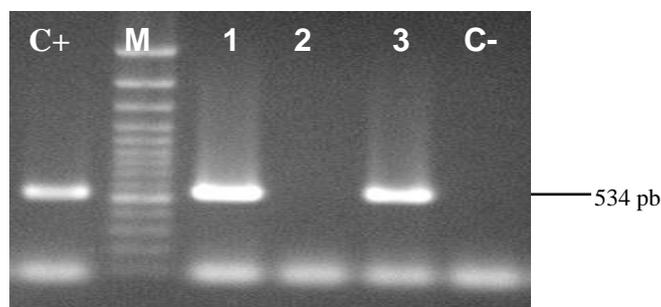
Este tipo de PCR se aplicó a 7 aislados que presentaban características macroscópicas similares a la cepa de referencia *F. culmorum* CECT 2148 crecida en medio PDA, que de acuerdo con la clave taxonómica muestra un reverso rojo-amarillo. Ninguno de estos aislados dio positivo.

### 3.2.4. PCR para *F. oxysporum*

Para la identificación de la especie *F. oxysporum* se emplearon los iniciadores Clox1 y Clox2 (Mulé *et al.*, 2004a), que reconoce y amplifica un fragmento específico para dicha especie de 534 pb localizado en la secuencia del gen *calmodulin* (fotografía 7).

Este tipo de PCR se aplicó a los 377 aislados seleccionados, identificándose un total de 9 aislados; 7 de ellos provenientes del maíz experimental y 2 de maíz almacén. En maíz campo no se detecto esta especie. Los aislados identificados

presentaban un aspecto macroscópico similar a la cepa de referencia *F. oxysporum* CECT 2715.



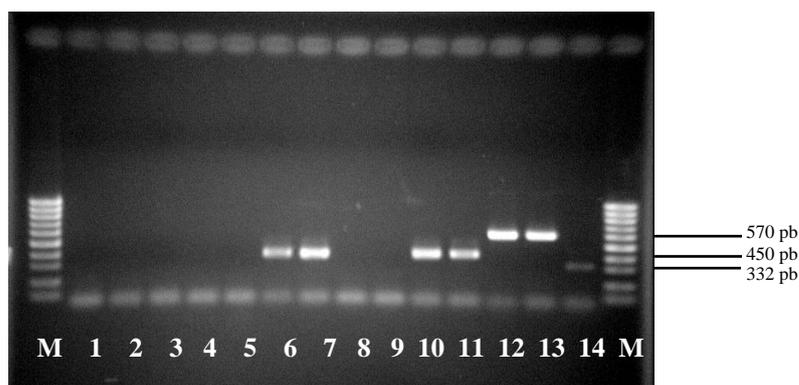
Fotografía 7. Identificación de *F. oxysporum* mediante PCR. C+: *F. oxysporum* CECT 2715, aislados: 1: N.2.V.1-5, 2: V 1.8.4, 3:P.1.P.1-5, C- *Penicillium* sp., M: marcador

### 3.2.5. PCR múltiple

Con el fin de identificar a qué especies corresponden los 377 aislados de *Fusarium* spp., obtenidos, también se realizó una PCR múltiple siguiendo el protocolo descrito por Demeke *et al.* (2005), que detecta de forma simultánea las especies *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. sporotrichioides*, especies importantes del género *Fusarium* productoras de micotoxinas: las dos primeras producen con mayor frecuencia los tricotecenos tipo B y *F. sporotrichioides*, los tricotecenos de tipo A (Mateo *et al.*, 2002). Para ello, se emplearon tres pares de iniciadores en la misma reacción de PCR, Fg16F/Fg16R, para *F. graminearum*; FC01F/FC01R, para *F. culmorum* y AF330109CF/AF330109CR, para *F. sporotrichioides*, de los cuales se obtienen bandas de 570, 450, 332 pb respectivamente (fotografía 8).

Con estos iniciadores se identificaron 19 aislados de *F. graminearum*, que corresponden a las mismas identificadas con los iniciadores 217Fg /170Fg, y Fgr-F/ Fgc-R.

Mediante esta técnica, no se detectaron las especies *F. culmorum* ni *F. sporotrichioides*.

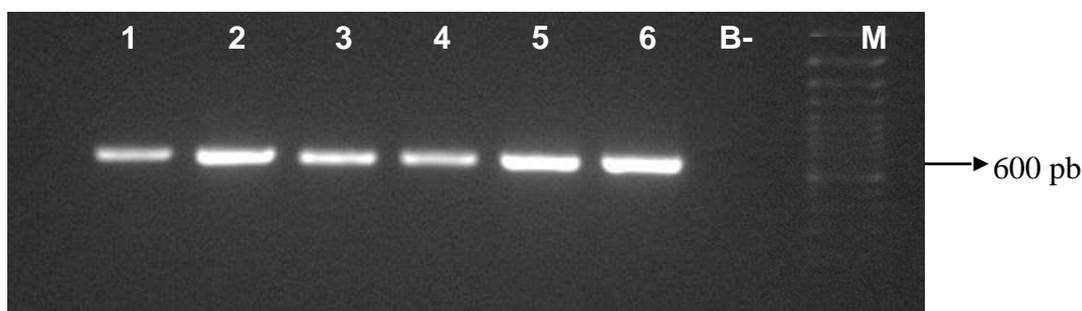


Fotografía 8. Identificación de *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. sporotrichioides* mediante PCR múltiple. aislados: 1: F48-P-5-2, 2: F6-P-4-1, 3: P4.6.1, 4: F29-P-3-2, 5:F24-V-2-1, 8: P.8.3.1, 9: N.1.P.5-5, 14: N.2.V.1-5. Cepas de referencia: 6, 7 *F. graminearum*, 10, 11 *F. culmorum*, 12, 13, *F. sporotrichioides*

#### 4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS POR SECUENCIACIÓN

Tras la identificación de los aislados de *Fusarium spp.*, con iniciadores específicos para cada especie, se procedió a confirmar la utilidad de la técnica PCR para la identificación de las especies de este género mediante secuenciación genómica. Se secuenciaron 14 aislados pertenecientes a *F. graminearum*, 29 a *F. verticillioides* y 14 aislados que no amplificaron con los iniciadores que se utilizaron en este estudio.

Se secuenciaron los nucleótidos de la región transcritora interna (ITS), que fue amplificada por PCR utilizando los iniciadores universales ITS1 y ITS4 (White *et al.*, 1990) (apartado 3.12. de material y métodos). El producto fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvo un fragmento de  $\approx 570$  pb de cada aislado, como se puede apreciar en la fotografía 9.



Fotografía 9. Productos de amplificación de la región ITS de los aislados de *Fusarium spp.*, 1: P.9.1.3 V.2.1.1, 2: P.1.P.4-3, 3: F3-P-5-1, 4: P.9.1.3, 5: P 2.9.3 (2), 6: V 5.5.5 (2)

Las secuencias completas se ensamblaron manualmente con ayuda de los programas informáticos CHROMAS y PHYDIT. Una vez obtenidas las secuencias completas de cada uno de los aislados (Anejo 3), se determinó la identidad a nivel de especie de cada uno de ellos mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) obtenida a través del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, 2008).

Los resultados de la identificación por secuenciación se muestran en las Tablas 19 y 20. Como se observa en la Tabla 19, una de los 14 aislados identificados por PCR como *F. graminearum* resultó ser identificada por secuenciación como *F. equiseti*. (F30P51). Se confirmó por esta técnica que los aislados F51-V-3-2(A), V5.5.5(2), V2.3.5(1), V2.3.5(2), P5.4.1, V5.5.5(1), P 5.1.1, pertenecían a la especie *G. zaeae*, que es el teleomorfo de *F. graminearum*. Para los aislados V5.1.1(2), V5.1.1(1), P2.9.4, P2.9.3(2), P5.5.1, P2.9.3(1), utilizando la misma zona de secuenciación, se obtuvo mediante BLAST el 100 % de homología con dos especies del complejo Fg, *G. zaeae* y *F. asiaticum*.

El aislado F30P51 corresponde a la especie de *F. equiseti*, la cual pertenece a la sección Gibbosum. Esta es un aislado atípico, ya que se obtuvo amplificación de su ADN con diferentes iniciadores específicos de especie, incluyendo los de *F. graminearum*.

Con las secuencias de nucleótidos de *F. graminearum* se construyó un árbol filogenético (Fig. 18) cuya raíz es *G. zaeae* (*F. graminearum*) del Genbank accesión Nº. AY188924. En este gráfico, se agrupan todos los aislados de *F. graminearum* linaje 7 en un cluster y en un segundo agrupamiento se encuentran los aislados que pueden corresponder a la especie *F. asiaticum*, que se encuentra dentro del “complejo *Fusarium graminearum*” como linaje 6. Tanto en el grupo uno como el dos existe una elevada heterogeneidad intra-especie.

En la Tabla 20 se registran los nombres de los 29 aislados de *F. verticillioides* identificadas por secuenciación como *G. moniliformis* (*F. verticillioides*).

## Resultados

**Tabla 19. Identificación a nivel de especie mediante el análisis de secuencia de la región ITS de los aislados de *F. graminearum*.**

No. de aislado	Especie	% de homología (BLAST)	No. de acceso Genbank
*V 5.1.1 (2)	<i>G. zeae/F. asiaticum</i>	100	AB289553.1 /AB289552.1
*V 5.1.1 (1)	<i>G. zeae/F. asiaticum</i>	100	DQ459831.1 /DQ459836.1
*P 5.5.1	<i>G. zeae/F. asiaticum</i>	100	DQ459831.1/DQ459836.1
*P 2.9.3 (1)	<i>G. zeae/F. asiaticum</i>	100	AB289553.1 / AB289552.1
*P 2.9.4	<i>G. zeae/F. asiaticum</i>	100	AB289553.1 /AB289552.1
*P 2.9.3 (2)	<i>G. zeae/F. asiaticum</i>	100	AB289553.1 /AB289552.1
V 5.5.5 (2)	<i>G. zeae</i>	100	EF464165.1
V 2.3.5 (1)	<i>G. zeae</i>	100	AY188924.1
V 2.3.5 (2)	<i>G. zeae</i>	100	AY188924.1
P 5.4.1	<i>G. zeae</i>	100	DQ453701.1
V 5.5.5 (1)	<i>G. zeae</i>	100	AB250414.1
P 5.1.1	<i>G. zeae</i>	99	AY188924.1
F51-V-3-2(A)	<i>G. zeae</i>	99	EF464165.1
F30P51	<i>F. equiseti</i>	100	AY147367.1

De los 14 aislados que no amplificaron con los iniciadores utilizados, se confirmó por secuenciación que 10 de ellas pertenecían a la especie *F. proliferatum* de la sección *Liseola*, que forma parte también del complejo *fujikuroi*, y los cuatro aislados restantes pertenecían a la especie *F. equiseti* de la sección *Gibbosum* (Tabla 21).

En la Fig. 19 se muestra el árbol generado por los aislados identificados por secuenciación, como *F. proliferatum*, *F. equiseti* y *G. moniliformis* (*F. verticillioides*), donde se ve que el grupo perteneciente a *F. proliferatum* presenta un bajo grado de variabilidad intra-especie. Lo mismo sucede con lo encontrado con los aislados de *F. equiseti*, mientras que los aislados de *G. moniliformis* quedan agrupadas a un 100% de homología (Tabla 20).

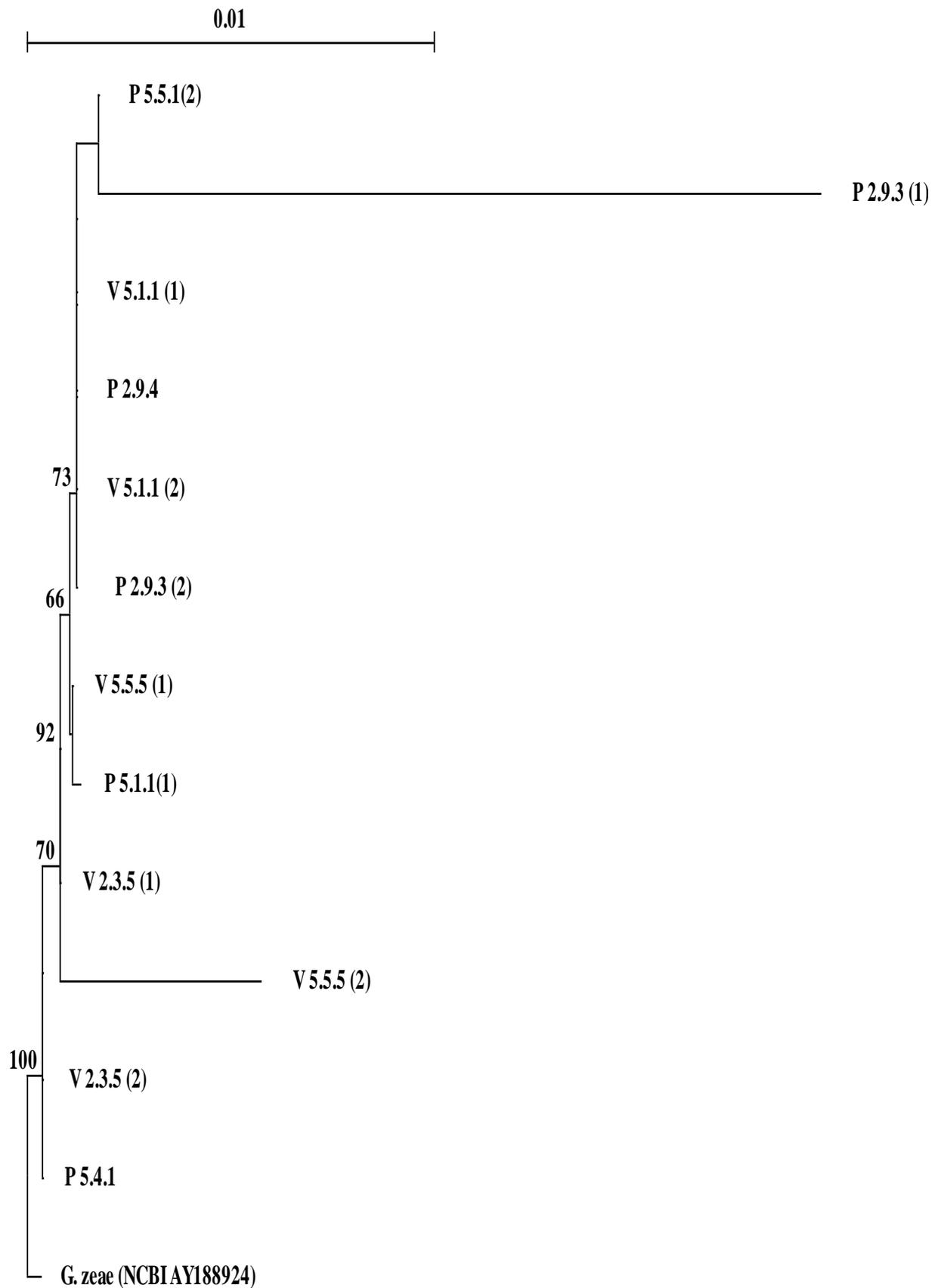


Figura 18. Árbol filogenético relacionando las secuencias ITS de los diferentes aislados de *F. graminearum*, mediante el programa Treecom versión 1.3b., se indica valores de “bootstrap”  $\geq 65\%$

Resultados

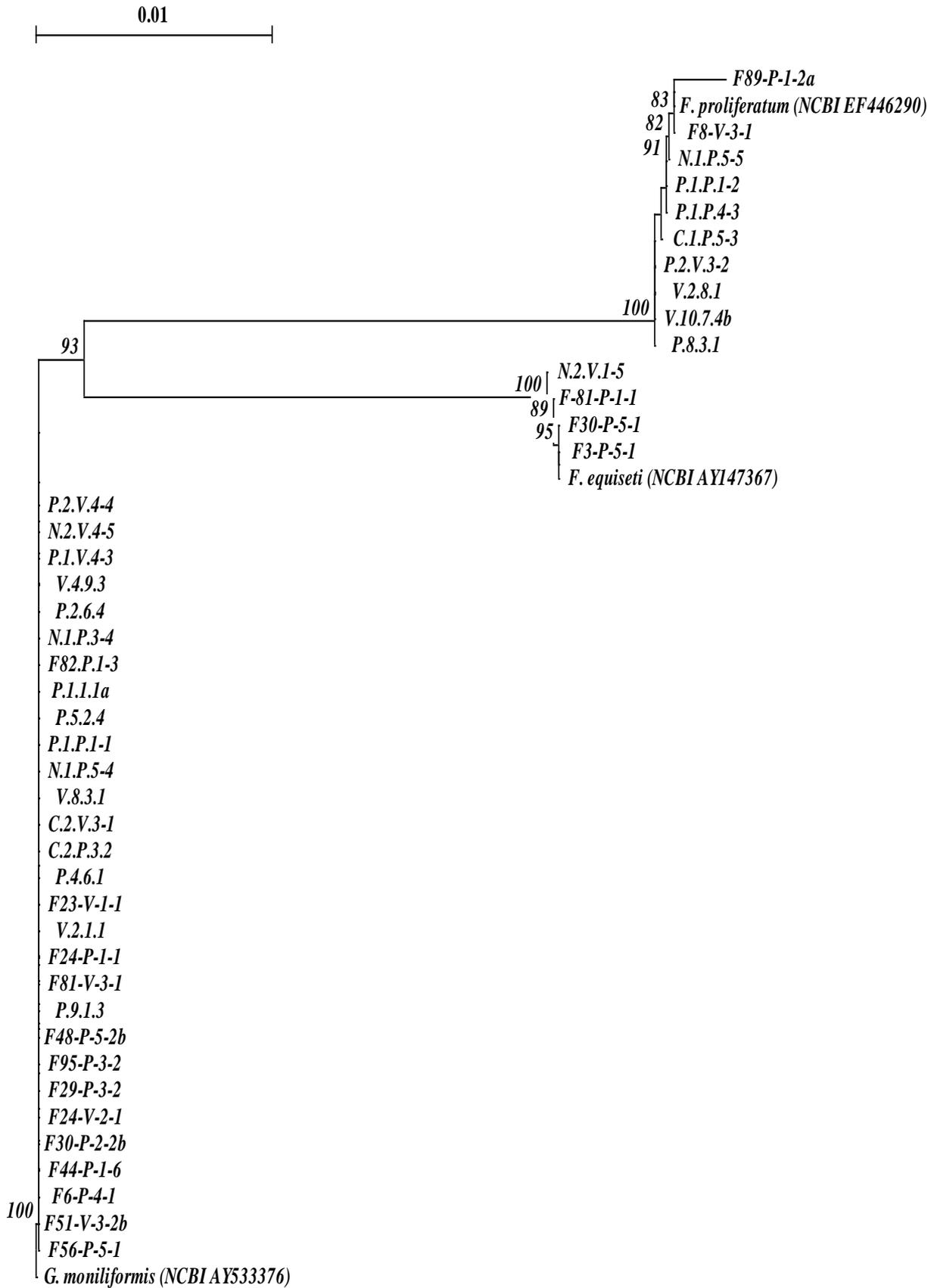


Figura 19. Árbol filogenético relacionando las secuencias ITS de los aislados de *G. moniliformis* (*F. verticilliooides*), *F. equiseti* y *F. proliferatum*, mediante el programa Treecom versión 1.3b, se indica valores de “bootstrap”  $\geq 70\%$

**Tabla 20. Identificación a nivel de especie mediante el análisis de secuencia de la región ITS de los aislados de *F. verticillioides* identificados por PCR**

No. de aislado	Especie	% de Homología (BLAST)	No. de acceso Genbank
F48-P-5-2-b	<i>G. moniliformis</i>	99	AY533376.1
N.2.V.4-5	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
F6-P-4-1	<i>G. moniliformis</i>	99	AY898260.1
C.2.V.3-1	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
F56-P-5-1	<i>G. moniliformis</i>	99	AY898260.1
P.2.V.4-4	<i>G. moniliformis</i>	99	EU151483.1
F24-P-1-1	<i>G. moniliformis</i>	99	EU314989.1
F29-P-3-2	<i>G. moniliformis</i>	100	EU314989.1
F30-P-2-2-b	<i>G. moniliformis</i>	100	EF556217.1
P4.6.1	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
P.9.1.3	<i>G. moniliformis</i>	99	EU151483.1
V.2.1.1	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
F44-P-1-6	<i>G. moniliformis</i>	99	AY898260.1
F81-V-3-1	<i>G. moniliformis</i>	100	AY533376.1
F24-V-2-1	<i>G. moniliformis</i>	100	EU314989.1
C.2.P.3.2	<i>G. moniliformis</i>	99	EU151483.1
P.2.6.4	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
F82-P-1-3	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
V.8.3.1	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
P.5.2.4	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
N.1.P.5-4	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
N.1.P.3-4	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
P.1.P.1-1	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
P.1.V-4-3	<i>G. moniliformis</i>	100	AY533376.1
F95-P-3-2	<i>G. moniliformis</i>	100	AY533376.1
V.4.9.3	<i>G. moniliformis</i>	100	EU151483.1
F51-V-3-2b	<i>G. moniliformis</i>	100	EF556217.1
P.1.1.1.a	<i>G. moniliformis</i>	99	EU151483.1
F23-V-1-1	<i>G. moniliformis</i>	99	EU314989.1

**Tabla 21. Identificación a nivel de especie mediante el análisis de secuencia de la región ITS de los 14 aislados de *Fusarium* spp., no identificadas por PCR**

No. de aislado	Especie	% de Homología (BLAST)	No. de acceso Genbank
F89-P-1-2-a	<i>F. proliferatum</i>	99	EF589878.1
F8-V-3-1	<i>F. proliferatum</i>	100	EF446290.1
V.10.7.4b	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
C.1.P.5-3	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
V.2.8.1	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
P.1.P.1-2	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
P.8.3.1	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
P.1.P.4-3	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
N.1.P.5-5	<i>F. proliferatum</i>	99	EU151490.1
P.2.V.3-2	<i>F. proliferatum</i>	100	EU151490.1
N.2.V.1-5	<i>F. equiseti</i>	99	EU326202.1
F30-P-5-1	<i>F. equiseti</i>	100	AY147367.1
F3-P-5-1	<i>F. equiseti</i>	100	DQ026008.1
F81-P-1-1	<i>F. equiseti</i>	99	EU326202.1

## 5. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD EN LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN AMPLIFICADOS POR PCR (PCR-RFLP) DE AISLADOS DE *Fusarium* spp., DE GRANOS DE MAÍZ

Se amplificó la región IGS utilizando los iniciadores CNL12 y CNS1 de 96 aislados de *Fusarium* spp., obtenidas de las diferentes muestras de maíz, siendo el producto de la PCR de aproximadamente 2.7 kb. Posteriormente, y por separado, se hizo la digestión de los aislados utilizando los enzimas de restricción *MboI*, *XhoI*, *EcoRI*, *HinGI*, *HhaI*, *AluI*, *BsuRI*, *Hind III*, *HaeIII*; según la endonucleasa y el aislado, puede tener uno o más cortes en la región IGS, excepto las enzimas *XhoI*, *Hind III* y *HaeIII*, que no cortaban en esta región para los aislados analizados en este trabajo (*F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*) (fotografía 10A y 10B).

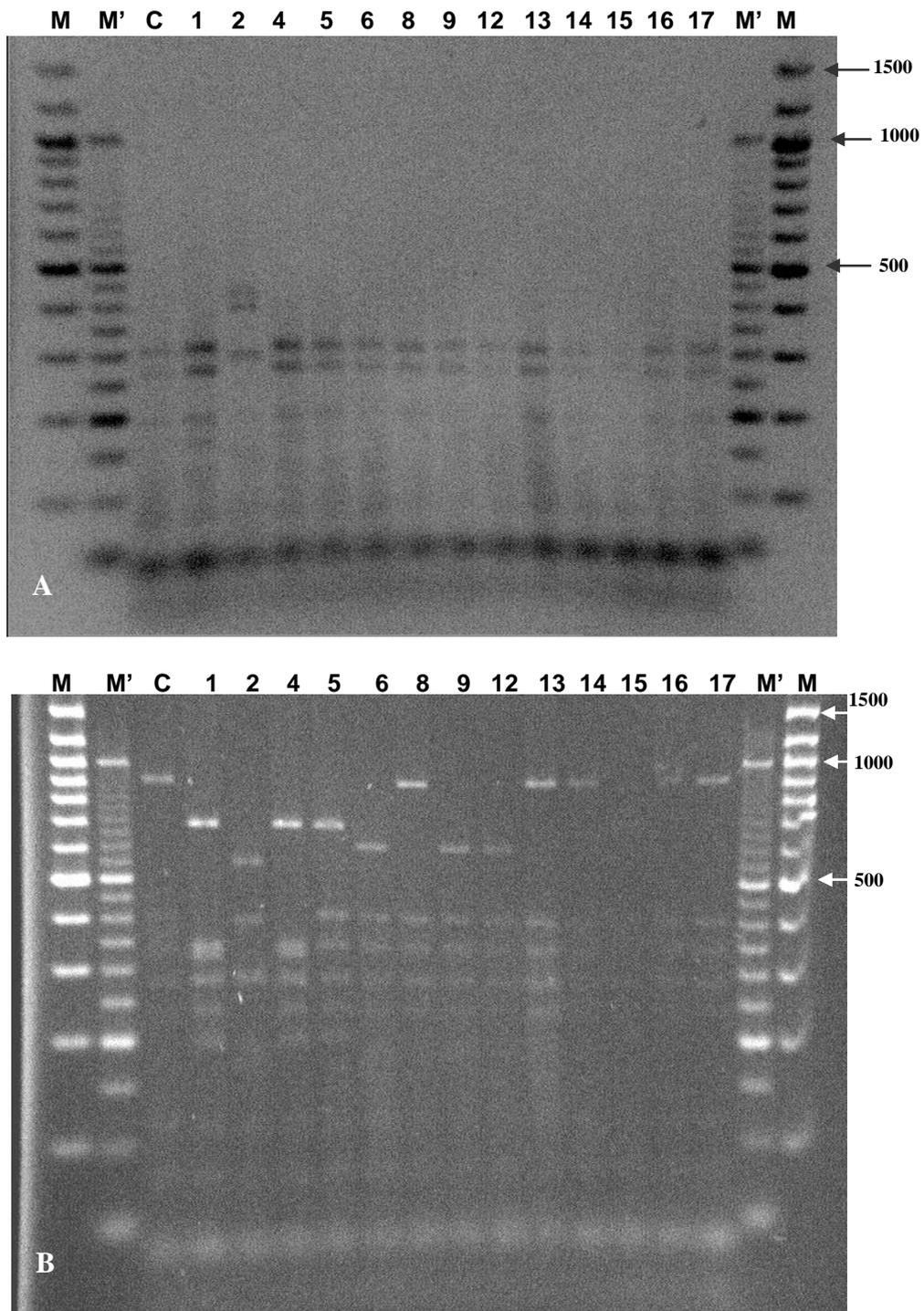
Los datos de ausencia o presencia de cada una de las bandas resultantes de la digestión del IGS de cada uno de los aislados, fueron analizadas numéricamente mediante una matriz de similaridad basada en el coeficiente de Dice y agrupados según el algoritmo UPGMA para dar lugar a un árbol taxonómico o dendrograma.

El análisis de los 96 aislados se realizó en tres grupos: 18 aislados que fueron identificados por iniciadores específicos y por secuenciación como *F. graminearum*; 41 que habían sido identificados por PCR como *F. verticillioides*, 7 de los cuales están identificados por secuenciación (aislados: C.2.V.3-1, C.2.P3.2, P.2.V4-4, N.1.P.5-4, V.8.3.1, P.9.1.3, V.4.9.3) y 37 aislados que no amplificaron para ninguno de los iniciadores utilizados, de los que cinco se identificaron por secuenciación como *F. proliferatum* (V.10.7.4b, V. 2.8.1, P.1.P.1-2, P.8.3.1, P.1.P.4-3) y dos como *F. equiseti* (N.2.V.1-5 y F81-P.1-1).

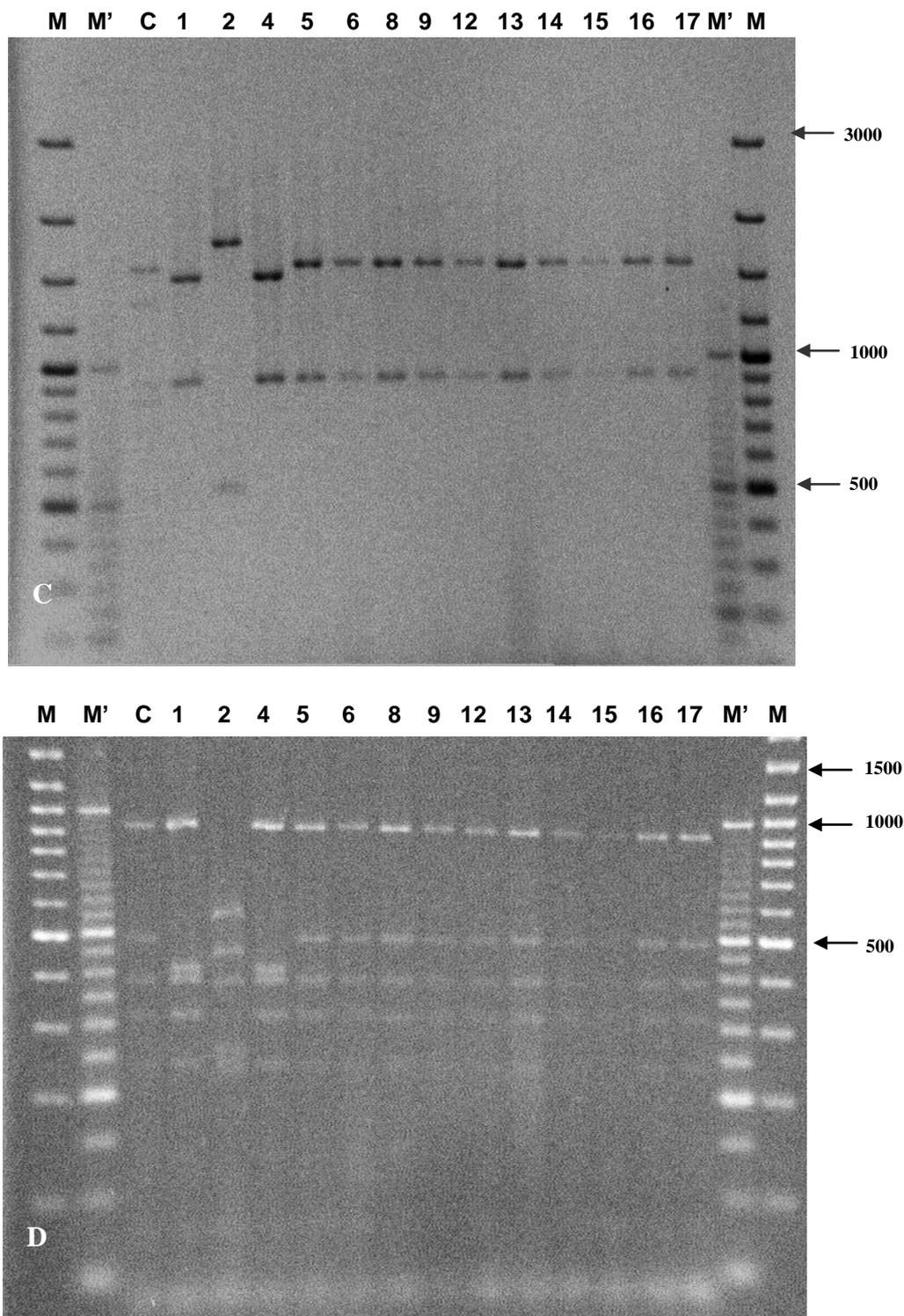
Posteriormente se realizó el análisis de los aislados agrupándolos dependiendo de donde fueron aisladas.

El dendrograma resultante del análisis numérico de los perfiles de los 18 aislados del complejo *F. graminearum* (Fig. 20) da como resultado dos grupos principales a un nivel de similitud del 82%: en el primer grupo quedan agrupadas junto con la cepa de referencia (*F. graminearum* CECT 2150) los aislados V5.5.5(2), V2.3.5(1), F66.V.3-2a, V2.3.5(2), P5.4.1 y F66.V.3.2b. En el mismo grupo, agrupadas entre ellos a un nivel de homología del 100%, se encuentran los aislados V5.5.5(1), P5.1.1, F51.V.3-2, F89-V-1-1a, F28.V.2.1. En el segundo grupo se concentran los aislados V5.1.1 (2), V5.1.1 (1), P2.9.4, P2.9.3 (2), P5.5.1 (2) y P2.9.3 (1) con un nivel de similitud del 87%. Tanto en el grupo uno como el dos existe una elevada heterogeneidad intra-especie.

Los aislados de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. equiseti* fueron analizadas de igual forma que los del complejo *F. graminearum*. Los perfiles genómicos obtenidos por RFLP revelan una importante variación intraespecífica en la región IGS. Igual que en caso anterior, los enzimas de restricción *BsuRI*, *ALuI*, *Mbol*, son las que presentan mayor información discriminativa de los aislados en análisis (fotografías 11A, 11B, 11C).



Fotografía 10A. Perfiles generados después de la digestión con las enzimas de restricción A: *Alu* I, B: *Hha* I, en la región IGS, en aislados de *F. graminearum* líneas 1-17 y C:2150 CECT, M': DNA marker (50 bp DNA ladder), M: DNA marker (100 bp DNA ladder)



Fotografía 10B. Perfiles generados después de la digestión con las enzimas de restricción C: *EcoRI*, D: *MboI*, en la región IGS, en aislados de *F. graminearum* líneas 1-17 y C:2150 CECT, M': DNA marker (50 bp DNA ladder), M: DNA marker (100 bp DNA ladder)

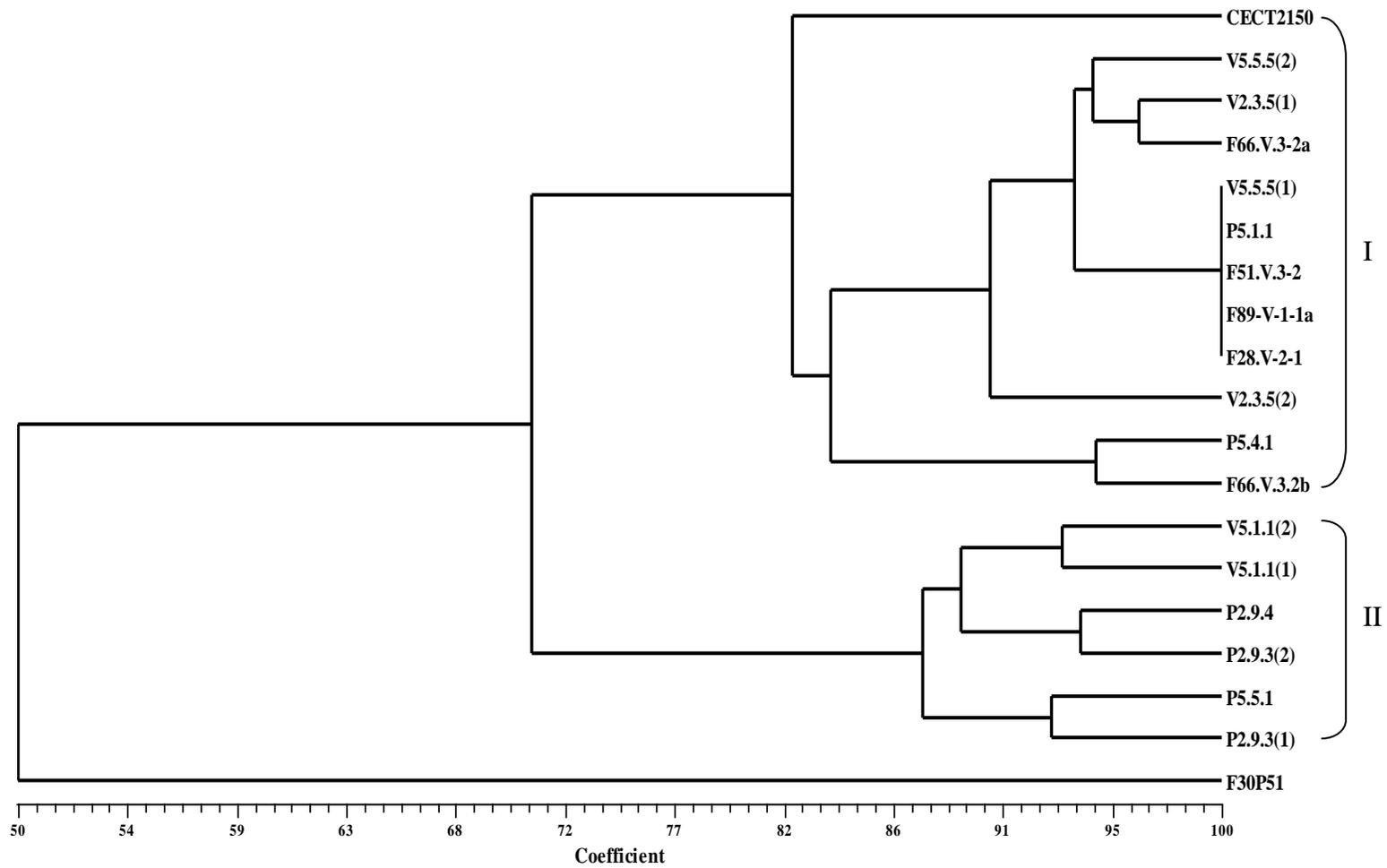
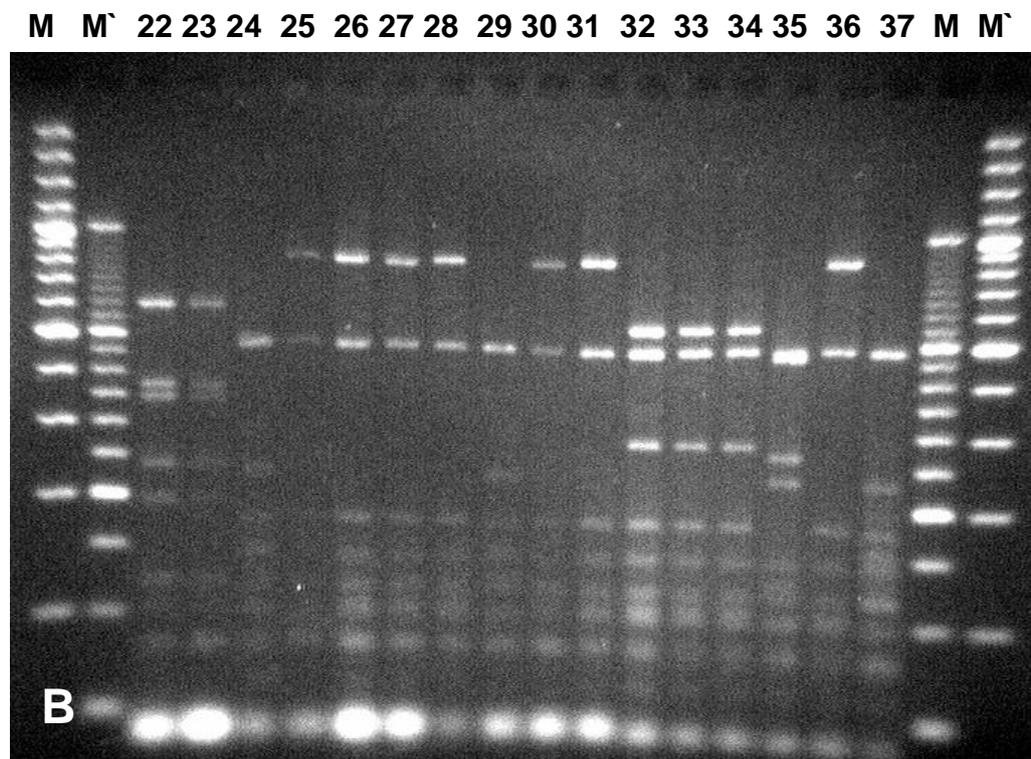
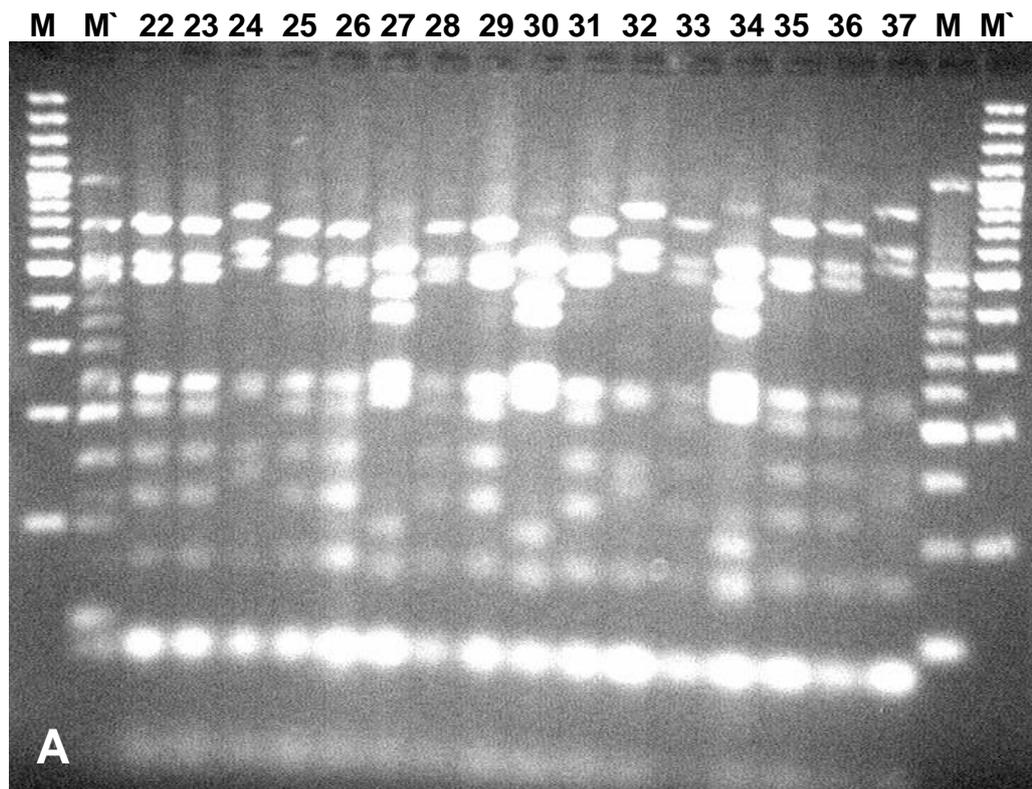
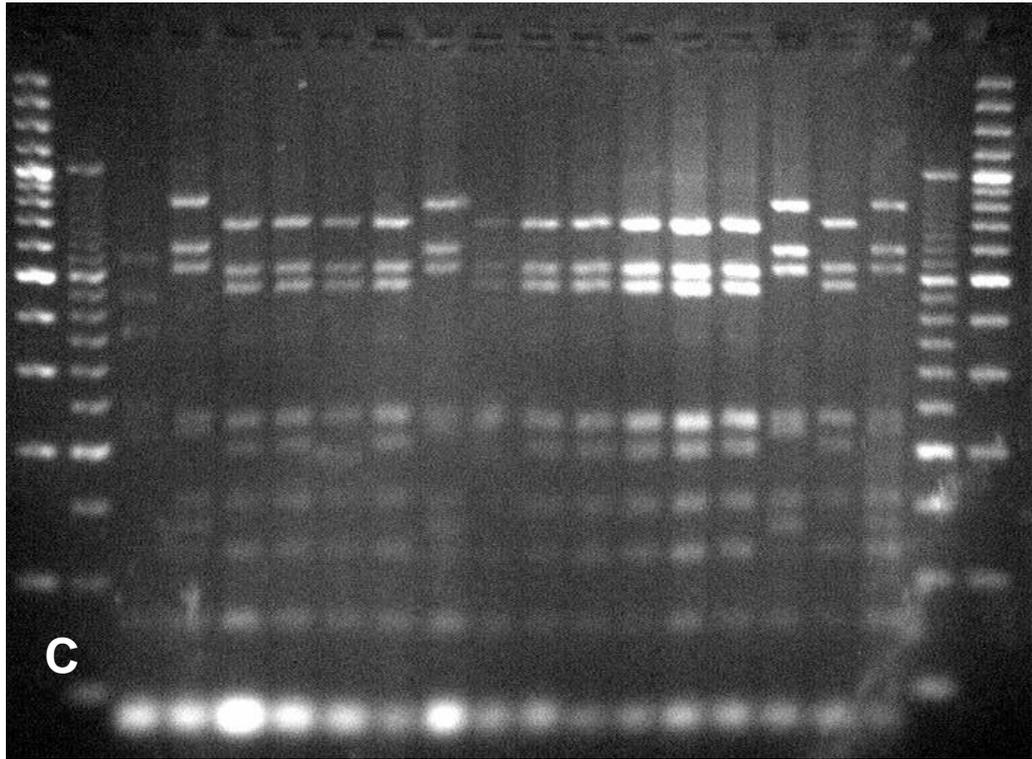


Figura 20. Dendrograma de similitud obtenido por UPGMA, utilizando las enzimas de restricci3n *Mbo* I, *Xho* I, *Eco* RI, *Hin*6 I, *Hha* I, *Alu* I, *Bsu* RI, *Hind* III, *Hae*III, en 18 aislados pertenecientes al complejo *F. graminearum* y *F. graminearum* 2150 de CECT.

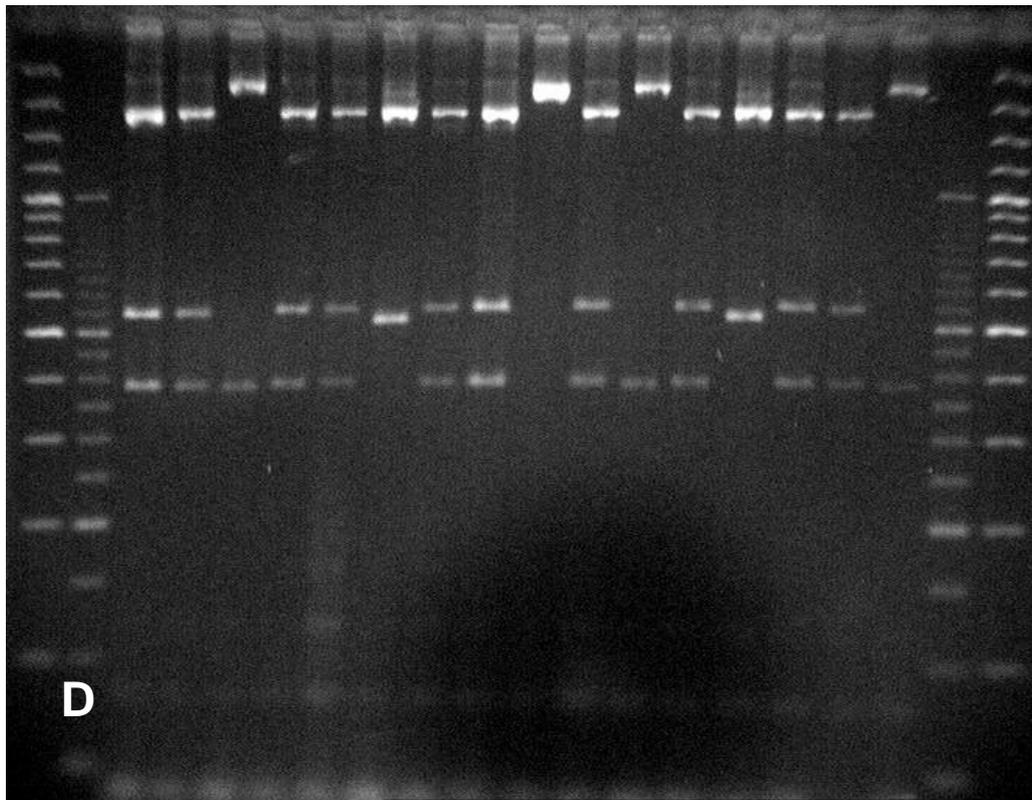


Fotografía 11A. Perfiles generados por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* con A: *AluI*; B: *BsuRI*

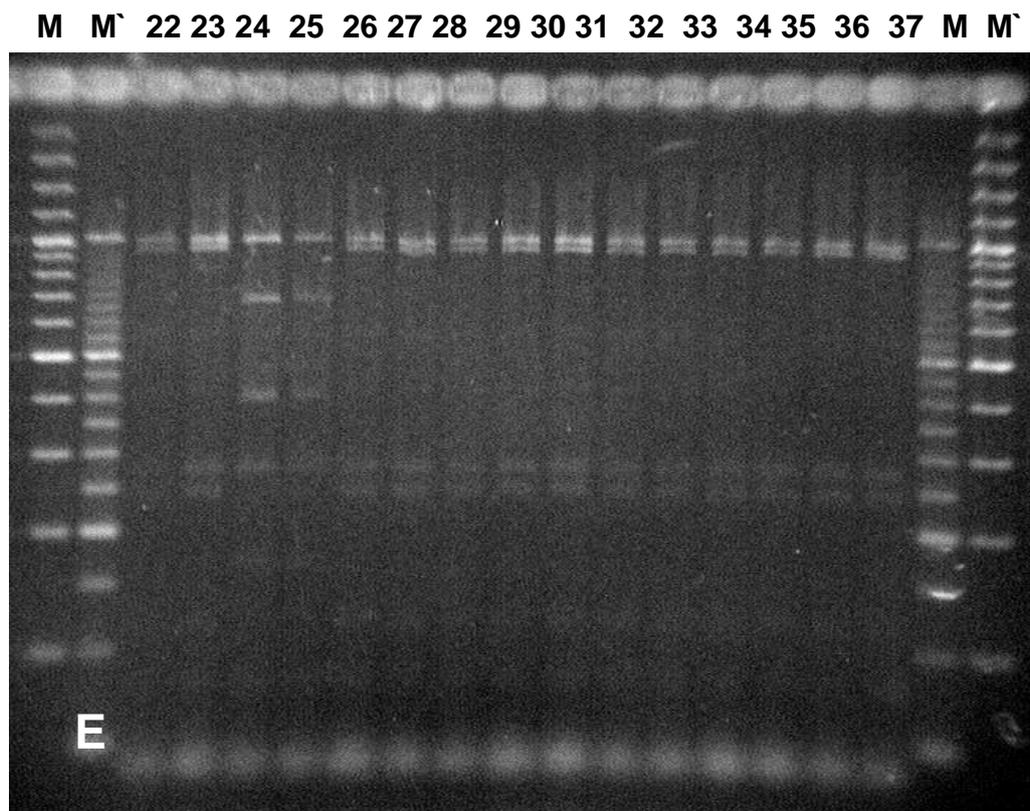
M M` 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M M`



M M` 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M M`



Fotografía 11B. Perfiles generados por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* con C: *MboI*; D: *EcoRI*



**Fotografía 11C. Perfil generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* con E: *HhaI***

Se realizó el análisis numérico conjunto de los 78 perfiles obtenidos por RFLPS para los aislados de este trabajo, junto a tres cepas de referencia de la CECT. El dendrograma resultante (Fig. 21) revela una elevada heterogeneidad. Observando los agrupamientos a un nivel de homología del 57%, se detecta la formación de once grupos. Dentro de los grupos I, II, III, quedan agrupados los 3 aislados identificados por secuenciación como *F. proliferatum*, junto con otros 13 aislados. En el grupo IV se agrupa la cepa de referencia *F. verticillioides* CECT2892 con 52 aislados pertenecientes a *F. verticillioides*, pero con una alta variación intra-especie. En el grupo V se agrupan dos aislados procedentes de maíz experimental y maíz almacén; en el grupo VI se encuentra un aislado procedente de maíz experimental. La cepa de referencia de *F. oxysporum* queda como única en el grupo VII. El grupo VIII lo componen cinco aislados, dos de ellos identificados por secuenciación como *F. equiseti*. El grupo IX está formado por un aislado identificado como *F. proliferatum*. El X grupo lo componen dos aislados procedentes de maíz campo y

maíz experimental, y en el grupo XI queda la cepa de referencia perteneciente a *F. graminearum*.

Para un mejor entendimiento elaboramos el dendrograma resultante del análisis numérico de los perfiles de digestión de los 41 aislados que se agrupan con la cepa de referencia *F. verticillioides* CECT 2982 (Fig. 22), observando una elevada heterogeneidad intra-especie. A un nivel de similitud del 80% se distinguen ocho grupos principales: el primero comprende ocho aislados de muestras de maíz experimental y de maíz campo; el segundo grupo abarca 20 aislados provenientes de las tres muestras de maíz, y agrupa a un nivel de homología del 100% a aislados de diferente procedencia. El tercer y cuarto grupo comprenden 2 aislados cada uno, procedentes de maíz almacén y el quinto grupo lo componen cinco aislados, tres aislados procedentes de maíz almacén y dos de maíz campo. El sexto y séptimo grupo están formados por un solo aislado y en el octavo grupo quedan dos aislados procedentes de maíz almacén.

Cuando se analizaron los aislados de *F. verticillioides* teniendo en cuenta de donde fueron aisladas, el dendrograma generado para los aislados procedentes de maíz almacén permitía diferenciar 5 grupos a un nivel de similitud > 75% (Fig. 23), sin que se apreciara una clara tendencia del lugar donde fueron aislados, aunque sí se observaba una gran heterogeneidad dentro de la misma especie. Para los aislados *F. verticillioides* procedentes de maíz campo, el dendrograma generado a un nivel de similitud del 88% revela (Fig. 24) 3 grupos, compuestos por aislados de muestras de las comunidades de Valencia y Castilla la Mancha. El primer grupo lo componen aislados de muestras de Castilla la Mancha y dos de ellas tienen un nivel de homología del 100%; el grupo dos lo componen tres aislados, dos aislados de muestras de Castilla la Mancha con nivel de similitud del 100% y uno de la Comunidad Valenciana, el tercer grupo lo compone un aislado procedente de una muestra de Castilla la Mancha.

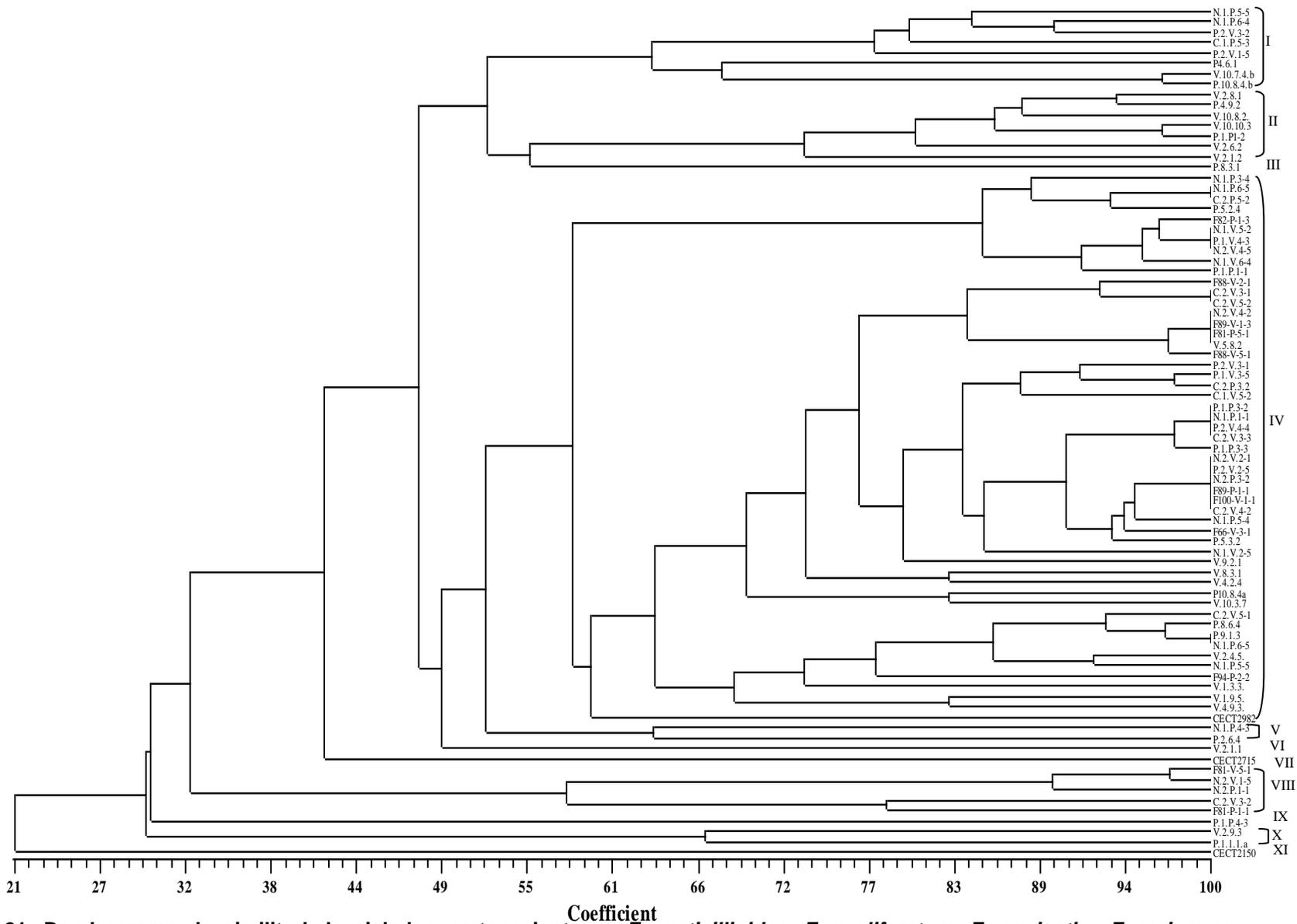


Figura 21. Dendrograma de similitud de aislados pertenecientes a *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. equiseti* y *Fusarium* sp., procedentes de granos de maíz y cepas de referencia CECT2982, CECT2715, CECT2150, en base a sus perfiles génicos de amplificación

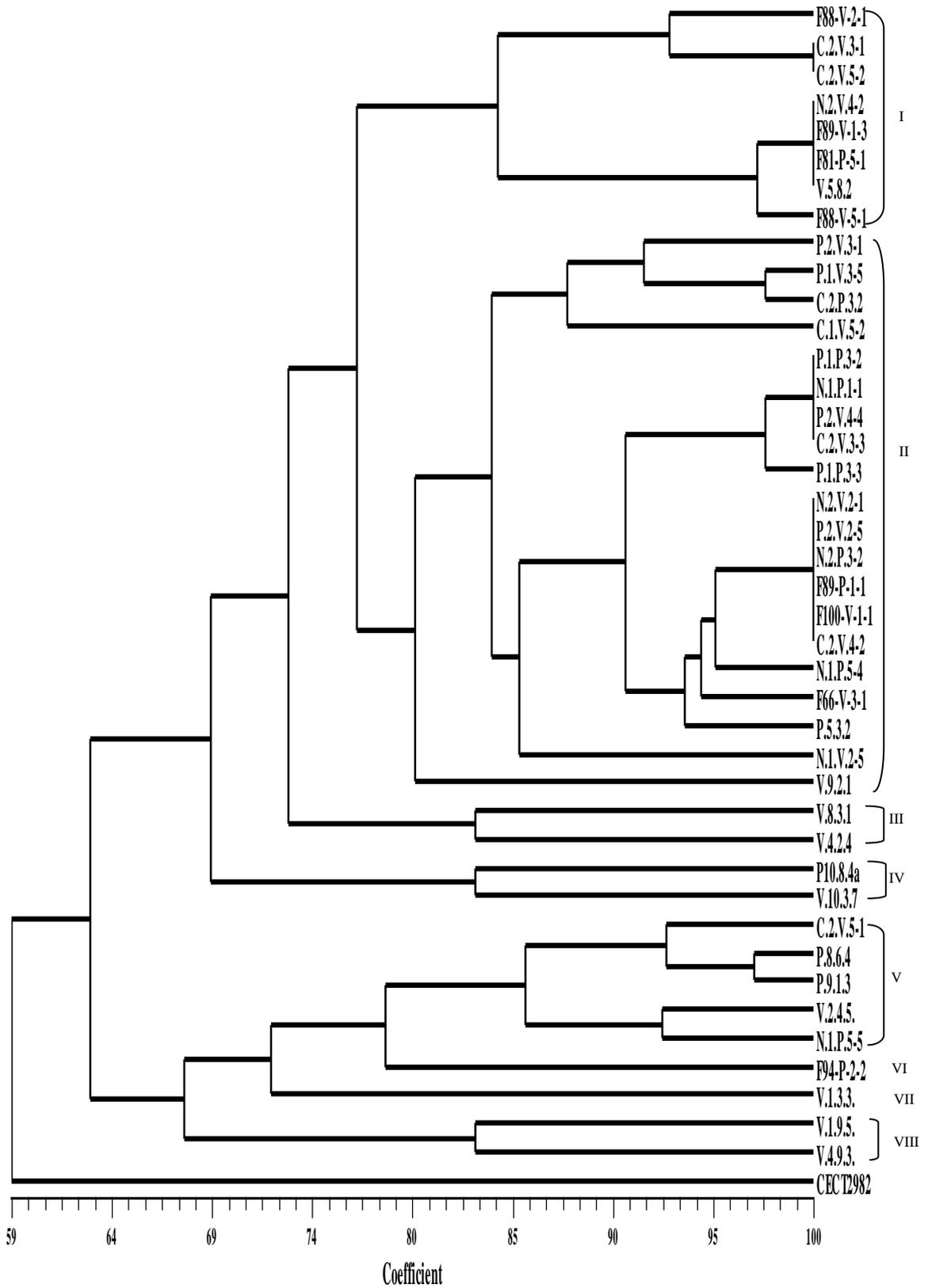


Figura 22. Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* procedentes de maíz campo, maíz almacén y maíz experimental y cepa de referencia CECT 2982

Con los aislados de *F. verticillioides* procedentes de maíz experimental se generó un dendrograma (Fig.25) que a un nivel de similitud del 75% permitía distinguir cinco grupos, sin que en ninguno de ellos se observara una tendencia clara en los agrupamientos según la variedad de donde fue aislado. De 36 aislados analizados con un nivel de homología >52% (Fig. 26) se generan ocho grupos. El primer grupo recoge los aislamientos N.1.P.3-4, N.1.P.6-5, C.2.P.5-2, P.5.2.4, F82-P-1-3, N.1.V.5-2, P.1.V.4-3, N.2.V.4-5, N.1.V.6-4, P.1.P.1-1 y N.1.P.5-4; en el segundo grupo están los aislados N.1.P.4-3 y P.2.6.4, que morfológicamente presentan características muy similares a *F. proliferatum*. El tercer grupo está formado por los aislados C.1.P.5-3, N.1.P.6-4, P.2.V.3-2, P.2.V.1-5, P4.6.1, V.10.7.4.b, P.10.8.4.b, V.2.8.1, P.4.9.2, V.10.8.2, V.10.10.3, P.1.P1-2, V.2.6.2, V.2.1.2 y P.8.3.1, cuatro de las cuales (V.10.7.4.b, P.1.P1-2, P.8.3.1, C.1.P.5-3) están identificados por secuenciación como *F. proliferatum*. El grupo IV es un aislado individual, V.2.1.1, el cual tiene una similitud del 45% con la cepa de referencia *F. verticillioides*, que queda también como cepa individual en el grupo V. Los aislados V.2.9.3 y P.1.1.1.a quedan agrupados en el grupo VI; éstas tienen un menor porcentaje de similitud con los aislados pertenecientes a *F. proliferatum*. En el grupo VII se agrupan los aislados F81-V-5-1, N.2.V.1-5, N.2.P.1-1, C.2.V.3-2, y F81-P-1-1, dos de las cuales (F81-P-1-1, N.2.V.1-5) se identificaron como *F. equiseti*.

## 6. IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Fusarium spp.*, PRODUCTORES DE TRICOTECENOS

Una vez identificadas por PCR los aislados como pertenecientes al género *Fusarium*, se llevó a cabo la detección de aislados productores de tricotecenos, empleando los iniciadores Tox5-1 y Tox5-2 (Bakan *et al.*, 2002), que detectan y amplifican un fragmento de 650 pb localizado en el gen *tri5*. Para demostrar la eficacia de este tipo de PCR, se probaron las cepas de referencia *F. graminearum* y *F. culmorum*, las cuales son productoras de tricotecenos, obteniendo la banda correspondiente. De los 377 aislados seleccionados, se identificaron 26 productores de tricotecenos, como se observa en la fotografía12.

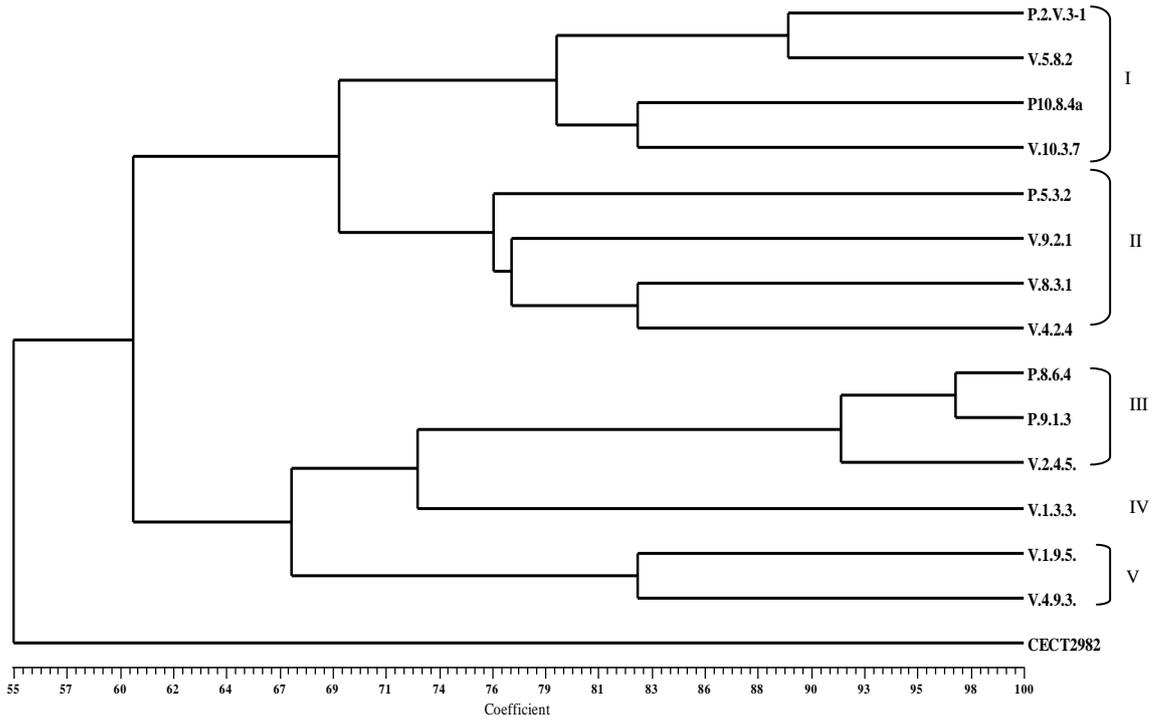


Figura 23. Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* provenientes de maíz almacén y cepa de referencia CECT 2982

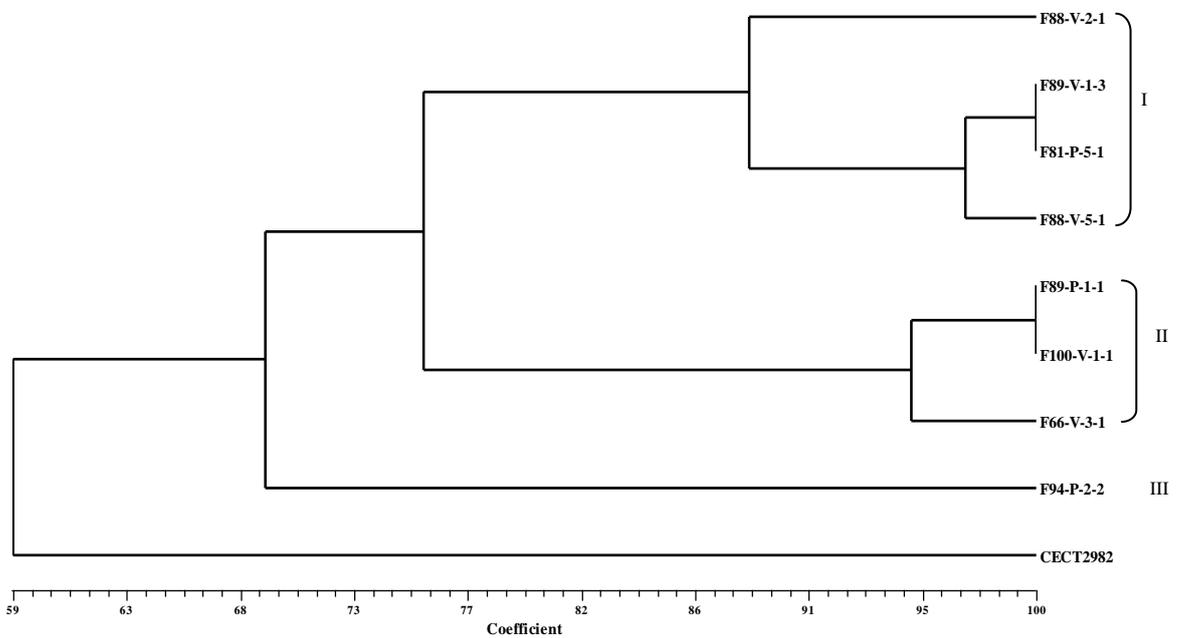


Figura 24. Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* provenientes de maíz campo y cepa de referencia CECT 2982

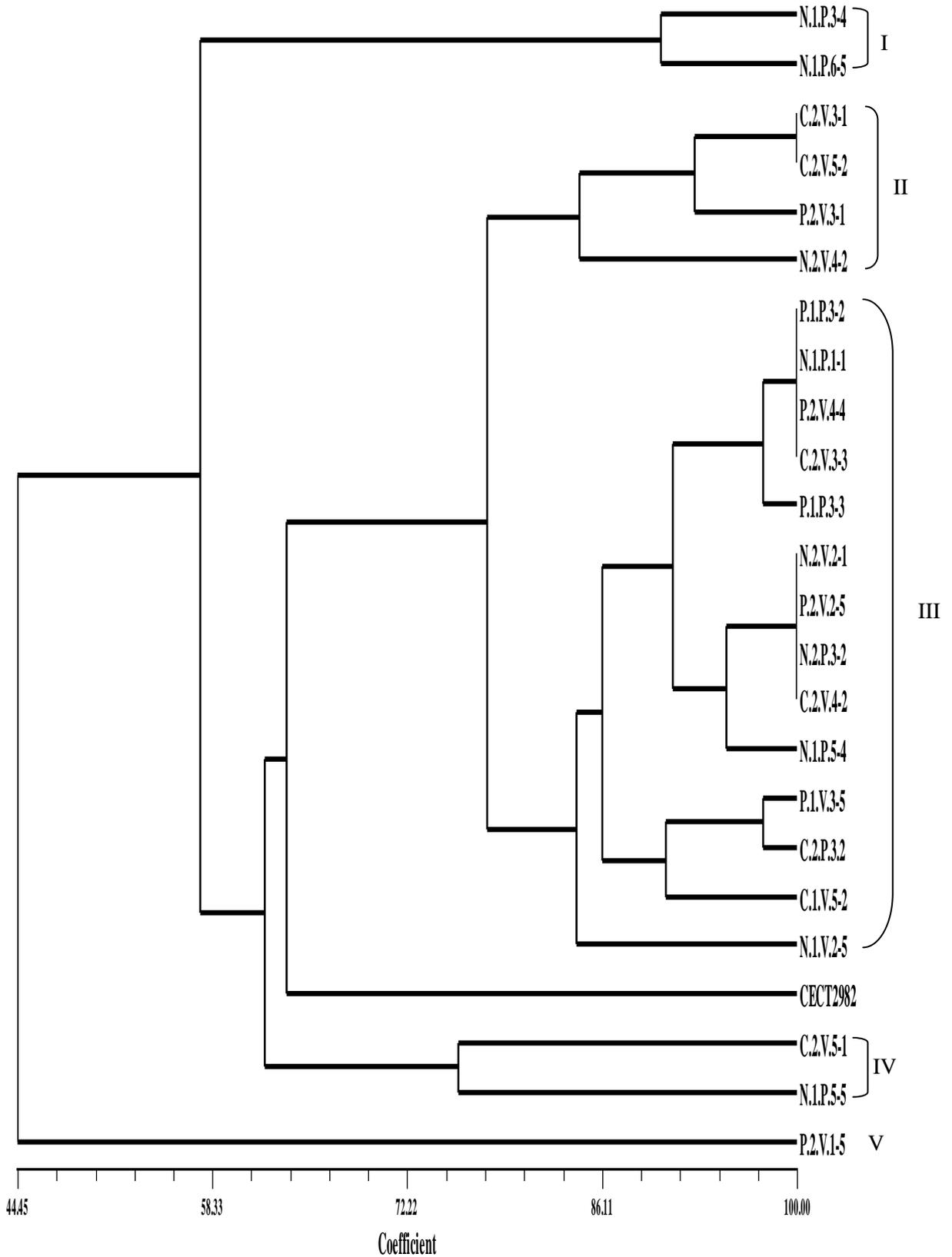


Figura 25. Dendrograma generado por análisis de restricción de la región IGS de aislados de *F. verticillioides* provenientes de maíz experimental y cepa de referencia CECT 2982

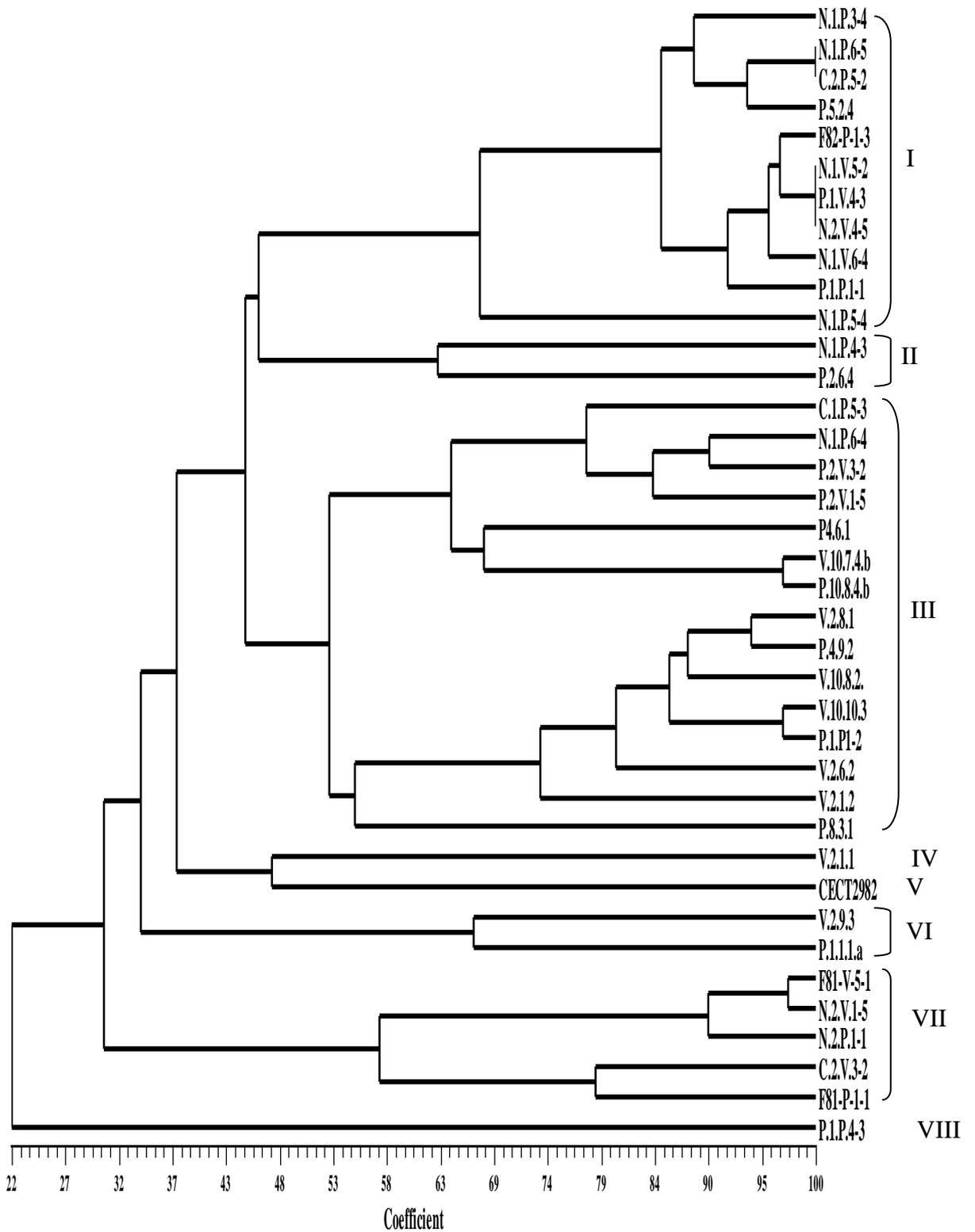
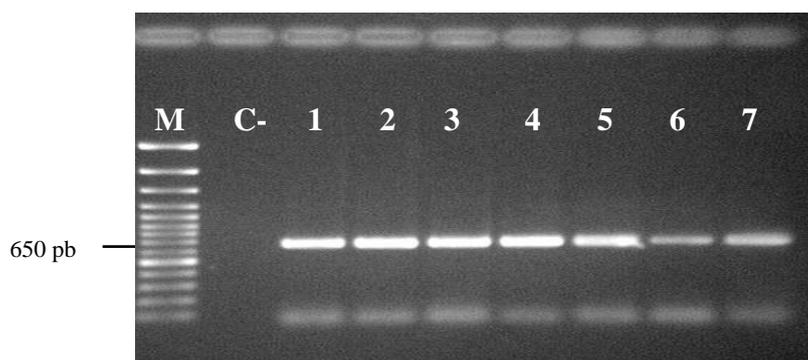


Figura 26. Dendrograma generado con 36 aislados de *Fusarium* spp., provenientes de maíz, por análisis de restricción de la región IGS y cepa de referencia CECT 2982



**Fotografía 12. Identificación de aislados productores de tricotecenos mediante PCR. 1: P 5.4.1, 2: P 5.1.1, 3: F81-P-1-1, 4: F93-V-3-1, 5: V 2.10.3, 6: F30-P-5-1, 7: F89-V-1-3, C-: Blanco, M: marcador, C+: *F. graminearum* CECT 2150**

La PCR realizada con los iniciadores ToxP1 y ToxP2 se utiliza para identificar los dos quimiotipos de *F. graminearum* se distingue el quimiotipo DON productoras de DON y quimiotipo NIV productoras de NIV, se diferencia en el tamaño del fragmento obtenido. Nuestros aislados resultaron positivos todas con un fragmento de 300 pb que identifica al quimiotipo DON.

## **7. COMPROBACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol Y Nivalenol EN AISLADOS DEL COMPLEJO *F. graminearum* POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR DE MASAS**

Los parámetros analíticos del método utilizado fueron puestos a punto en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia. Para determinar la producción de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol en los medios de cultivo PDA, Czapeck y YES, el proceso a seguir fué el de extracción, purificación y detección de micotoxinas descrito en el apartado 5 de material y métodos.

Se utilizó como límites de cuantificación estimados 20.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para deoxinivalenol, 23.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para 3-acetildeoxinivalenol, 15.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para fusarenon X, 21.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para 15-acetildeoxinivalenol y 19.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para nivalenol. Para ello se realizaron los ensayos de fortificación y recuperación ya descritos.

Para conocer la exactitud del método experimental, el estudio se realizó sobre los porcentajes de recuperación de micotoxina, mientras que la precisión se analizó mediante los valores de las desviaciones estándar relativas. Los resultados de la exactitud y precisión para los diferentes medios de cultivo del método se muestran en la Tabla 22.

**Tabla 22. Exactitud y precisión del método para las diferentes micotoxinas evaluadas**

	Nivel de fortificación (mg/kg)	Recuperación ± RSD (%) <sup>a,b</sup>		
		PDA	CZAPECK	YES
DON	1	89.67 ± 6.57	82.28 ± 0.77	100.24 ± 3.94
3-AcDON	1	98.27 ± 6.30	90.13 ± 16.89	84.64 ± 2.74
15-AcDON	1	100.41 ± 4.00	100.53 ± 16.78	96.09 ± 6.08
FUS X	1	79.44 ± 5.97	79.77 ± 16.81	88.72 ± 9.44
NIVALENOL	1	83.39 ± 0.40	82.30 ± 7.93	87.20 ± 6.73

<sup>a</sup>: Cuantificación por patrón interno: DON: deoxinivalenol; 3-AcDON: 3 acetil deoxinivalenol; 15-AcDON: 15 acetildeoxinivalenol; FX: fusarenon X

<sup>b</sup>: desviación estándar relativa

Nivel de fortificación de las muestras 1 mg de toxina por kg de agar

Número de repeticiones = 3

Los porcentajes de recuperación para las cinco micotoxinas fue elevada llegándose a obtener porcentajes máximos de 100.24% para deoxinivalenol en medio de cultivo YES y 89.67% en PDA, 100.41% para 15-AcDON en PDA, la más baja recuperación se presentó para fusarenon X con 79.44% dicho porcentaje se considera un porcentaje satisfactorio.

### 7.1. Presencia de Deoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Fusarenon X, 15-Acetildeoxinivalenol y Nivalenol, en los medios de cultivo PDA, Czapeck y YES

Se analizaron un total de 15 aislados pertenecientes al complejo *F. graminearum*, y una cepa control (CECT 2150), en los tres medios de cultivo. Todas las muestras en estudio, excepto tres (P 5.9.1, P 2.9.2 y V 10.7.4 a) resultaron positivas, produciendo alguna micotoxina en las diferentes condiciones. Por PCR en todas ellas se analizó la existencia de los genes implicados en la producción de tricotecenos: el fragmento localizado en el gen *tri5*, que codifica para la producción

de tricotecenos, y los genes *tri5* y *tri6* implicados en la síntesis de los tricotecenos DON y NIV. La PCR que detecta la secuencia del gen *tri5* resultó positiva en todas los aislados analizados de *F. graminearum*. La PCR realizada con los iniciadores ToxP1 y ToxP2 sobre los aislados analizados de *F. graminearum* resultó también positiva para todas ellas, amplificando un fragmento de 300 pb que identifica al quimiotipo DON.

Los estudios cromatográficos mostraron la producción de dos tricotecenos, DON y 15-AcDON, en los doce aislados positivos y 6 de ellas produjeron también 3-AcDON en cantidad cuantificable (Tabla 23).

Se empleó el método desarrollado en nuestro laboratorio para investigar la producción de tricotecenos a partir de los aislados de *F. graminearum* encontrados en este trabajo. Con este fin se sembraron los aislados en tres medios de cultivo (PDA, Czapeck, YES) y se analizaron a los 7, 14 y 21 días de incubación a 20 °C. Se obtuvieron resultados muy dispares, dependiendo del medio de cultivo y del tiempo de incubación. En las Tablas 24, 25 y 26 se muestran las concentraciones detectadas expresadas en ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de micotoxina en medio de cultivo crecido.

**Tabla 23. Detección de genes implicados en la producción de tricotecenos y DON y NIV. Resumen de las cuatro micotoxinas producidas por aislados del complejo *F. graminearum* provenientes de maíz, en los distintos medios de cultivo y distintos tiempos de incubación**

Aislados	PCR			Micotoxinas detectadas				
	Iniciadores			DON	3-AcDON	15-AcDON	FX	NIV
	217/170	Toxi5-1/ Tox5-2	ToxP1/ToxP2 DON y NIV					
P 5.5.1	+	+	DON	+	-	+	-	-
V 5.5.5 (2)	+	+	DON	+	-	+	-	-
V 2.3.5 (1)	+	+	DON	+	+	+	-	-
V 2.3.5 (2)	+	+	DON	+	+	+	-	-
P 5.4.1	+	+	DON	+	+	+	-	-
V 5.5.5 (1)	+	+	DON	+	-	+	-	-
V 5.1.1 (1)	+	+	DON	+	-	+	-	-
V 5.1.1(2)	+	+	DON	+	+	+	-	-
P 2.9.3 (1)	+	+	DON	+	+	+	-	-
P 2.9.4	+	+	DON	+	-	+	-	-
P 2.9.3 (2)	+	+	DON	+	-	+	-	-
P 5.1.1	+	+	DON	+	+	+	-	-
Referencia CECT 2150	+	+	DON	+	-	+	-	-

En el medio de cultivo PDA a los 7 días de incubación sólo hay tres muestras positivas, la V2.3.5 (1) en la que se detectó una cantidad no cuantificable de 15-AcDON, la muestra P 5.4.1., en la que se detectaron pequeñas cantidades de DON y 15-AcDON y la muestra P 5.1.1., en la que se encontró una pequeña cantidad de DON.

A los 15 días de incubación se detectó la producción de tricotecenos en 11 aislados y en la cepa de referencia CECT 2150. En 7 aislados se detectaron las toxinas DON y 15-AcDON, en un aislado (V 5.1.1.(1)) se detectó una pequeña cantidad de 15-AcDON, en la cepa de referencia sólo se detectó DON y en tres aislados V 2.3.5.(1), V 2.3.5.(2) y P 5.1.1., se encontraron los tres tricotecenos DON, 3-AcDON y 15-AcDON, aunque 3-AcDON se detectó en una cantidad muy inferior a los otros dos tricotecenos.

A los 21 días, se encontraron 10 aislados positivos además de la cepa de referencia CECT 2150. En este caso son 7 los aislados en las que se detectaron las tres micotoxinas, DON, 15-AcDON y 3-AcDON; en un aislado (P 5.4.1) se detectó DON y 3-AcDON, en otro (P 2.9.4), DON y 15-AcDON y en el aislado V 5.5.5. (1) una cantidad no cuantificable de DON. En la cepa de referencia sólo se encontraron pequeñas cantidades de DON y 15-AcDON.

En el medio YES, sólo 5 aislados produjeron tricotecenos en alguna condición; a los 7 días en el aislado P 5.1.1 se detectó 15-AcDON, a los 15 días en 2 aislados, V.5.5.1.(1) y P.2.9.3.(1), se encontró DON y a los 21 días se detectó DON en 4 aislados P 5.5.1, P 5.4.1., V.5.5.1.(1) y P 5.1.1, los 2 de últimos también producían 15-AcDON. Con este tiempo de incubación la cepa de referencia produjo una pequeña cantidad de 15-AcDON.

En el medio Czapeck a los 7 días de incubación se encontraron 4 aislados positivos para DON, V 5.1.1.(1), P 5.5.1, P 2.9.3(1) y P 5.1.1, siendo uno de ellos, P 5.5.1, positivo para 15-AcDON, pero en cantidades muy pequeñas. A los 15 días se detectaron 3 aislados positivos para DON, uno de las cuales también producía 15-AcDON, P 5.1.1, y un aislado positivo para 15-AcDON, V. 5.5.5.(2). Con 21 días de incubación se encontraron 8 aislados positivos para DON, de las cuales en 3, V 5

1.1.1 (1), P 5.5.1. y P 2.9.3.(1) también se detectó 15-AcDON y en dos, V 5.5.5(2) y P 5.1.1. 15-AcDON y 3-AcDON detectado pero no cuantificable. En este medio de cultivo las cantidades de tricotecenos cuantificadas son muy pequeñas y la cepa de referencia no produce ningún tricoteceno.

El intervalo de concentraciones de deoxinivalenol en el medio PDA estuvo entre 25.83 y 3033.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 3-AcDON entre 20.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 153.62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; y 15-AcDON 37.10 y 3634  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La mayor concentración detectada de deoxinivalenol se encontró en el medio de cultivo PDA con el aislado V 2.3.5 (2) a los 14 días de cultivo y la menor con el aislado P 5.1.1 a los siete días de cultivo. Para 15-AcDON, el aislado V 5.1.1 (2) alcanzó la más alta concentración de esta micotoxina a los 21 días de cultivo, mientras que la mayor concentración de 3-AcDON se detectó en el aislado V 2.3.5. (1) a los 21 días de incubación. Cabe destacar que el medio de cultivo donde se obtuvo mayor producción y en cantidades más elevadas de micotoxinas fue PDA a los 21 días de cultivo.

En el medio YES las cantidades de DON oscilaron entre 271.04 y 64.52  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y las de 15-AcDON entre 620.37 y 24.62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no detectándose en ninguna muestra la producción de 3-AcDON.

En el medio Czapeck las concentraciones de los diferentes tricotecenos variaron entre 24.34  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 234.31  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para DON; 37.81  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 124.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para 15-AcDON y dos muestras de cantidades no cuantificables para 3-AcDON.

Tabla 24. Micotoxinas detectadas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por CG-MS a partir de medio de cultivo PDA crecido con aislados de *F. graminearum* incubadas durante 7, 15 y 21 días a 20 °C

		PDA														
		(T+7) ppb					(T+15)ppb					(T+21)ppb				
		DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV	DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV	DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV
V 5.1.1 (2)	1P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	170.1	n.d.	n.d.	309.28	n.d.	2908.30	35.39	n.d.	3634.00	n.d.
F30PS1	2P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 5.9.1 (2)	3P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 5.1.1. (1)	4P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	41.57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 5.5.1	5P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	244.92	n.d.	n.d.	249.91	n.d.	530.24	n.c.	n.d.	66.19	n.d.
P 2.9.3 (1)	6P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	56.78	n.d.	n.d.	168.08	n.d.	1091.15	n.c.	n.d.	285.83	n.d.
P 2.9.2	7P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 5.5.5. (2)	8P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	198.44	n.d.	n.d.	72.18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 2.9.4	9P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	404.32	n.d.	n.d.	94.31	n.d.	209.9	n.d.	n.d.	37.05	n.d.
V 10.7.4 a (1)	10P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 2.9.3 (2)	12P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2374.8	121.23	n.d.	95.46	n.d.
V 2.3.5 (1)	13P	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	1727.80	20.55	n.d.	1709.23	n.d.	1565.6	153.62	n.d.	170.01	n.d.
V 2.3.5 (2)	14P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3033.04	29.54	n.d.	1619.89	n.d.	702.01	n.c.	n.d.	132.34	n.d.
P 5.4.1	15P	39.59	n.d.	n.d.	37.10	n.d.	105.23	n.d.	n.d.	62.52	n.d.	324.98	22.89	n.d.	n.d.	n.d.
V 5.5.5 (1)	16P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	56.54	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 5.1.1	17P	25.83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	156.27	n.c.	n.d.	504.55	n.d.	1379.3	99.41	n.d.	125.49	n.d.
Ref. 2150	R1P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	68.31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30.80	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.

n.c.: detectado no cuantificable

n.d.: no detectado

Tabla 25. Micotoxinas detectadas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por CG-MS a partir de medio de cultivo YES crecido con aislados de *F. graminearum* incubadas durante 7, 15 y 21 días a 20 °C

		<b>YES</b>														
		(T+7) ppb					(T+15)ppb					(T+21)ppb				
		DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV	DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV	DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV
V 5.1.1 (2)	1Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F30PS1	2Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 5.9.1 (2)	3Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 5.1.1. (1)	4Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64.52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	271.04	n.d.	n.d.	83.22	n.d.
P 5.5.1	5Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	77.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 2.9.3 (1)	6Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	154.49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 2.9.2	7Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 5.5.5. (2)	8Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 2.9.4	9Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 10.7.4 a (1)	10Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 2.9.3 (2)	12Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 2.3.5 (1)	13Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 2.3.5 (2)	14Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 5.4.1	15Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	61.87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V 5.5.5 (1)	16Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P 5.1.1	17Y	n.d.	n.d.	n.d.	620.37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	72.16	n.d.	n.d.	24.62	n.d.
Ref. 2150	R1Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27.12	n.d.

n.d.: no detectado

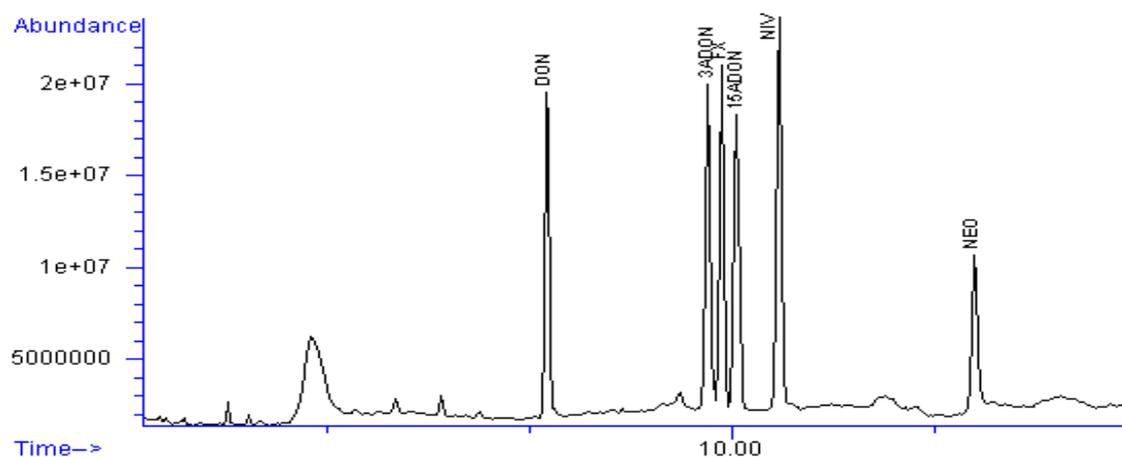
Tabla 26. Micotoxinas detectadas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por CG-MS a partir de medio de cultivo CZAPEK crecido con aislados de *F. graminearum* incubadas durante 7, 15 y 21 días a 20 °C

		CZAPEK														
		(T+7) ppb					(T+15)ppb					(T+21)ppb				
		DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV	DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV	DON	3-AcDON	FX	15-AcDON	NIV
V 5.1.1 (2)	1C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
F30PS1	2C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
P 5.9.1 (2)	3C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V 5.1.1. (1)	4C	128.54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	68.17	n.d.	n.d.	112.72	n.d.	
P 5.5.1	5C	n.c.	n.d.	n.d.	78.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	113.22	n.d.	n.d.	37.81	n.d.	
P 2.9.3 (1)	6C	108.43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	88.96	n.d.	n.d.	44.51	n.d.	
P 2.9.2	7C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V 5.5.5. (2)	8C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	46.51	n.d.	23.73	n.c.	n.d.	124.08	n.d.	
P 2.9.4	9C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V 10.7.4 a (1)	10C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
P 2.9.3 (2)	12C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	113.52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V 2.3.5 (1)	13C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	64.70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V 2.3.5 (2)	14C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43.26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
P 5.4.1	15C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V 5.5.5 (1)	16C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.c.	n.d.	n.d.	n.d.	55.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
P 5.1.1	17C	24.34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	116.38	n.d.	n.d.	n.c.	234.31	n.c.	n.d.	75.37	n.d.	
Ref. 2150	R1C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

n.c.: detectado no cuantificable

n.d.: no detectado

En la Fig. 27 observamos un cromatograma de iones totales de los patrones de DON, 3-AcDON, FUS X, 15-AcDON y NIV a una concentración de 4 ppm. Con el método optimizado en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia se consiguió la separación clara de las cinco micotoxinas.



**Figura 27. Cromatograma de iones totales de patrón 4 ppm**

NEO: neosolaniol (patrón interno); DON: deoxinivalenol; 3-AcDON: 3-acetildeoxinivalenol; FX: fusarenon X; 15-AcDON: 15-acetildeoxinivalenol; NIV: nivalenol

En la Fig. 28 se observa el cromatograma de iones totales del aislado P2.9.3(2) en medio de cultivo PDA en el que se destaca un pico correspondiente a deoxinivalenol, a un determinado tiempo de retención. El espectro de iones de DON al mismo tiempo de retención (Fig. 29) nos proporciona la abundancia del ión cuantitativo (235), y la de los iones cualitativos (259, 295)

En las Fig. 30 y 31 se presentan los cromatogramas de iones totales del aislado V.5.1.1(1) en medio de cultivo Czapeck a los 21 días, en los que se detecta los picos correspondientes a DON y 15-AcDON.

## Resultados

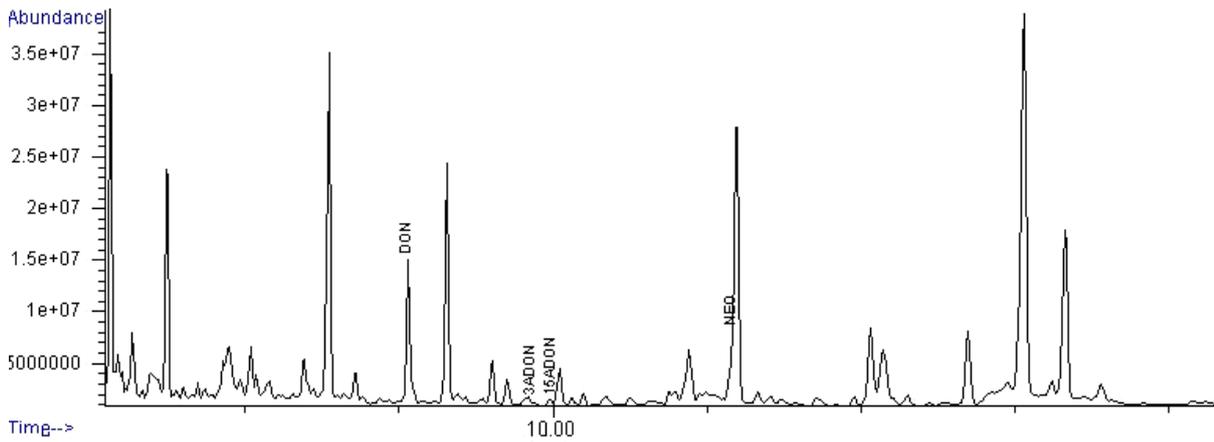


Figura 28. Cromatograma de iones totales de la muestra P2.9.3 (2) en medio de cultivo PDA

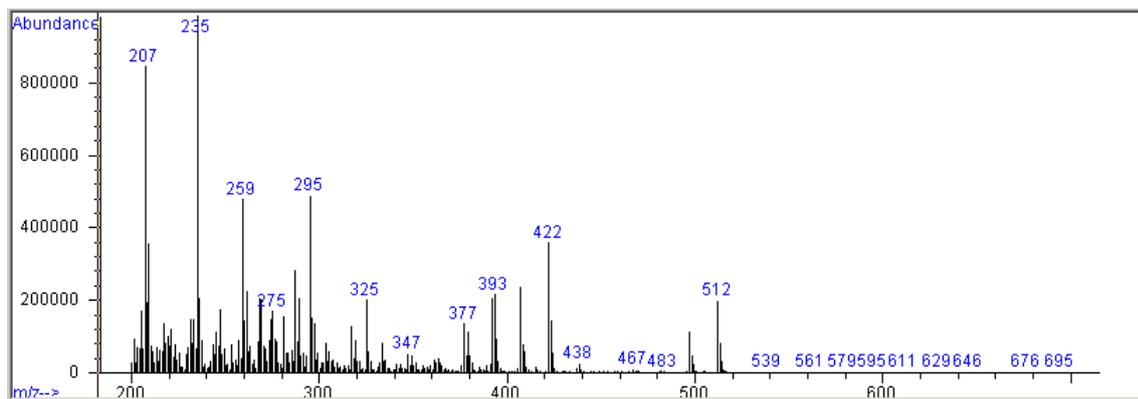
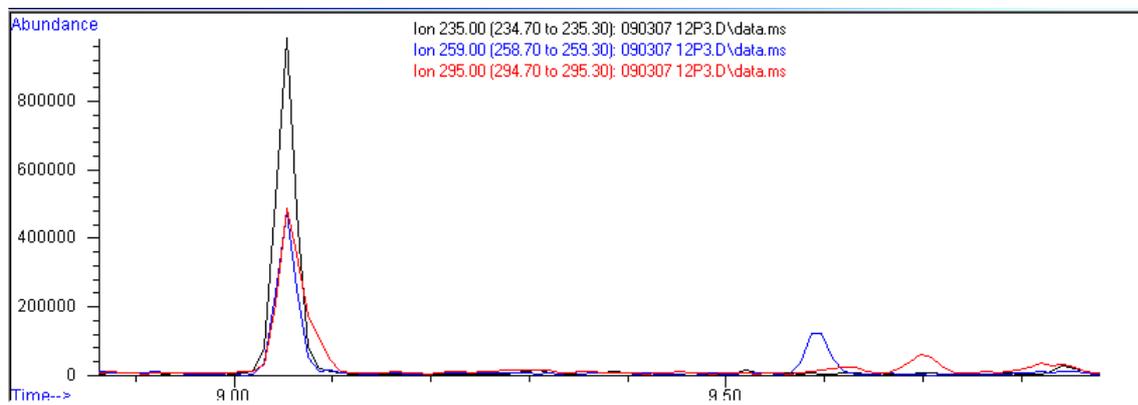
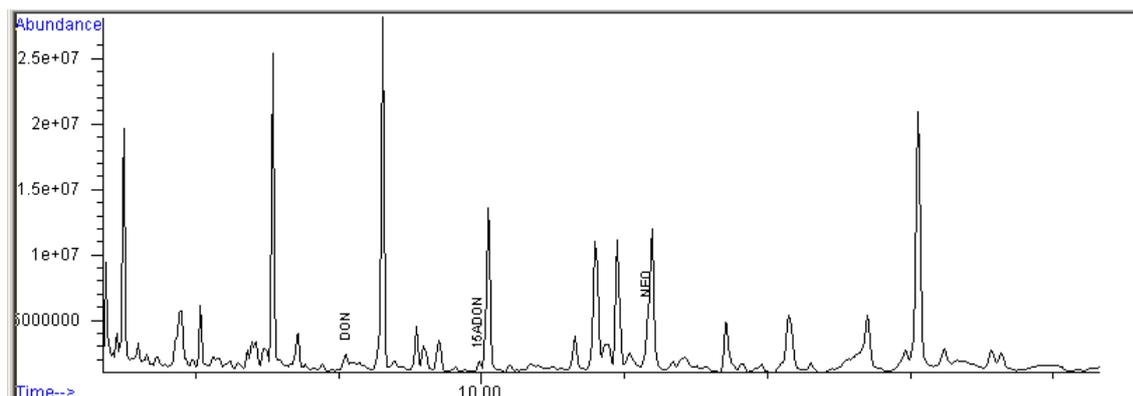
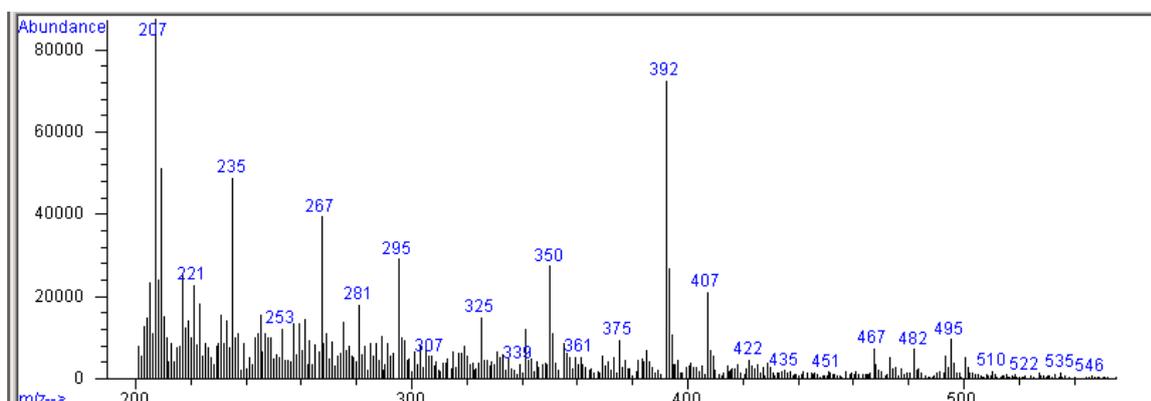
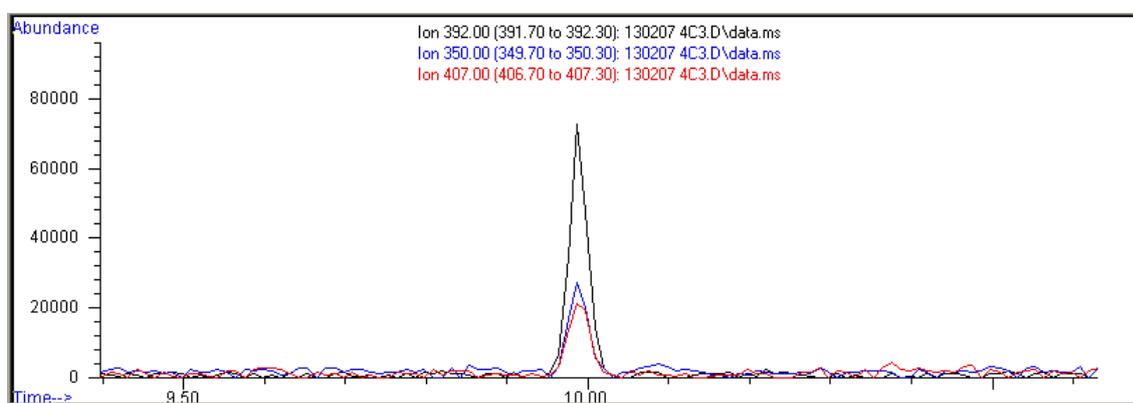


Figura 29. Cromatograma de iones cuantitativo y cualitativo de DON (parte superior) y espectro de iones al tiempo de retención de DON (parte inferior) en la muestra P2.9.3(2) en PDA a los 21 días



**Figura 30. Cromatograma de iones totales del aislado V.5.1.1(1)  
Neo: neosolaniol (patrón interno); DON: deoxinivienol; 15-AcDON**



**Figura 31. Cromatograma de iones cuantitativo y cualitativo de 15-AcDON (parte superior) y espectro de iones al tiempo de retención 15-AcDON (parte inferior del aislado V.5.1.1(1))**

De las 15 muestras analizadas, 12 son positivas de esas el 100% son productoras de DON y 15-AcDON. Como se dijo anteriormente algunos aislados producen una a varias micotoxinas a la vez.



## V. DISCUSIÓN

---



## V. DISCUSIÓN

La inocuidad de los alimentos utilizados por el hombre es un tema cada vez más importante a nivel mundial. Es por ello que la comunidad científica dedicada a la seguridad alimentaria, ha hecho grandes esfuerzos en la investigación de contaminantes que pueden estar presentes en todo tipo de alimentos.

Este trabajo se ha dirigido hacia el estudio de los hongos del género *Fusarium* que colonizan granos del maíz. Estos hongos, bajo ciertas condiciones, son capaces de producir metabolitos secundarios en los medios de cultivo o sustrato donde crecen, que pueden ser tóxicos para la salud humana y animal (micotoxinas).

En el presente estudio se ha analizado, en primer lugar, la contaminación fúngica de diversos tipos de maíz que pueden alcanzar al consumidor. Los hongos del género *Fusarium* detectados han sido identificados y caracterizados mediante métodos fenotípicos y genotípicos, con el fin de obtener información taxonómica y epidemiológica, y su capacidad para producir las micotoxinas tricotecenos se ha valorado mediante análisis químicos, y mediante la detección de los genes que codifican para su producción.

En general las muestras de maíz almacén presentan un alto porcentaje de contaminación por hongos del género *Fusarium* ya que de los 1000 granos analizados se aislaron 342 hongos pertenecientes al género *Fusarium* lo que corresponde al 72% de la contaminación fúngica. Es de destacar que las especies de este género están consideradas como uno de los mayores contaminantes de cereales en países como España, Italia, Francia, Brasil, Argentina, China y África, entre otros, y hay que considerar que este cereal es un componente primordial de piensos para animales de granja, y pueden causar micotoxicosis secundaria en humanos a través de la cadena alimenticia (Torondel, 2001; Bennett and Klich, 2003; Jurjevic *et al.*, 2005; Cvetnic *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2008;).

En el maíz campo se encontró que la contaminación por algún tipo de hongo es del 38.96%, de los granos estudiados, porcentaje considerable teniendo en cuenta que los granos proceden de mazorcas destinadas al consumo humano y que han

sido cultivadas empleando técnicas agrícolas apropiadas para reducir y evitar el ataque fúngico.

Básicamente la micobiota en estas muestras pertenece a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Geotrichum* y *Fusarium*, siendo los géneros esperados ya que pertenecen a los llamados hongos de campo (Torondel, 2001).

La distribución de la micobiota dentro de las comunidades fue variable, pero se encontraron en común los géneros, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* como los géneros con mayor incidencia. Se pudo observar algunas diferencias en lo que respecta a la distribución geográfica de la contaminación fúngica: en las comunidades de Castilla la Mancha y la Comunidad Valenciana predominan las especies del género *Penicillium*, coincidiendo con los resultados obtenidos por Cantalejo en 1995, mientras que en Extremadura predomina el género *Aspergillus* no detectándose *Penicillium*. En el caso de las comunidades de Madrid y Murcia, predominan las especies de *Alternaria* y *Fusarium*, respectivamente. En vista de los resultados obtenidos en este trabajo, queda clara la incidencia del género *Fusarium* en los granos de maíz campo, ya que de las 100 muestras estudiadas se han hallado en 64 de ellas, en un total de 228 aislados, identificadas tanto macroscópicamente como microscópicamente.

Con respecto a los valores medios de los aislados obtenidos del género *Fusarium*, en todas las comunidades autónomas evaluadas se obtuvieron valores similares, sin diferencias significativas excepto para los valores observados entre Madrid y Murcia. Por tanto, los niveles de contaminación por el género *Fusarium* no parecen estar influenciados por la zona geográfica estudiada.

La micobiota del maíz experimental lo componen básicamente los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, y hongos del orden mucorales. El promedio de contaminación de los granos corresponde al 93%, siendo el género *Fusarium* el grupo con mayor incidencia en dos de las tres variedades (Cridor y Net). Si se analizan el número de hongos totales, observamos que en la variedad Panamá se han aislado el mayor número de hongos del género *Aspergillus* y el menor número

de aislados de *Fusarium* spp.; en la variedad Cridor encontramos mayor porcentaje de *Fusarium* spp., y un porcentaje similar de *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp., y en la variedad Net el mayor número de aislados de *Fusarium* spp., y el menor crecimiento de *Aspergillus* spp.

Estadísticamente no existen diferencias significativas entre los valores medios de *Fusarium* spp., obtenidos para cada variedad. Esto parece indicar que, al igual que en el caso anterior, la contaminación por *Fusarium* spp., es general, y no depende de variedades de maíz o de la zona de España donde se cultive. Después de una revisión bibliográfica no hemos encontrado datos actuales comparativos sobre la incidencia del género *Fusarium* en los cultivos de maíz de distintas zonas de España.

Si comparamos los resultados obtenidos en los tres estudios realizados con maíz, podemos concluir que el maíz donde obtenemos el mayor porcentaje de aislados de *Fusarium* respecto a otros hongos es el maíz almacén, donde se conforma como el género predominante con un porcentaje del 72 %. En los análisis realizados al maíz campo el porcentaje fue del 22 % y en maíz experimental en parcela de la Universidad Politécnica el 47%.

También cabe destacar que el porcentaje de granos contaminados en el maíz experimental que no ha sido tratado con ningún producto funguicida, es aproximadamente del 100%, mientras que en el maíz almacén es del 43% y en el maíz de campo, corresponde al 38%.

Nuestros resultados coinciden con estudios realizados en otros países: Cvetnic *et al.* (2005) en Croacia, encuentran que los hongos que más frecuentemente se aíslan de maíz pertenecen a especies del género *Fusarium*, con un 85% de incidencia en el año 2003. Otros géneros identificados por estos autores fueron *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Absidia*, presentes con frecuencias de 3.6 a 12.5%. En México uno de los principales contaminantes también es *Fusarium* spp., junto con *A. flavus* (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

En los diferentes estudios sobre la presencia de micotoxinas en productos agroalimentarios, los que se encuentran con mayor frecuencia son los producidos por especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Claviceps* y en menor medida la producida por hongos del género *Alternaria* y *Acremonium* (Diekman and Green, 1992; Lugauskas, 2005). Todos estos géneros, excepto *Claviceps*, fueron encontrados en las muestras analizadas.

En resumen, el total de aislados de *Fusarium* spp., obtenidas de las 206 diferentes muestras analizadas (maíz almacén, maíz campo y maíz experimental) fue de 1198. Estos resultados corroboran lo encontrado en diferentes estudios a nivel mundial, que destacan al género *Fusarium* como uno de los principales patógenos del maíz (Munkvold and Desjardins, 1997; Mazzani *et al.*, 2000; Desjardins, 2006; Desjardins *et al.*, 2008).

Respecto a los medios de cultivo seleccionados, tanto PDA-CL como AVM son adecuados para aislar este tipo hongo de maíz. En el primero de ellos, por tratarse de un medio con un alto contenido de carbohidratos en el cual pueden desarrollarse la mayoría de hongos, se aislaron un gran número de géneros de hongos filamentosos. El segundo medio de cultivo mostró mayor selectividad de crecimiento para hongos del género *Fusarium*, al mismo tiempo que disminuyó la colonización por otros hongos.

El valor medio de los aislados de *Fusarium* spp., en el medio AVM en los tres tipos de maíz es mayor que los aislados en PDA-CL. Esto indica que el medio Verde Malaquita es más adecuado para el aislamiento de hongos pertenecientes al género *Fusarium*, datos que coinciden con los estudios realizados por Castella *et al.* (1997), quienes evaluaron diferentes medios de cultivos para el aislamiento de hongos del género *Fusarium*, llegando a la conclusión que el medio AVM inhibía el crecimiento de otros géneros, favoreciendo el desarrollo del género *Fusarium*.

La identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium*, tanto macroscópica como microscópicamente, empleando claves taxonómicas, es dificultosa, debido fundamentalmente a su alta plasticidad fenotípica, lo que determina que su taxonomía esté en continua revisión (Knutsen *et al.*, 2004). En

este contexto, las técnicas moleculares basadas en el análisis de secuencias de ADN resultan ser rápidas y seguras para la detección e identificación. Además, la amplificación de secuencias específicas mediante PCR es potencialmente más eficaz que cualquier otra técnica microbiológica, no requiriendo la presencia de organismos viables para que se realice con éxito, ni siquiera cuando los volúmenes de la muestra son pequeños (Abd-Elsalam *et al.*, 2003). El único inconveniente de estas técnicas radica en la obtención de iniciadores específicos, así como en el desarrollo de condiciones experimentales apropiadas para el proceso de amplificación (Desjardins, 2006).

En este trabajo, se ha confirmado que la técnica de la PCR, es una herramienta adecuada para la identificación de hongos pertenecientes al género *Fusarium*. En nuestro caso, para la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium*, se han empleado iniciadores que reconocen diversas secuencias de los genes que codifican para el ADN ribosomal, incluyendo las regiones IGS, ITS de los genes 5.8S, 28S y 18S, así como para otras secuencias pertenecientes a los genes que codifican para producción de la proteína calmodulina y los genes *tri5* y *tri6*.

Con los iniciadores ITS-Fu-f y ITS-Fu-r utilizados por Abd- Elsalam, *et al.* (2003) para la identificación del género *Fusarium* se obtuvieron buenos resultados en este estudio: los 377 aislados identificados morfológicamente como pertenecientes a *Fusarium* spp., presentaron el fragmento amplificado esperado, de 389 pb. Lo contrario sucedió con los aislados de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Acremonium*, que se utilizaron en este trabajo como control negativo, lo que demuestra la selectividad del método en la identificación del género *Fusarium*.

En lo referente a la identificación de especies del género *Fusarium*, cada vez son más los estudios basados en el análisis de los ácidos nucleicos cuyo objetivo es la obtención de nuevos iniciadores específicos para *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, por ser especies de un amplio interés como patógenos de cultivos y productores de micotoxinas.

Para la identificación de *F. graminearum*, los iniciadores 217Fg/170Fg, utilizados por Hye-Seon *et al.* (2003), Fgr-F/Fgc-R (Jurado *et al.*, 2005) y FC01F/FC01R (Demeke *et al.*, 2005) cumplen las expectativas en la identificación de esta especie. Cabe anotar que, a pesar de que *F. graminearum* y *F. verticillioides* son las especies que con más frecuencia son aisladas de maíz y están ampliamente extendidas en los países mediterráneos (Cvetnic *et al.*, 2005), la incidencia de *F. graminearum* fue baja en las muestras analizadas, encontrándose un total de 19 aislados, catorce de ellas en maíz almacén y cinco en maíz campo.

*F. graminearum* producen principalmente las toxinas DON, ZEA, NIV, FUS, 3-AcDON, Butenolida, 15-AcDON, y 4- acetilnivalenol. *F. asiaticum*, especie relacionada estrechamente con *F. graminearum*, produce también todas las anteriores, pero especialmente 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON) (Wolf-Hall *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2007). En humanos estas toxinas pueden causar diversas patologías a nivel celular (Trenholm *et al.*, 1989; Anadón *et al.*, 2005).

Para *F. verticillioides* con los iniciadores VER1 y VER2 utilizados por Mulè *et al.*, (2004b), se detectaron un total de 167 aislados (81 aislados de maíz almacén, 16 aislados de maíz campo y 70 aislados de maíz experimental), lo que corresponde a un 44 % de los 377 aislados de *Fusarium* seleccionados. Ésta es la especie que se ha encontrado con mayor frecuencia en las muestras analizadas. Moya *et al.*, (2003), determinan por análisis morfológico que el principal contaminante de los granos en maíz dulce en Chile era la especie *F. verticillioides*, resultado que concuerda con los obtenidos por otros autores en otras variedades de maíz (Marín *et al.*, 1999; Sanchis *et al.*, 2000).

*F. verticillioides*, junto con *F. proliferatum*, son los principales productores de fumonisinas. La presencia de esta toxina en maíz ha sido relacionada en numerosos estudios epidemiológicos con un aumento en la probabilidad de aparición de cáncer del aparato digestivo y de hígado (Marasas *et al.*, 2001; Hinojo *et al.*, 2006).

La identificación de *F. oxysporum* se llevó a cabo utilizando los iniciadores Clox1/Clox2 (Mulè *et al.*, 2004a). El total de aislados detectados fueron nueve, siete en los granos de maíz provenientes del maíz experimental y dos en maíz almacén. Esta especie se reconoce que es la fuente de micotoxinas como wortmanina y ácido fusárico, además de la moniliformina, pero es uno de los principales causantes de enfermedades de tallos en plantas y pudriciones en flores y frutos (Di Pietro *et al.*, 2003; Kosiak *et al.*, 2005).

En este trabajo no se detectaron las especies *F. culmorum* ni *F. sporotrichioides*. La primera especie está asociada como patógeno de gran importancia en cereales, atacando principalmente tallos y semillas. Produce micotoxinas como DON, NIV, ZEA, MON, las cuales están catalogadas como potencialmente tóxicas para humanos y animales. La segunda especie se le asocia principalmente con enfermedades de tallo y raíces en maíz y en granos de cereales en Canadá, Estados Unidos y Europa. Produce micotoxicosis en humanos y animales ya que sintetiza butenolida, fusarina C, moniliformina, escirpentriol, esteroides, zearalenona y T-2 (Leslie and Summerell, 2006; Desjardins, 2006).

Partiendo de la base de que la región ITS se ha propuesto como una herramienta útil para constatar las posibles variabilidades interespecíficas e intraespecíficas fúngicas (Konietzny and Greiner, 2003; Nicolaisen *et al.*, 2005) y para corroborar la eficacia de la PCR, se decidió confirmar la identificación de algunos de estos aislados mediante secuenciación.

En este trabajo se ha podido constatar que la región ITS es apta en la identificación fúngica para especies pertenecientes al género *Fusarium*. Además, es capaz de mostrar diferencias intra e interespecíficas de las especies (Nicolaisen *et al.*, 2005).

Mediante la secuenciación se confirmó la identificación previa por PCR de todos los aislados de *F. verticillioides* analizadas, confirmando la eficacia del ensayo de PCR de Mulé *et al.*, (2004 b) para la identificación de esta especie.

De los aislados identificados previamente por PCR como *F. graminearum*, se secuenciaron 15; de éstos se encontró un aislado atípico, que en la secuenciación fue adscrita a la especie *F. equiseti*. Este aislado no producía ninguna de las micotoxinas estudiadas en este trabajo. En estos momentos se trabaja sobre este aislado para determinar sus características fenotípicas y moleculares.

Mediante el análisis de las matrices de similaridad de nucleótidos, se verificó que los 13 aislados identificados por secuenciación como *F. graminearum* se agrupaban en dos grupos principales: el primero presentaba un nivel de homología entre el 99 y 100% con la cepa *F. graminearum* (linaje 7) NCBI AY188924; el segundo grupo lo constituían otros 6 aislados que podrían pertenecer a la especie *F. asiaticum* (linaje 6) (O'Donnell *et al.*, 2004). Sería necesario realizar un estudio más detallado de estos aislados para su identificación precisa, ya que esta especie es morfológicamente indistinguible de *F. graminearum* (linaje 7) (Zhang *et al.*, 2007) Datos similares fueron encontrados por Carter *et al.*, (2002) en Nepal y Li *et al.*, (2005) en China al trabajar con *F. graminearum*.

También se encontró una elevada heterogeneidad intra-especie en los dos grupos formados dentro el complejo *Fusarium graminearum*, debido posiblemente a pequeños cambios en la composición genómica.

Entre los 14 aislados secuenciados que no pudieron ser identificados con antelación por PCR, se encontraron cuatro aislados de *F. equiseti*, tres en maíz campo y una en maíz experimental. Esta especie en particular es potencialmente productora de toxinas, especialmente tricotecenos como 4-acetilnivalenol (FUS-X), nivalenol, monoacetoxi y diacetoxi- eescirpentriol (MAS y DAS), zearalenona (ZEA), equisetina (EQ), butenolida y fusarocromanona (FURSCHR) (Kosiak *et al.*, 2005). Los otros 10 aislados se identificaron como *F. proliferatum*. Esta especie se ha encontrado en un amplio rango de hospedadores como banana, espárragos, palma, higos, mango, maíz, pino, arroz, sorgo entre otros, causando daños económicamente significativos. A nivel mundial esta especie esta catalogada como

gran colonizador de plantas de maíz y en Europa se asocia además a enfermedades a nivel de las raíces de esta planta (Desjardins, 2006).

Dentro las especies identificadas como *F. proliferatum* y *F. equiseti*, al igual que el caso anterior, encontramos una elevada heterogeneidad. Para *F. verticillioides*, sin embargo, el nivel de homología entre todos los aislados era del 100%, indicando un alto grado de conservación de esta secuencia entre aislados de distintos orígenes (Healy *et al.*, 2005).

La técnica PCR-RFLPs aplicada la región IGS del ADNr mediante su amplificación con los iniciadores CNL12 y CNS1 y su posterior digestión con enzimas de restricción, mostró su eficacia en la diferenciación de aislados del género *Fusarium*, concretamente del complejo *Fusarium graminearum* (Fg) y del complejo *G. fujikuroi*, identificados previamente en base a criterios morfológicos, mediante PCR y algunos de ellos por secuenciación. El tamaño de los fragmentos amplificados de la región IGS de los 96 aislados de *Fusarium* proveniente de las diferentes muestras de maíz osciló entre 2600 y 2700 pb. Este resultado coincide con el trabajo de Hinojo *et al.* (2004), quienes no aprecian una correspondencia entre el tamaño de los amplificados y especies concretas; es decir, el tamaño de los productos de amplificación no permite distinguir entre especies del género *Fusarium*.

Para los 18 aislados identificados como *F. graminearum* esta técnica resultó muy eficaz en la separación de los aislados, distinguiendo un grupo de 11 aislados, dentro del cual quedaban agrupadas las identificadas por secuenciación como *F. graminearum* linaje 7 junto con la cepa de referencia CECT 2150, y un segundo grupo, que incluye los 6 aislados identificadas por secuenciación como posibles *F. asiaticum*. Con esta técnica se vuelve a encontrar que hay diferencias entre estos aislados y cabe la posibilidad de que esta especie se encuentre presente en territorio español. Aislados de *F. asiaticum* fueron encontrados en países como China, Corea, Nepal y Brasil (O'Donnell *et al.*, 2004). Laday *et al.* (2004) encontró dos aislados en Hungría. Se debe tener en cuenta que esta especie tiene un alto potencial toxigénico, produciendo toxinas como deoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol (15-

AcDON), nivalenol y 4-acetilnivalenol, y especialmente 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON) (Zhang *et al.*, 2007).

Respecto a los aislados pertenecientes al complejo *G. fujikuroi*, éstos se dividieron en dos grandes grupos: en un primer grupo quedaban los aislados pertenecientes a *F. verticillioides* (Sacc. Nirenberg) y en otro los aislados pertenecientes a *F. proliferatum*, aunque un aislado perteneciente a la sección *Liseola* quedó totalmente aislada (P.1.P.4-3), probablemente debido a la alta variabilidad intraespecífica de esta sección. Estudios realizados por diferentes autores revelan que cepas del complejo *fujikuroi* son grandes productoras de fumonisinas, de ahí su gran importancia en su identificación en alimentos y especialmente en granos. Un tercer grupo lo formaban aislados de *F. equiseti*, que pertenece al sección *Gibbosum* y son productores de micotoxinas como fusarochromanona (FUSCHR), zearalenona (ZEA) y tricotecenos: 15-monoacetoxi-escirpentriol (MAS), diacetoxi-escirpenol (DAS), T-2 y HT-2, T2-triol, neosolaniol (NEO), deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) and 4-acetilnivalenol (Fus-X) (Kosiak *et al.*, 2005).

La utilización de la región IGS ribosomal, mediante el estudio de RFLPs de las especies en estudio, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. equiseti*, mostró su diversidad genética dentro y fuera de la sección donde están ubicadas. Nuestro estudio muestra que en las poblaciones del género *Fusarium* existe una alta diversidad, encontrándose varios tipos genéticos aun dentro de la misma especie. Estudios en *F. graminearum*, *F. verticillioides* y *F. oxysporum* han mostrado estas mismas conclusiones (Desjardins, 2006; Lalay *et al.*, 2004; Edel *et al.*, 2001).

La última parte de este trabajo se dedicó a la detección de la producción de micotoxinas por los aislados encontrados.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método para el análisis de deoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, fusarenon X, 15-acetildeoxinivalenol y nivalenol, a partir del medio de cultivo sólido donde crece el hongo. Para ello modificamos el método de Bragulat *et al.* (2001) para la extracción de micotoxinas a

partir de medio de cultivo sólido y lo adaptamos al método modificado de Eskola *et al.* (2000) para la detección y cuantificación de tricotecenos por CG-MS.

Los parámetros analíticos del método son satisfactorios; se demuestra un intervalo de linealidad en las concentraciones en las que esperamos encontrar la micotoxina en el medio. El límite de cuantificación se encuentra entre 15 y 23  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para las diversas micotoxinas, lo que es comparable o incluso inferiores a los datos de otros autores (Jestoi, 2004a; Milanez and Valente-Soares, 2006). Para conocer la exactitud del método, el estudio se realizó sobre los porcentajes de recuperación de micotoxina, obteniéndose valores de recuperación entre 79.44 y 100.53 %. La precisión se analizó mediante los valores de las desviaciones estándar relativas, que variaban desde 0.77 a 16.89 %.

Con estos valores consideramos el método como un procedimiento preciso y rápido para evaluar la producción de tricotecenos por especies del género *Fusarium*, utilizando los mismos medios de cultivo sólidos en los que se aíslan e identifican fenotípicamente las cepas de este género, o de los que se puede extraer el micelio para realizar los análisis de biología molecular. Además de todas estas ventajas, representa un ahorro de material y disolventes considerable, al extraerse las micotoxinas de una pequeña cantidad de agar, en contrapartida con los métodos en los que se extraen las micotoxinas de caldo de cultivo líquido.

Con este método, se analizaron 15 aislados de *F. graminearum* y una cepa control (CECT 2150) en tres medios de cultivo (PDA, Czapeck y YES) con extracciones a tres tiempos de incubación: 7, 15 y 21 días. De los 15 aislados, tres no produjeron ningún tipo de tricoteceno y el resto han producido al menos uno en alguna condición. De los resultados obtenidos podemos concluir que el medio donde se han producido más tricotecenos es el medio PDA con incubaciones de 15 y 21 días. En este medio, además, las cantidades producidas por algunos aislados se pueden considerar elevadas, ya que nos encontramos con cantidades de 3033.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de DON y 1619.89  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de 15-AcDON para el aislado V 2.3.5.(2) a los 15 días de incubación.

En los otros dos medios de cultivo, las cantidades de micotoxinas son mucho menores en los pocos aislados que dan positivo en estas condiciones. En el medio Czapeck los aislados que dan positivo lo hacen en mayor número a los 21 días de incubación pero en cantidades muy bajas, de 15.78 µg/kg a 234.31 µg/kg de DON. En el medio YES, sin embargo, son escasas las muestras positivas, con niveles muy bajos y sólo a los 21 días. A pesar de que otros autores utilizan porciones de medio YES crecido a los 14 días para la extracción de micotoxinas (Kosiak *et al.*, 2005), como conclusión de este estudio, nuestro medio de elección para estudiar la producción de tricotecenos por cepas toxigénicas de *Fusarium*, sería PDA a extraer a los 15 y/o 21 días.

En el medio PDA a los 15 días de incubación 11 aislados son positivos para la producción de algún tricoteceno: siete de ellos producen DON con valores desde 56.78 µg/kg hasta 404.32 µg/kg y 15-AcDON con valores desde 62.52 µg/kg hasta 504.55 µg/kg; otros dos aislados producen pequeñas cantidades de 15-AcDON. Y por último dos aislados producen los tres tricotecenos DON, 3-AcDON, 15-AcDON, en cantidades muy superiores (1727.89-3033.04 µg/kg de DON, 1709.23-1619.89 µg/kg de 15-AcDON y 20.55-29.54 µg/kg de 3-AcDON). La cepa de referencia *F. graminearum* (CECT 2150), sólo produce DON 68.31 µg/kg.

A los 21 días de incubación, los dos aislados en los que sólo se detectaba una pequeña cantidad de 15-AcDON a los 7 días, no producen ninguna micotoxina. Como dato relevante, a los 21 días aparecen 8 muestras en las que se detecta 3AcDON: en 3 de ellas se detecta, pero está por debajo del límite de cuantificación; en 5 aislados la cantidad de DON sobrepasa los 1000 µg/kg y también aumentan algunas cantidades de 15-AcDON y 3-AcDON. La cepa de referencia sólo produce DON y una cantidad no cuantificable de 15-AcDON a este tiempo de incubación.

Los resultados obtenidos del análisis de detección y cuantificación de tricotecenos producidos por los aislados de *F. graminearum* estudiados coinciden con el análisis realizado con PCR, que las identificaba como quimiotipos DON, ya que todos los aislados producen DON en alguna condición. Estos resultados difieren de otros trabajos similares, que señalan al quimiotipo NIV como el más prevalente en Europa (Kim *et al.*, 2003; Tóth *et al.* 2008). Trabajos previos realizados por

nuestro grupo de investigación (Cerveró *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2008), corroboran sin embargo que en productos derivados de maíz destinados al consumo humano, se detecta DON con elevada frecuencia, mientras que la presencia de NIV es notablemente inferior.

Las especies de *Fusarium* designadas como pertenecientes al quimiotipo DON se subdividen a su vez en otros dos grupos: quimiotipo DON/3-AcDON si es capaz de formar DON y su 3-acetil derivado, y quimiotipo DON/15-AcDON si puede producir DON y 15-AcDON (Llorens *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos por CG-MS nos conducen a pensar que nuestros aislados pertenecen al quimiotipo DON/15-AcDON, ya que en la mayoría de los análisis de los aislados producen estas dos toxinas. Sin embargo, en algunos casos en el mismo análisis o por separado en distintas condiciones de cultivo, hasta 7 aislados han dado positivo para la detección de 3-AcDON, a la vez que se detecta DON y 15-AcDON. En estos casos las cantidades de 3-AcDON son inferiores a las de los otros tricotecenos. Estos resultados coinciden con los de otros autores que obtienen en la mayoría de los casos las tres micotoxinas (Szécsi *et al.*, 2005, Tóth *et al.*, 2005).

Esto es importante para los consumidores porque en los granos siempre puede haber presencia de algún tricoteceno, los cuales tienen distinto grado de toxicidad, siendo el 15-AcDON más tóxico que el 3-AcDON. Los efectos que producen estas toxinas nos solo son importantes en la salud humana y animal, sino que también juegan un papel importante en la capacidad patógena de *F. graminearum* en cereales (Lori y Rizzo, 2007).

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que algunos de los aislados de *Fusarium* spp., estudiadas tienen un alto potencial de producción de las micotoxinas evaluadas. Muchos estudios han demostrado que las micotoxinas de *Fusarium* spp., están muy distribuidas por la cadena alimentaria de la Comunidad Económica Europea, siendo los productos hechos con cereales, especialmente trigo y maíz, las principales fuentes de ingesta alimentaria de esas toxinas, aunque estas ingestas en la población adulta suelen estar por debajo de la IDT aplicable de la toxina en cuestión. Sin embargo, tratándose de grupos de riesgo como el de los lactantes y el

de los niños pequeños, tales ingestas se acercan o incluso superan, en algunos casos, la IDT (Reglamento (CE) nº 1126/2007).

Con relación a la detección de especies toxigénicas, los métodos tradicionales de detección, que incluyen el crecimiento del hongo en un sustrato y condiciones ambientales adecuadas, extracción de éstas del sustrato con disolventes orgánicos y análisis mediante técnicas cromatográficas, tienen como desventaja el largo tiempo necesario para obtener resultados, así como la alta sofisticación de los procesos de limpieza y/o derivatización (Konietzny and Greiner, 2003). Por otra parte, las técnicas de inmunoensayo, pese a ser más rápidas y sencillas, tienen como inconveniente que se rigen por el concepto "una sustancia un ensayo". Es por ello que la PCR se constituye como una alternativa rápida y precisa para este propósito.

La PCR para detectar cepas toxigénicas se lleva a cabo mediante iniciadores que amplifican parcial o totalmente genes que codifican para la producción de micotoxinas, como Tox5-1/Tox5-2 y ToxP1/ToxP2. El primero de ellos detecta el gen *tri5* implicado en la síntesis de tricotecenos (Fekete *et al.*, 1997; Desjardins, 2006) mientras que el segundo amplifica los genes *tri5* y *tri6*, implicados en la síntesis de tricotecenos como DON y NIV. Aunque la presencia de estos genes no asegura la producción de tricotecenos como DON o NIV, su ausencia imposibilita la producción.

En este trabajo, de los 377 aislados analizados se identificaron 26 aislados potencialmente productoras de tricotecenos. En todos los casos en que se realizó la comprobación por métodos cromatográficos, los aislados en estudio, a excepción de tres, demostraron ser productores de estas micotoxinas.

## VI. CONCLUSIONES

---



## VI. CONCLUSIONES

- Básicamente, la microbiota encontrada en este estudio pertenece a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Geotrichum* y *Fusarium*.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, el maíz con mayor porcentaje de aislados de *Fusarium* spp., respecto a otros hongos es el maíz almacén, seguido del maíz experimental cultivado en parcela de la Universidad Politécnica y por último el maíz campo.
- En el maíz experimental que no ha sido tratado con ningún producto fungicida la totalidad de los granos están contaminados, mientras se disminuye a casi la mitad en el maíz almacén. En el maíz de campo, destinado al consumo humano, se encuentra menor porcentaje de granos contaminados.
- En las Comunidades Autónomas evaluadas se han obtenido valores similares en la contaminación por aislados del género *Fusarium*, sin diferencias significativas excepto entre Madrid y Murcia. En cuanto la contaminación por otros géneros, sí existen diferencias significativas entre los distintos orígenes geográficos.
- Respecto a los medios de cultivo utilizados en los análisis, tanto PDA-CL como AVM son adecuados para aislar este tipo hongo de maíz aunque el medio AVM mostró mayor selectividad para el género *Fusarium*.
- En todos los tipos de maíz analizados, la especie de *Fusarium* más prevalente es *F. verticillioides*.
- Se ha confirmado que la técnica de la PCR, es una herramienta adecuada para la identificación de hongos como *Fusarium* spp., *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

- Mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8S–ITS2 de los aislados de *Fusarium spp.*, seleccionados, se confirmó la identificación previa por PCR de aislados de *F. verticillioides* y *F. graminearum* y se identificaron aislados de *F. proliferatum* y *F. equiseti*. Se comprueba que la región ITS es apta en la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium*.
- Este estudio muestra que en las poblaciones de *Fusarium spp.*, existe una alta diversidad, encontrándose varios tipos genéticos aun dentro de la misma especie. La utilización de la región IGS ribosomal, mediante el estudio de RFLPs de las especies analizadas, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. equiseti*, mostró su diversidad genética dentro y fuera de la sección donde están ubicadas.
- El método para el análisis de tricotecenos a partir del medio de cultivo sólido desarrollado en nuestro laboratorio es un procedimiento preciso y rápido para evaluar la producción de tricotecenos por especies del género *Fusarium*. El medio de elección sería PDA, a extraer a los 15 y/o 21 días.
- Algunos de los aislados de *Fusarium spp.*, estudiados tienen un alto potencial de producción de las micotoxinas evaluadas. Los resultados obtenidos por CG-MS conducen a pensar que los aislados de *F. graminearum* analizados pertenecen al quimiotipo DON/15-AcDON, aunque también producen pequeñas cantidades de 3-AcDON.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---



- Abd-El Salam, K.A.; Aly, I.N.; Abdel-Satar, M.A.; Khalil, M.S.; Verreet, J.A.** 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr. J. Microbiol.*, Vol., 2 (4), p 82-85.
- Abdel-Satar, M.A.; Khalil, M.S.; Mohmed, I.N.; Abd-El Salam, K.A., and Verreet, J.A.** 2003. Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *Afr. J. Biotechnol.*, Vol., 2 (3), p. 51-55.
- Abid-Essefi, S.; Ouanes, Z.; Hassen, W.; Baudrimont, I.; Creppy, E.; Bacha, H.** 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein synthesis and oxidative damage in cultures cells exposed to zearelenona. *Toxicol. In Vitro.*, Vol., 18 (4), p 467-474.
- Ahrazem, O.; Prieto, A.; Gimenez-Abián, M.I.; Leal, J.A., Jimenez-Barbero, J., and Bernabe, M.** 2006. Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of three strains of *P. cucumerina* and *Verticilium spp.* *Carbohydr Res.*, Vol., 341, p 246-252.
- Aldred, D., and Magan, N.** 2004. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicol. Lett.* Vol., 153 (1), p 165-171.
- Alexander, N.; Hohn T. M.; McCormick, S.P.** 1998. The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 mono-oxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.*, Vol., 64, p 221-225.
- Al-Julaifi, M.Z.; Al-Falih, A.M.** 2001. Detection of Trichothecenes in Animal Feeds and Foodstuffs during the Years 1997 to 2000 in Saudi Arabia. *J. Food Prot.*, Vol., 64 (10), p 1603 –1606.
- Alonso D.A.J; González M.J.R; Rejas L.J.** 2002. *Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria*. León: Universidad de León, p. 66-81.
- Anadón, A.; Céspedes, A.; Caballero, V.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Martínez, M.A.** 2005. Micotoxinas de mayor impacto en la producción porcina e implicaciones para la salud pública. <http://www.avancesentecnologiaporcina.com>. Vol., 2 (5), p 33-60.
- Anderson, J.B., and Stasovski, E.** 1992. Molecular phylogeny of northern-hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*, Vol., 84, p 505- 516.
- Aoki, T., and O'Donnell, K.** 1999. Morphological characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *Fusarium graminearum*. *Mycologia* . Vol., 91, p 597–609.
- Baayen, R.P.; O'Donnell, K.; Bonants, P.J. M.; Cigelnik, E.; Kroon, L. O. N. M.; Roebroeck, E. J. A., and Waalwijk, C.** 2000. Gene Genealogies and AFLP Analyses in the *Fusarium oxysporum* Complex Identify Monophyletic and Nonmonophyletic Formae Speciales Causing Wilt and Rot Disease. *Phytopathology.*, Vol., 90 (8), p 891-900.
- Bago, B.; Bentivenga, S. P.; Brenac, V, Dodd, J. C.; Piche, Y., and Simon, L.** 1998. Molecular analysis of *Gigaspora* (Glomales, Gigasporaceae). *New Phytol.*, Vol., 139, p 581-588.
- Baird, R.; Abbas, H.K.; Windham, G.; Williams, P.; Baird, S.; Ma P.; Kelley, R.; Hawkins, L., and Scruggs, M.** 2008. Identification of Select Fumonisin Forming *Fusarium* Species Using PCR Applications of the Polyketide Synthase Gene and its Relationship to Fumonisin Production in vitro. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol 9, p 554-570.
- Bakan, B.; Giraud-Delville, C.; Pilson, L.; Richard-Molard, D.; Fournier, E., and Brygoo, Y.** 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol., 68 (11), p 5472-5479.
- Baldauf, S.L.** 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics* Vol., 19 No. 6. p 345-351.
- Baldwin, B.G.** 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear

ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogen. Evol.*, Vol.,1, p 3-16.

**Baldwin, B.G.; Sanderson, M.J.; Porter, J.M.; Wojciechowski, M.F.; Campbell, C.S.; and Donoghue, M.J.** 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, Vol., 82, p 247-277.

**Basandrai, A.K., and Singh, A.** 2002. Fungal diseases of maize. In: Diseases of Field Crops. edited by V.K. Gupta and Y.S. Paul. New Delhi, Indus, p 464.

**Baum, D.A., and Donoghue, J.** 1995. Choosing among alternative "phylogenetic" species concepts. *Syst. Bot.*, Vol., 20, p 560–573.

**Beasley, V.R.** (ed.). 1989. Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects, Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida.

**Bellí, N; Ramos, A.J.; Coronas, I.; Sanchis, V.; Marín, S.** 2005. Aspergillus carbonarius growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factor. *J. Apl. Microbiol.* Vol., 98, p 839-844.

**Benítez, T.; Moreno-Mateos, M.A.; Rincón, A.M<sup>a</sup>. y Codón, A.C.** 2006. Características de levaduras y hongos filamentosos de interés en agroalimentación. ¿Adaptación al ambiente?. *Sociedad española de microbiología. SEM.* No. 41, p 17-27.

**Bennett, J.W., and Klich, M.** 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol., Rev.* Vol.,16 (3), p 497-516.

**Berek, L.; Petri, I.B.; Mesterházy, A.; Téren, J.; Molnár, J.** 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol. In Vitro.* Vol., 15, p 25-30.

**Betina, V.** 1989. Trichothecenes,. In Bioactive molecules, Vol. 9. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Elsevier Science Publishing, Inc., New York. p. 192–241.

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

**Blaney, B.J.; Moore, C.J.; Tyler, A.L.** 1984. Mycotoxins and Fungal Damage in Maize Harvested during 1982 in Far North Queensland. *Aust. J. Agric. Res.*, Vol., 35, p 463-471.

**Bluhm, B.H.; Flaherty, J.E.; Cousin, M.A. and Woloshuk, C.P.** 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *J. Food Prot.*, Vol., 65, p1955– 1961.

**Booth, C.** 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic, and taxonomic aspects. En The Applied mycology of *Fusarium*, . Edited by Moss, M.O. and Smith, J.E.: Press Syndicate of the University of Cambridge. p 1-13.

**Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Cabañes, F.J.** 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International J. Food Microbiol.* Vol 71. p 139-144.

**Bretz, M.; Beyer, M.; Cramer, B.; Humpf, H-U.** 2005. Synthesis of stable isotope labeled 3-acetyldeoxynivalenol. *Mol. Nutr. Food Res.*, Vol., 49, p 1151-1153.

**Brown, D.W.; MacCormick, S.P.; Alexander, N.J.; Proctor, R.H and Desjardins, A.E.** 2001. A genomic and biochemical approach to trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.*, Vol., 32, p121-133.

**Brown, D.W.; MacCormick, S.P.; Alexander, N.J.; Proctor, R.H and Desjardins, A.E.** 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.*, Vol., 36, p 224-233.

- Burgess, L.W.; Summerell, B.A.; Bullock, S.; Gott, K.P.; Backhouse, D.** 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Sydney, Australia: University of Sydney.
- Cantalejo, M.J.** 1995. Contaminación de piensos y semillas por hongos toxigénicos. Incidencia de *Fusarium* productores de fusarina C. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. p 215.
- Carlile, M.J., and Watkinson. S.C.** 1994. *The fungi*. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
- Carrillo, L.** 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. p. 70-80. [http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/07h\\_textoalternariapdf](http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/07h_textoalternariapdf). (22/02/05).
- Carter, J.P.; Rezanoor, H.N; Holden, D.; Desjardins, A.E.; Plattner. R.D. and Nicholson, P.** 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol.,108, p 573–583.
- Castillo, M.A., Montes, R.; Navarro, A.; Segarra, R., Cuesta, G., and Hernández, E.** 2008. Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *J. Food Compos. Anal.* Vol., 21, p 423-427
- Castella, G.; Bragulat, M.R.; Rubiales, M.V.; Cabañes, F.J.** 1997. Development of a selective culture medium for *Fusarium moniliforme*. *Microbiol.* Vol., 13 (4), p 493-498.
- Catalá, P y Soriano, J.M.** 2007. Otras micotoxinas. En *Micotoxinas en alimentos*. Cord. Soriano del Castillo, J. M. Ediciones Díaz de Santos. España. p 396.
- Cerveró, M.C.; Castillo, M.A.; Montes, R. and Hernández, E.** 2007. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Rev. Iberoam. Micol.* Vol., 24, p 52-55.
- Chandler, E.A.; Simpson, D.R.; Martha, A.; Thomsett, M.A., and Nicholson, P.** 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, Vol., 62 (6), p 355-367.
- Choi, Y., and Shim, W.** 2008. Functional characterization of *Fusarium verticillioides* *CPP1*, a gene encoding a putative protein phosphatase 2A catalytic subunit. *Microbiology.*, Vol., 154., p 326-336.
- Cirillo, T.; Ritieni A.; Galvano, F.; Amodio-Cocchieri, R.** 2003a. Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. *Food Addit. Contam.*, Vol., 20 (6), p 566-571.
- Cirillo, T.; Ritieni, A.; Visone, M., and Amodio-Cocchieri, R.** 2003b. Evaluation of Conventional and Organic Italian Foodstuffs for Deoxynivalenol and Fumonisins B1 and B2. *J. Agric. Food Chem.*, Vol., 51 (27), p 8128 -8131.
- Cossette, B.; Smoragiewicz, W.; Boutard, A.; Bouchard, G.** 1992. La Détection des Mycotoxines Trichothécènes. *Travail et Santé*, Vol., 8 (1), p 2-6.
- Costa, J.** 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, Vol., 22 (5). p 299-305.
- Covarelli, L.; Turner, A.S.; Nicholson, P.** 2004. Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of *Tri* genes in *Fusarium culmorum* by fungicides in vitro. *Plant Pathol.*, Vol., 53, p 22–28.
- Crous, P.W.** 2005. Impact of molecular phylogenetics on the taxonomy and diagnostics of fungi. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. Vol., 35 p 47–51
- Cultek.** 2007. PCR en tiempo real. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/>
- Cvetnic, Z.; Pepeljnjak, S.; Segvic, M.** 2004. Toxigenic potential of *Fusarium*

species isolated from non-harvested maize. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, Vol.,56, p. 275-280.

**Davis, J.I.** 1995. Species concepts and phylogenetic analysis. Introduction. *Syst. Bot.*, Vol.,20 p 555–559.

**de Hoog, G.S., and Gerrits, van den Ende A.H.** 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses*, Vol., 41, p 183–189.

**de Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gené, J. and Figueras, M.J.** 2000. Atlas of clinical fungi., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. p 1126.

**De las Heras, G. A.** 2004. Caracterización de genes de poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* y su análisis en sistemas heterólogos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Genética. p 175.

**Deak, T., and Beuchat, L.R.** 1996. Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton, Fla. p 199.

**Demain, A.** 1996. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In Sutton, B. C. (Edit.). A Century of Mycology. Cambridge University Press, ISBN: 0521570565. p 402.

**Demeke, T.; Clear, R. M.; Patrick, S. K.; Gaba, D.** 2005. Species – specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int. J. food Microbiol.*, Vol.,103, p 271-284.

**Desjardins, A.E.; Hohn, T.M., and McCormick, S.** 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.*, Vol., 57, No.3 p 595-604

**Desjardins, A.E.; Proctor, R.H.; McCormick, S.P.; Shaner, G.; Buechley, G.; Hohn, T.M.** 1996. Reduced virulence of trichothecenes nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field test. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Vol., 9, p 775 -781

**Desjardins, A.** 2006. *Fusarium*. Micotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. U.S.A. p 260.

**Desjardins, A.; Busman, M.; Manandhar, G.; Jarosz, A.M.; Manandhar, H.K., and Proctor, R.** 2008. *Gibberella* ear rot of maize (*Zea mays*) in Nepal: Distribution of the mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol in naturally and experimentally infected maize. *J. Agric. Food Chem.* 10.1021/jf8003702.

**Di Pietro, A.; Madrid, M.P.; Caracuel, Z.; Delgado-Jarana, J., and Roncero, M.I.G.** 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt pathogen. *Mol. Plant Pathol.*, Vol., 4, p 315–325.

**Diekman, M.A.; Green, M.L.** 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.*, Vol., 70, p. 1615-1627.

**D'Mello, J.P.F.; Placinta, C.M., and Macdonald, A.M.C.** 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Vol.,80, p 183-205.

**Doi, K.; Shinozuka, J., and Sehata, S.** 2006. T-2 Toxin and apoptosis. *J Toxicol Pathol.*, Vol., 19 p 15-27.

**Doohan, F.M.; Brennan, J., and Cooke, B.M.** 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol., 109, p 755–768.

**Edel, V.; Steinberg, C.; Gautheron, N.; Recorbet, G.; Alabouvette, C.** 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiol. Ecol.*, Vol., 36, p 61– 71.

- Edel, V.; Steinberg, C.; Gautheron, N., and Alabouvette, C.** 1996. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycol. Res.*, Vol., 101 (2), p 179-187.
- Edwards, S.G.** 2004. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicol. Lett.*, Vol., 153 (1), p 29-35.
- Ehling, G.; Cockburn, A.; Snowdon, P., and Buschhaus, H.** 1997. The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health. *Cereal Research Communications*. Vol.,25, p 443–447.
- Ehrlich, K.C., and Daigle, K.W.** 1987. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12, 13-epoxytrichothecenes. *Biochem. Biophys. Acta.*, Vol., 923, p 206-213
- Eriksen, G.S., and Pettersson, H.** 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Vol.,114, p 205-239.
- Eriksen, G.S.; Pettersson, H., and Lundh, T.** 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.*, Vol., 42 (4), p 619-24.
- Eriksen, G.S., and Alexander, J.** 1998. *Fusarium* toxins in cereals - a risk assessment. Nordic Council of ministers; Tema Nord 1998:502. Store Strandstraede 18, DK01255 Copenhagen. K Denmark In: Summerell, B. A.; Leslie, J.F.; Backhouse, D.; Bryden, W.L.; Burges, L.W. 2001: *Fusarium-* Paul E. Nelson. Memorial symposium. APS pres, St Paul, Minnesota, S. p 332-356.
- European Commission.** 2000. Health & Consumer Protection Directorate General. Opinion Of The Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins .part 2<sup>a</sup>: ZEARALENONE (ZEA) p 12.
- European Commission.** 1999. Evaluating socio-economic programmes: glossary of 300 concepts and technical terms, Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
- European Mycotoxin Awareness Network:** <http://www.mycotoxins.org>
- Eskola, M; Boonzaaijer, G.; van Osenbruggen, W.A., Rizzo, A., and tijmensen, G.** 2000. A study of the suitability of gas chromatography-electron capture detection for the analysis of deoxinivalenol in cereals. *Mycotoxin Research.*, Vol., 16, p 73-90.
- Feinberg, B., and McLaughlin, C.S.** 1989. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins, p. 27–35. In V. R. Beasley (ed.), *Trichothecene mycotoxicoses: pathophysiologic effects*, Vol., I. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Fekete, C.; Logrieco, A.; Giczey, G., and Hornok, L.** 1997. Screening of fungi for the presence of the trichodiene synthase encoding sequence by hybridization to the *Tr5* gene cloned from *Fusarium poae*, *Mycopathologia*. Vol., 138. p. 91–97.
- Ferrer, C.; Colom, F.; Frasés, S.; Mulet, E.; Abad, J.I., and Alio J.I.** 2001. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections *J. Clinical Microbiology.*, Vol., 39, No. 8. p 2873–2879.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogeny: an appropriate use of the bootstrap. *Evolution*. Vol., 39, p 783-791.
- Fitch, W.M.** 2000. Homology: a personal view on some of the problems. *TIG*. Vol.,16, No. 5, p 227- 231.
- Forsell, J.H., and Pestka, J.J.** 1985. Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. *Appl Environ Microbiol.*, Vol., 50, p 1304-7.
- Freese, L.; Friedrich R.; Kendall, D., and Tanner, S.** 2000. Variability of

deoxinivalenol measurements in barley, J. AOAC Intl. Vol., 83, p 1259-1263.

**Frisvad, J.C.; Thrane, U., and Filtenborg, O.** 1999. Role and use of secondary metabolites in fungal taxonomy. In: Chemical Fungal Taxonomy, edited by. Frisvad J.C, Bridge P.D., and Arora D.K., New York; p 398.

**Gámiz, I.** 2006. Estudio de la presencia de tricotecenos tipo B en cereales para desayuno mediante análisis por cromatografía de gases con detector de masas. Trabajo fin de carrera. Universidad Politécnica de Valencia. p 91.

**Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G.** 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, Vol., 12, p 1247–1251.

**Gelderblom, W.C.A.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Horak, M.J.; Vleggar, R., and Kriek, N.P.J.** 1988. Fumonisin - Novel mycotoxins whit cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environ. Microbiol.*, Vol., 54 p 1806-1811.

**Gibson, J.R.; Ferrús, M.A.; Woodward, D.; Xerry, J., and Owen, R.J.** 1999. Genetic diversity in *Helicobacter pullorum* from human and poultry sources identified by an amplified fragment length polymorphism technique and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, Vol., 87, p 602-610.

**Gibson, J.R.; Slater, E.; Xerry, J.; Tompkins, D.S., and Owen, R.J.** 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.*, Vol., 36, p 2580-2585.

**Gilbert, J.** 1993. Recent advances in analytical methods for mycotoxins. *Food Addit. Contam.* Vol., 10 (1), p 37-48.

**Gimeno, A., and Martins, M.L.** 2006. "Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans". Special Nutrients, Inc. USA

(Ed.). Printed by: Victor Mireles Communications, Mexico City, Mexico. p 1-127.

**Gledhill, K.R.; Randall, M.J.; Chadwick, M.** 1991. The EARSS digital seismograph: system description and field trials. Bulletin of the Seismological Society of America., Vol., 81, p 1380-1390.

**Gómez, E.D.; Cuesta, G.; Montes R.M. and Hernández, E.** 2006. "Identification by PCR of trichothecene-producing *Fusarium*" Modern Multidisciplinary Applied Microbiology. (Ed.). Antonio Mendez-Vilas.

**González, A.** 2005. Técnicas genotípicas aplicadas al estudio de Campilobacterias patógenas de interés en seguridad alimentaria. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. p 185.

**González-Salgado A., Patiño Belen, Vázquez C., González- Jaen M.T.** 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol.,245, p 353-361.

**Gürtler, V., and Mayall, B.C.** 2001. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol., 51, p 3–16.

**Hatsch, D.; Phalip, V.; Jeltsch, J.M.** 2004. Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. *Res. Microbiol.*, Vol., 155, p 290–296.

**Hausner, G.; Inglis, G.D.; Yanke, L.J.; Kawchuk, L.M., and McAllister, T.A.** 2000. Analysis of restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA of a selection of anaerobic chytrids. *Can. J. Bot.*, Vol., 78, p 917–927.

**Hazel, C.M., and Patel, S.** 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.*, Vol., 153 (1), p 51–59.

**Heard, G.M., and Fleet, G.H.**1990. A convenient microtitre tray procedure for

yeast identification. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol., 68 (5), p 447-51.

**Hernández, E.J.** 2005. Caracterización molecular de especies del género *Malassezia*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

**Hinojo, M.J.; Medina, A.; Valle-Algarra, F.M.; Gimeno-Adelantado, J.V.; Jiménez, M., and Mateo, R.** 2006. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using and optimized analytical method. *Food Microbiol.*, Vol., 23, p 119-127.

**Hinojo, M.J.; Llorens, A.; Mateo, R.; Patiño, B.; González-Jaén, M.T.; Jiménez, M.** 2004. Utility of the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms of the Intergenic Spacer Region of the rDNA for Characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol., 27, p 681-688.

**Hinojo-Biel, M.J.** 1999. Influencia de las condiciones de cultivo en la biosíntesis de fumonisinas B1 y B2 por aislados de *Fusarium moliniforme* Sheldon (*F. verticilloides* Nirenberg). Memoria de licenciatura. Universidad de Valencia.

**Hohn, T.M.; Desjardins, A.E., and McCormick, S.P.** 1995, The tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, Vol., 248, p 95–102.

**Healy, M.; Reece, K.; Walton, D.; Huong, J.; Frye, S.; Raad, I.I., and Kontoyiannis D.P.** 2005. Use of the DiversiLab System for Species and Strain Differentiation of *Fusarium* Species Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, Vol., 43. No. 10. p 5278–5280.

**He-ping, L.; Ai-Bo, W.; Chun-Sen, Z.; Scholten, O.; Löffler, H.; Yu-Cai, L.** 2005 Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol an nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol., 243, p 505-511.

**Hollinger, K.** 1999. Mycotoxicosis in food producing animals. Veterinary clinics of North America: *Food anim. Pract.*, Vol., 15 (1), p 133-165.

**Hughes, D. M.; Gahl, M.J; Graham, C.H. and Grieb, S.L.** 1999. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *J. Anim. Sci.*, Vol., 77, p 693-700

**Hussein, H.S.; Brasel, J.M.** 2001. Toxicity, metabolism and impact of micotoxins on humans and animals. *Toxicology*, Vol., 167, p 101-134.

**Hye- Seon, K.; Lee, T.; Dawlatana, M.; Sung-Hwan, Y., and Lee, Y.** 2003. Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol and nivalenol –producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycol. Res.*, Vol., 107 (2), p 190-197.

**IARC,** 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.* Lyon, France, Vol., 56 p 397-433.

**Jacobson, D.J. and Gordon, T.R.** 1990. Variability of mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of *Fusarium oxysporum* f sp melonis. *Mycol. Res.*, Vol., 94 (6), p 734-744.

**JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.** 2001b. T-2 AND HT-2 TOXINS. WHO Food Additives Series 47, Fifty-sixth meeting, Geneva, 6-15, p 1-33.

**JECFA: Joint FAO/WHO expert committee on food additives.** 2001a: Fifty-sixth meeting. Summary and conclusions. Genf, 6-15. Februar

**Jennings, P.; Coates, M.E.; Alsh, K.; Turner, J.A.; and Nicholson, P.** 2004.

Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathol.* 53, p 643-652.

**Jestoi, M.** 2005. Emerging fusarium-mycotoxins in finland. Academic dissertation. National Veterinary and Food Research Institute (EELA), Department of Chemistry and Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku. p 123.

**Jestoi, M.; Ritieni, A., and Rizzo, A.** 2004a. Analysis of the *Fusarium* Mycotoxins Fusaproliferin and Trichothecenes in Grains Using Gas chromatography-Mass Spectrometry. *J.Agric. Food Chem.* Vol 52 p 1464-1469.

**Jestoi, M.; Rokka, M.; Yli-Mattila, T.; Parikka, P.; Rizzo, A., and Peltonen, K.** 2004b. Presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in finnish grain samples. *Food Addit. Contam.*, Vol., 21, p 794 – 802.

**Jiménez, M.; Valle-Algarra, F.M.; Medina, A.; Llorens, A.; Gimeno-Adelantado, J.V. and Mateo, R.** 2005. Tricotenos de tipo B y hongos productores en cereales. XX Congreso Nacional de Microbiología Cáceres: Control del riesgo por micotoxinas en alimentos. p. 147-153.

**Josephs, R.D.; Koeber, R.; Bernreuther, A.; Linsinger, T.P.J. and Schimmel, H.** 2004. Development of certified reference materials for mycotoxins. In: Barug, D.; Van Egmond, H.P.; López G.R., Van Osenbruggen, W.A. & Visconti, A. Meeting the mycotoxin menace. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, p 237-254.

**Jurado, M.; Vázquez, C.; Patiño, B. and González-Jaén, M.T.** 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol., 28, p 562-568.

**Jurgenson, J.E.; Bowden, R.L.; Zeller, K.A.; Leslie, J.F.; Alexander, N.J.; Plattner, R.D.** 2002. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Genetics*, Vol., 160, p 1451–1460.

**Jurjevic, Z.; Wilson, D.M.; Wilson, J P.; Geiser, D.M.; Juba, J.H.; Mubatanhema, W.; Widstrom, N.W., and Rains, G.C.** 2005. *Fusarium* species of the *Gibberella fujikuroi* complex and fumonisin contamination of pearl millet and corn in Georgia, USA. *Mycopathologia.* 2005. Vol.,159, p 401-406.

**Kim, H-S.; Lee , T.; Dawlatana, M.; Sung-Hwan, Y., and Lee, Y.** 2003. Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol and nivalenol –producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycol. Res.*, Vol., 107 (2), p 190-197.

**Kim, H.J.; Choi, Y.K., and Min, B.R.** 2001. Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae specialis. *J. Microbiol.*, Vol., 39, No. 4, p 265-272.

**Knutsen, A.K.; Torp, M., and Holst-Jensen, A.** 2004. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 95, p 287–295.

**Kock, J.L., and Botha, A.** 1999. Fatty acids in ungal taxonomy. In: Chemical Fungal Taxonomy, edited by. Frisvad J.C, Bridge P.D., and Arora D.K., New York; p 398.

**Konietzny, U. and Greiner, R.** 2003. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi un foods. *Braz. J. Microbiol.*, Vol., 34, p 283-300

**Konstantinova, P. and Yli-Mattila, T.** 2004. IGS–RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides*

and *Fusarium kyushuense*. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.,95, p 321– 331.

**Kosiak, E.B.; Holst-Jensen, A.; Rundberget, T.; Gonzalez- Jaen, M.T., and Torp, M.** 2005 Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 99, p 195-206.

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

**Krska, R.; Baumgartner, S., and Joseph, R.** 2001. The state of the art in the analysis of type A and B trichothecene mycotoxins in cereals. Fresenius. *J. Anal. Chem.*, Vol., 371, p 285-299.

**Kuiper-Goodman, T.** 1994. Prevention of human mycotoxicosis through risk assessment and risk management. Miller, J.D; Trenholm H.L. En: *Mycotoxins in grain*. Eagan Press, St Paul, MN. p 439-470.

**Kurtzman, C.P., and Robnett, C. J.** 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 59 end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, Vol., 35 p 1216–1223.

**Láday, M.; Juhász, Á; Mulè, G.; Moretti, A., Á. Szécsi., and Logrieco, A.** 2004. Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol., 110., p545–550.

**Lacey, J., and Magan, N.** 1991. Fungi in cereals grains: their occurrence and water and temperature relationships. Chelkowski J. (Eds.). In: *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Elsevier, Amsterdam. Vol., 5, p 77-118.

**Langseth, W., and Rundberget, T.** 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other

trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia.*, Vol., 147, p 157-165

**Lanoiselet, V.M.; Cother, E.J.; Cother, N.J.; Ash, G.J.; Harper, J.D.I.** 2005. Comparison of two total cellular fatty acid analysis protocols to differentiate *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *Mycologia*, Vol., 97 (1), p 77–83.

**Larsen, J.C; Hunt, J; Perrin, I., and Ruckebauer, P.** 2004. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicol. Lett.*, Vol., 153, p 1–22.

**Latorre, B.** 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. 6ª ed. ampliada. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. p 638.

**Lauren, D.R.; Smith, W.A.** 2001. Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Addit. Contam.*, Vol., 18 (11), p 1011-1016.

**Laval, R.E.** 2004. Nota historica. Sobre las epidemias del fuego de San Antonio. *Revista Chilena de Infectología*. Vol., 21 (1), p 74-76

**Lee, T.; Han, Y.K.; Kim, K.H.; Yun, S.H, and Lee, Y-W.** 2002. Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol and Nivalenol producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 68, p 2148-2154.

**Lee, T.; Oh, D.W; Kim, H.S.; Lee, J.; Kim, Y.H.; Yun, S.H., and Lee, Y.W.** 2001. Identification of Deoxynivalenol and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae* by Using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 67, p 2966-2972.

**Leslie, J.F.** 2008. Agroecology and Biotechnology of Stalk Rot Pathogens of Sorghum and Millet. Sustainable *Plant Protection Systems*. Project KSU 210.Kansas State University p 1-22

- Leslie, J.F. and Summerell, B.A.** 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell publishing. p 369.
- Li, S.; Tam, Y.K., and Hartman, G.L.** 2000. Molecular differentiation of *Fusarium solani* f. sp. glycines from other *F. solani* based on mitochondrial small subunit rDNA sequences. *Phytopathology*, Vol., 90, p 491–497.
- Li, H.P.; Wu, A.B; Zao, Ch.S; Scholten, O.; Löffler, H., and Liao, Y.C.** 2005. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol-and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett*, Vol., 243, p 505-511.
- Luque, J. y Herráez, A.** 2002. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Ed. Elsevier España. p 469.
- Llorens, A.; Hinojo, M.J.; Mateo, R.; González-Jaén, M.T.; Valle-Algarra, F.M.; Logrieco, A., and Jiménez, M.** 2006. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 106 (3), p 297-306.
- Llorens, A.; Hinojo, M.J.; Mateo, R.; Medina, A.; Valle-Algarra, F.M.; González-Jaén, M.T. and Jiménez, M.** 2006. Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS-rRNA region. *Antonie van Leeuwenhoek.*, Vol., 89, p 465-478.
- Llorens, A.; Mateo, R.; Hinojo, M.J.; Logrieco, A., and Jiménez, M.** 2004 Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol., 27 (3), p 253-260.
- Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mulé, G.; Moretti, A., and Perrone, G.** 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol., 109, p 645-667.
- Logrieco, A.; Mulé, G.; Moretti, A. and Bottalico, A.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol., 108, p 597-609.
- Lori, G.A., y Rizzo, I.** 2007. Deoxinivalenol. En *Micotoxinas en alimentos*. Cord. Soriano del Castillo, J. M. Ediciones Díaz de Santos. España. p 396.
- Ludwig, W., and Klenk, H.P.** 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic frame work for prokaryotic systematics. In: Boone, D.R., Castelholtz, R. W., Garrity, G.M. (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2 nd edn. Springer-Verlag, New York, p 49-65.
- Lugauskas, A.** 2005. Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin. *Botanica Lithuanica*, Suppl. Vol.,7. p 3–16.
- Lysøe, E.; Klemsdal, S.S.; Bone, K.R.; Frandsen, R.J.N.; Johansen, T.; Thrane, U., and Giese, H.** 2006. The PKS4 Gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 72 (6) p 3924–3932.
- Madan, R.; Pankhurst, C.; Hawke, B.; Smith, S.** 2002. Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. *Soil Biol. Biochem.*, Vol., 34 (1), p. 125-128.
- Madhyastha, S.M.; Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A.; Platord- Abramson, G.D.** 1990. Effect of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agric. Food Chem.*, Vol., 38, p 1506-1510.
- Magan, N., and Lacey, J.** 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Trans. British. Mycol. Soc.* Vol., 82 p 71-81.
- Marasas, W.F.O.** 2001. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A

Historical Perspective. *Environ. Health Perspect.*, Vol., 109, Supplement 2, p. 239-243.

**Marasas, W.F.O., and Nelson, P.E.** 1987. *Mycotoxigenology: Introduction to the Mycology, plant Pathology, Chemistry, Toxicology and Pathology of naturally occurring Mycotoxicoses in animals and man.* Pennsylvania State Univ. Press, University Park.

**Marasas, W.F.O.; Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.** 1984. *Toxigenic Fusarium Species.* Pennsylvania State Univ. Press, University Park.

**Marín, S.; Albareda, X.; Ramos, A.J.; Sanchos, V.** 2001. Impact of environmental and interactions of *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *J. Sci. Food Agric.*, Vol., 81 p 1060-1068.

**Marín, S.; Magan, N.; Serra, J.; Ramos, A.J.; Canela, R., and Sanchis, V.** 1999. Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *J Food Sci.*, Vol., 64, p 921–924.

**Marín, S.; Magan, N.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.** 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *J. Food Prot.*, Vol., 67, p1792-1805.

**Martorell, G. P.** 2006. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de Alimentos. Tesis doctoral. Universitat de Valencia.

**Mateo, J.J.; Mateo, R.; Jiménez, M.** 2002. Accumulation of type a trichothecenes in corn, wheat and rice by five *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 72, p 115-123

**Mazzani, C.; Borges, O.; Luzón, O.; Barrientos, V. y P. Quijada.** 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y

*Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el Estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* Vol., 17 p 185-195.

**McCormick, P.S.; Alexander, J.N., and Proctor, H.R.** 2006. Heterologous expression of trichothecene P450 genes in *F. verticilloides*. *Can. J. Microbiol.*, Vol., 52, p 220-226.

**McCormick, S.P.; Hohn, T.M.; Desjardins, A. E.** 1996, Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol., 62, p 353–359.

**McCormick, S.P., and Alexander, N. J.** 2002. *Fusarium* Tri8 encodes a trichothecene C-3 esterase. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 68, p 2959-2964

**McCormick, S.P.; Alexander, N.J.; Trapp, S.E.; Hohn, T.M.** 1999. Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 65, p 5252–5256.

**Mesterhazy, A.; Bartok, T.; Mirocha, C.M., and Komoroczy, R.** 1999. Nature of resistance of wheat to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination and their consequences for breeding. *Plant Breed./Z. Pflanzenzucht.*, Vol., 118, p 97–110.

**Minervini, F., Dell'Aquila, M.E., Maritato, F., Minoia, P., and Visconti, A.** 2001. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 $\beta$ -estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol. In Vitro.*, Vol., 15, (4-5), p 489-495.

**Milanez, T.V., and Valenta-Soarez, L.M.** 2006. Gas Chromatography-Mass Spectrometry determination of trichothecene mycotoxins in commercial corn harvested in the State of Sao Paulo, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* Vol., 17 (2), p 412-416

**Mirhendi, S.H.; Kordbacheh, P.; Kazemi, B.; Samiei, S.; Pezeshki, M.; Khorramizadeh, M.R.** 2001. A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani*. *Iranian J. Publ. Health*, Vol., 30, Nos. 3-4, p. 103-106.

**Mishra, P.K.; Fox, R.T.V., and Culham, A.** 2002. Restriction analysis of PCR amplified nrDNA regions revealed intraspecific variation within populations of *Fusarium culmorum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol., 215 (2), p 291-296.

**Möeller, E.M.; Chelkowski, J., and Geiger, H.H.** 1999. Species – specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot. *J. Phytopathol.*, Vol., 147, p 497- 508

**Moore, P.C.L., and Lindsay, J.A.** 2002. Molecular characterisation of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. *J. Med. Microbiol.* Vol., 51, p 516–521

**Moreno, Y.; Ferrús, M.A.; Vanoostende, A.; Hernández, M.; Montes, R., and Hernández, J.** 2002. Comparison of 23S polymerase chain reaction and amplified fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol., 211. p 97-103.

**Morrison, E.; Kosiak, B.; Bernhoft, A.; Aastveit, A.H.; Langseth, W.** 2002. Cytotoxicity of trichothecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. *Biomed. Life Sci.*, Vol., 153 (1), p 49-56

**Moya, E.E., and Apablaza, G.** 2003. Identificación de *Fusarium moniliforme* Sheldon en semillas de maíz dulce. XIII Congreso de Fitopatología, Octubre 2003, Chile.  
<http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/XIII.html>.

**Mulé, G.; Susca, A.; Stea, G., and Moretti, A.** 2004 a. Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol., 230, p 235-240.

**Mulé, G.; Susca, A.; Stea, G., and Moretti, A.** 2004 b. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol., 110, p 495-502.

**Mullis, K.B.** 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.*, Vol., 262 (4), p 56-61, 64-5

**Munkvold, G.P.** 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol., 41. p 99-116

**Munkvold, G.P., and Desjardins, A.E.** 1997. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* Vol., 81, p 556–565.

**Narasaiah, K.V.; Sashidhar, R.B.; Subramanyam, C.** 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia.* Vol., 162 (3), p 179-189

**Neethirajan, S.; Karunakaran, C.; Jayas, D.S., and White, N.D.G.** 2007. Detection techniques for stored-product insects in grain. *Food Control.*, Vol., 18 (2), p 157-162

**Nelson, P.E.; Dignani, M.C., and Anaissie, E.J.** 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol., 7 (4), p 479-504

**Nelson, P.E.; Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O.** 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. p 193

- Nicolaisen, M.; Justesen, A.F. ; Thrane, U.; Skouboe, P., and Holmstrom.** 2005. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecenes producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *J. Microbiol. Methods.*, Vol., 62, p 57-69
- Niessen L.; Schmidt H., and Vogel, R.F.** 2004. The use of Tri 5 gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene - producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella*. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 95 (3), p 305-319.
- Niessen, L., and Vogel, R.F.** 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol., 21, p 618–631.
- O'Donnell, K.** 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella publicaris*). *Curr. Genet.*, Vol., 22, p 213-220.
- O'Donnell, K.; Ward, T. J.; Geiser, D. M.; Kistler, H. C., and Aoki, T.** 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*. Vol., 41 p 600–623.
- Obst, A.; Lepschy-von, G.J., and Beck, R.,** 1997. On the etiology of *Fusarium* head blight of wheat in south Germany – preceding crops, weather conditions for inoculum production and head infection, proneness of the crop to infection and mycotoxin production. *Cereals Res. Commun.*, Vol., 25, p 699–703
- Official Journal of the European Union.** 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 “on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding”.
- Ohtsubo, K.; Ryu, J.C.; Nakamura, K.; Izumiyama, N.; Tanaka, T.; Yamamura, H.; Kobayashi, T., and Ueno, Y.** 1989. Chronic toxicity of nivalenol in female mice: A 2-year feeding study with *Fusarium nivale* Fn 2B-moulded rice. *Food Chem. Toxicol.*, Vol., 27, p 591-598.
- Okada, G.; Takematsu, A., and Takamura, Y.** 1997. Phylogenetic relationships of the hyphomycete genera *Chaetopsina* and *Kionochaeta* on 18S rDNA sequences. *Mycoscience.*, Vol., 38, p 409–420.
- Olive, D.M., and Bean, P.** 1999. Principles and Applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.*, Vol., 37, p1661-1669.
- Omurtag, G.Z., and Beyoglu, D.** 2003. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in processed cereals and pulses in Turkey. *Food Addit. Contam.*, Vol., 20, p 405-409.
- Pasquali, M.; Acquadro, A.; Balmas, V.; Migheli, Q.; Garibaldi, A., and Gullino, M.L.** 2003. RAPD Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolates Pathogenic on *Argyranthemum frutescens* L. *J. Phytopathol.*, Vol., 151 (1), p 30-35.
- Paterson, R.R.M., and Bridge, P.D.** 1994. Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Patiño, B.; Mirete, S.; Vázquez, C.; Jiménez, M.; Rodríguez, M.T.; González-Jaén, M.T.** 2006. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *J. Sci. Food Agric.*, Vol., 86, p 429-435.
- Patiño, B.; Mirete, S.; González-Jaén, M.T.; Mulè, G.; Rodríguez, M.T., and Vázquez, C.** 2004. PCR detection assay of Fumonisin-production *Fusarium verticillioides* strains. *J. Food Prot.*, Vol., 67, No. 6, p 1278-1283.
- Peplow, A.W.; Tag, A.G.; Garifullina, G.F., and Beremand, M.N.** 2003. Identification of new genes positively

regulated by Tri10 and has regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 69 (5), p 2731–2736.

**Pettersson, H.; Hedman, R.; Engstrom, B.; Elwinger, K.; Fossum, O.** 1995: Nivalenol in Swedish cereals-occurrence, production and toxicity towards chickens. *Food Addit. Contam.*, Vol.,12 (3), p 373-376.

**Phaff, H.J.** 1998. Chemotaxonomy based on the polysaccharide composition of cell walls and capsules. En Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. (Eds.), *The yeasts. A taxonomic study*, 4ª ed., Elsevier Science publishers, Amsterdam, p 45-47.

**Placinta, C.F.; D'Mello, J.P., and MacDonald, A.M.** 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, Vol., 78, p 21-37.

**Pronk, M.E.J., Schothorst, R.C., and van Egmond, H.P.** 2002. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. RIVM Report 388802024/2002. Bilthoven. p 75.

**Qu, B.; Li, H.P.; Zhang, J.B.; Xu, Y.B.; Huang, T.; Wu, A.B; Zhao, C.S.; Carter, J.; Nicholson, P., and Liao, Y.C.** 2008. Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology*. Vol.,57 (1), p 15–24.

**Radford, A.** 1993. A fungal phylogeny based upon orotidine-59-monophosphate decarboxylase. *J. Mol. Evol.*, Vol., 36, p 389–395.

**Reglamento (CE) Nº 1126/2007** de la Comisión, de 28 de septiembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el

maíz y los productos del maíz. DO L 255: p 14-17.

**Robertson-Hoyt, L.A.; Kleinschmidt, C.E.; White D.G.; Payne, G.A.; Maragos, C.M., and Holland, J.B.** 2007. Relationships of Resistance to *Fusarium* Ear Rot and Fumonisin Contamination with Agronomic Performance of Maize. *Crop Sci.*, Vol., 47, p 1770-1778.

**Rodríguez, M.A., Cabrera, G.M., Godeas, A.** 2006. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Appl. Microbiol.*, Vol., 100, p 575-586.

**Roeijmans, H.J.; Prillinger, H.; Umile, C.; Sugiyama, J.; Nakase, T.; Boekhout, T.** 1998. Analysis of carbohydrate composition of cell walls and extracellular carbohydrates. En: Kurtzman, C. P.; Fell, J.W. (Eds.). *The yeasts. A taxonomic study*, 4ª ed., Elsevier Science publishers, Amsterdam, p 103-105.

**Rotter, B.A.; Prelusky, D.B.; Pestka, J.J.** 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Toxicol. Environ. Health*. Vol., 48 (1), p 1-34.

**Saitou, N., and Nei, M.** 1987. The neighbour- joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* Vol., 4 (4), p 406-425.

**Samson, R. A.; Hoekstra, E.S., and Frisvad, J.C.** 2004. Introduction to food borne fungi, 7th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

**Sánchez-Rangel, D.; SanJuan-Badillo, A., and J, Plasencia.** 2005. Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* Strains Isolated from Maize in Mexico and Development of a Polymerase Chain Reaction to Detect Potential Toxigenic Strains in Grains. *J. Agric. Food Chem.*, Vol., 53 (22), p 8565 -8571.

**Sanchis, V.; Marín S., y Ramos A.J.** 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Revista Iberoamericana de Micología*, Vol., 17, p 69-75.

- Schlatter, J.** 2004: Special issue: Trichothecenes with a special focus on DON. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicol. Lett.*, Vol.,153 (1), p 83-89.
- Schmidt, H.; Niessen, L., and Vogel, R.F.** 2004. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section Sporotrichiella—evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.,95 (3), p 297-304.
- Schnerr, H.; Niessen, L., and Vogel, R. F.** 2001. Real detection of the Tri 5 gene in *Fusarium* species by LightCycler – PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 71, p 53-61.
- Schnerr, H.; Vogel, R.F., and Niessen, L.** 2002. A biosensor-based immunoassay for rapid screening of deoxynivalenol contamination in wheat. *Food Agric. Immunol.*, Vol.,14, p 313-321.
- Schulze, W.X.** 2005. Protein analysis in dissolved organic matter: What proteins from organic debris, soil leachate and surface water can tell us – a perspective. *Biogeosciences*, Vol., 2, p 75–86.
- Scott, P.M.** 1989. The natural occurrence of trichothecenes. In *Trichothecene Mycotoxicosis : Pathophysiologic Effects*, Vol. 1 (V. R. Beasley, ed.). CRC Press, Boca Raton, FA, p 1-26.
- Seifert, K.** 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. En: *Fusarium*. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. p 15 – 28.
- Seifert, K.A.; Wingfield, B.D., and Wingfield, M.J.** 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Can. J. Bot.*, Vol.,73 (Suppl. 1), p S760–S767.
- Shiosaki, R.K.; Okada, K.; Buarque, N.; Nigamm, P.; Falcão, P.S.; da Silva, N.H.; Fukushima, K.; Miyaji, M., and de Campos, G.M.** 2001. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. *Rev Iberoam Micol.*; Vol., 18, p 123-127.
- Sneath, P.H.; Sokal, R.R.** 1973. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. Freeman and company, San Francisco California, USA p 573.
- Snijders, C.H.A., and Perkowski. J.** 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathol.*, Vol., 80, p 566–570.
- Soll, D. R.** 2000. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol., 13 (2), p. 332–370.
- Soriano, J.M.** 2007. Introducción. En *Micotoxinas en alimentos*. Cord. Soriano del Castillo, J. M. Ediciones Díaz de Santos. España. p 396.
- Soriano, J.M., and Dragacci, S.** 2004. Occurrence of fumonisins in foods, *Food Res. Int.*, Vol., 37, p 985–1000.
- Stackebrandt, E.; Frederiksen, W.; Garrity, G.M.; Grimont, P.A.D.; Kampfer, P.; Maiden, M.C.; Nesme, X.; Rossello-Mora, R.; Swings, J.; Truper, H.G.; Vauterin, L.; Ward, A.C., and Whitman, W.B.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, p 1043–1047.
- Stryer, L.** 1996, *Bioquímica*. Barcelona. Editorial Reverté, 4ª ed.
- Summerell, B.A.; Salleh, B., and Leslie, J.F.** 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.*, Vol., 87, p117-128.
- Swofford, D.L., and Olsen, G.J.** 1990. Phylogenetic reconstruction. In *Molecular Systematic*, p 411-501. Edited by D. Hillis and C. Moritz. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Szécsi, Á.; Bartók, T.; Varga, M.; Magyar, D., and Mesterházy, Á.** 2005. Determination of trichothecene

chemotypes of *Fusarium graminearum* strains isolated in Hungary. *J. Phytopathology*. Vol., 153, p 445-448.

**Tamm, C., and Tori, M.** 1984. Trichothecenes. In V. Betina (Ed.). *Mycotoxins. Production, isolation, separation and purification*. Elsevier Scientific Publications, Amsterdam, The Netherlands. p. 131–182.

**Taylor, J.W.; Jacobson, D.J.; Kroken, S.; Kasuga, T.; Geiser, D.M.; Hibbett, D. S., and Fisher, M.C.** 2000. Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. *Fungal Genet. Biol.*, Vol., 31, p 21–32.

**Taylor, J.W.; Jacobson, D.J.; Fisher, M.C.** 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annu Rev Phytopathol.*, Vol., 37, p 197–246.

**Thrane, U., and Hansen, U.** 1995. Chemical and physiological characterization of taxa in the *Fusarium sambucinum* complex. *Mycopathologia*, Vol., 129 (3), p183-190.

**Thrane, U.; Adler, A.; Clasen, P.E.; Galvano, F.; Langseth, W.; Lew, H.; Logrieco, A.; Nielsen, K.F.; Ritieni, A.** 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *F. poae* and *F. sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 95(3). p 257-66.

**Too, H., and Anwar, A.** 2006. Real time Polymerase Chain Reaction: In Kun, L.Y(Edit) *Microbial Biotechnology. Principles and Applications*. p 794.

**Torondel, P.** 2001. Determinación de micotoxinas producidas por especies del género *Fusarium* mediante métodos cromatográficos. Tesis doctoral Universidad Politécnica de Valencia. p 183

**Torp, M., and Langseth, W.** 1999. Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. *Mycopathologia*, Vol., 147(2), p 89-96

**Tóth, B.; Mesterházy, A.; Horváth Z.; Bartók T.; Varga, M., and Varga, J.** 2005. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. *Eur. J. Plant Pathol.* Vol., 113, p 35–45.

**Tóth, B.; Kászonyi, G.; Bartók T.; Varga, J., and Mesterházy, A.** 2008. Common reistence of weat to members of *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. *Plant Breed.* Vol., 127, p 1-8.

**Toussoun, T.A., and Nelson, P.E.** 1975. Variation and speciation in the fusaria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol., 13, p 71-82.

**Trenholm, H.L.; Prelusky, D.B.; Young, J.C., and Miller, J.D.** 1989. A practical guide to the prevention of *Fusarium* mycotoxins in grain and animal feedstuffs. *Arch. Environ. Toxicol.*, Vol., 18, p 443-451.

**Trucksess, M.W.; Stack, M.E.; Allen, S., and Barrion, N.** 1995. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisin B1 in canned and frozen sweet corn. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*. Vol., 78(3), p 705-710.

**Tsai, H.F.; Liu, J.S.; Staben, C.; Christensen, M.J.; Latch, G.C.M.; Siegel, M.R., and Schardl, C.L.** 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloe* species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol., 91, p 2542–2546.

**Ueno, Y.** 1983. Historical background of trichothecene problems. En: *Trichothecene- Chemical, biological and toxicological aspects. Developments in food science 4*. Elsevier. Amsterdam-Oxford-New York.

**Ueno, Y.** 1985. The toxicology of mycotoxins. *Crit. Rev. Toxicol.*, Vol., 14, p 99-132.

**Ueno, Y.** 1977. Trichothecenes: overview address. In *Mycotoxins in human and animal health*. Edited by J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, and M.A. Mehlman.

Pathotox Publishers Inc., Park Forest South, Ill. p 189–207.

**Ueno, Y., and Fukushirna, K.** 1968. Inhibition of protein and DNA syntesis in Ehrlich ascites tumor by nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale* growing rice-M. *Experientia (Basel)*. Vol 24, p 1032-1033.

**Uriarte-Archundia, M.E.; Bolsen, K.K., and Brent, B.** 2002. A study of the chemical and microbial changes in whole-plant corn silage during exposure to air: effects of a biological additive and sealing technique. The XIIIth International Silage Conference. Auchincruive, Scotland. p 174-175.

**Van de Peer, Y., and DeWachter, R.** 1994. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolucionary trees for the Microsoft Windows environment. Computer Applications for Biological Sciences. Vol., 10, p. 569-570.

**Van-Dongen, P.W.J., De Groot, A.N.J.A.** 1995. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine. *Eur J. Obstet. Gynecol. Reproduct. Biol.*, Vol., 60, p 109–16.

**Velluti, A.; Marín, S.; Bettucci, L.; Ramos, A.J., and Sanchis, V.** 2000. The effect of fungal competition on colonisation of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol.,59, p 59–66.

**Versalovic, J.; Schneider, M.; De Bruijn F.J.; Lupski, J.R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* Vol., 5, p 25-40.

**Vlata, Z.; Porichis, F.; Tzanakakis, G.; Tsatsakis, A., and Krambovitis, E.** 2006 A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.*, Vol.,165 (3), p 274-281.

**Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M., and Zabeau, M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, Vol., 23, p 4407-4414.

**Wassenaar, T.M., and Newell, D.G.** 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol., 66, p 1-9.

**Weidenborner, W.** 2001. Encyclopedia of food mycotoxins. Springer, Berlin, Germany.

**Weider, L.J.; Elser, J.J.; Crease, T.J.; Mateos, M.; Cotner, J.B., and Markow, T.A.** 2005. The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: Impacts on the Evolutionary Ecology of Organisms . *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, Vol., 36, p 219-242.

**Welsh, J., and McClelland, M.** 1990. Fingerprinting genomes using arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, Vol., 18. p 7213-7218.

**White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S., and Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p 315-322 In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.

**Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Libak, K.J.; Rafalski; J.A., and Tingey S.V.** 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Vol., 18, p 6531-6535.

**Wilson, A.; Simpson, D.; Chandler, E.; Jennings, P.; Nicholson, P.** 2004. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *Microbiol. Lett.*, Vol., 233, p 69–76.

**Wilson, K.** 1987. preparation of genomic DNA from bacteria. In current protocols in molecular biology. (Ausubel, F. M.; Brent,

r., Kingston, R.E., Moore, D.D.; Smith, J.A.; Seidman, J.G., and Struhl, K.; (Eds), unit 2.4.1. John Wiley and Sons, NY,USA.

**Woese, C.R.** 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 p 8392-8396.

**Wolf-Hall, C.E.; Hanna, M.A.; Bullerman, L.B.** 1999. Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods. *J. Food Prot.*, Vol.,62, p 962-964.

**Woodget, B.W., and Cooper, D.** 1995. In: *Samples and Standards*, ed. N.B. Chapman, Analytical Chemistry Open Learning, John Wiley & Sons, Chichester.

**World Health Organization**, 2000. IPCS - International Programme on Chemical Safety. Safety Evaluation Of Certain Food Additives And Contaminants. Zearalenone .Series:44. Geneva, p 110.

**Xu, J., and Leslie, J.F.** 1996. A Genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Genetics*, Vol., 143, p 175-189.

**Yamada, Y.; Sugihara,K.; van Eijk, G. W.; Roeijmans, H.J., and de Hoog, G.S.** 1989. Coenzyme Q systems in ascomycetous black yeasts. *Antonie Leeuwenhoek Int. J. Genet.*, Vol., 56 p 349-356.

**Yli-Mattila, T.; Paavanen-Huhtala, S.; Parikka, P.; Konstantinova, P., and Gagkaeva, T. Y.** 2004. Molecular and Morphological Diversity of *Fusarium* Species in Finland and North-Western Russia. *Eur. J. Plant Pathol.*, Vol., 110 (5 – 6), p 573 – 585.

**Yoshizawa, T.; Takeda, H.; Ohi, T.** 1983, Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biol. Chem.*, Vol., 47, p 2133-2135.

**Zavaleta, E.G.; Fernandez, B.B.; Grove, M.K. and Kaye, M.D.** 2001. St. Anthony's fire (ergotamine induced leg ischemia). A case report and review of the literature. *Angiology*. Vol., 52, p 349-356.

**Zhang, J.B; Li, H.P; Dang, F.J; Qu, B.; Xu, Y.B; Zhao, Ch.S., and Liao, Y.C.** 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycol. Res.* III, p 967-975.

**ANEJOS**

---



## MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo referida a un litro de agua destilada

### AGAR PATATA DEXTROSA (PDA)

39 g de bacto-patata dextrosa agar (Difco)

1000 mL de agua destilada.

Se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C y se reparte en placas Petri.

### AGAR PATATA DEXTROSA CON CLORANFENICOL (PDA-CL)

39 g de bacto-patata dextrosa agar (Difco)

0,5 g de cloranfenicol (Panreac)

1000 mL de agua destilada.

Para disolver el medio se lleva a la disolución de ebullición. Se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C y se reparte en placas Petri.

Nota: El medio PDA se emplea para el estudio general de hongos. Y el cloranfenicol es un antibiótico que se utiliza para impedir el desarrollo de bacterias, reduciendo así la contaminación.

### AGAR VERDE DE MALAQUITA (AVM) (Castella *et al.*, 1997)

Peptona Difco (Bacto™ Peptona):	15 g
Fosfato potásico mono – básico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1 g
Sulfuro magnésico heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Disolución de verde malaquita 2,5 ppm	1 ml
Agar	20 g
Cloranfenicol	0,5 g
Agua destilada	1000 mL.

La disolución de verde malaquita se prepara previamente y se mantiene a temperatura ambiente. El medio se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C, y se reparte en placas Petri.

Nota: El medio agar verde malaquita es específico para especies del género *Fusarium*.

### **AGAR SACAROSA EXTRACTO DE LEVADURA (YES)**

Extracto de levadura	20 gramos
Sacarosa	150 gramos
Agar	20 gramos
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.5 gramos
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza por 15 minutos a 121°C

### **AGAR CZAPECK (CZ)**

Sacarosa	30 gramos
NaNO <sub>3</sub>	3 gramos
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 gramos
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.5 gramo
KCl	0.5 gramos
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.01 gramos
Agar	15 gramos
Agua destilada	1000 mL

Las sales se disuelven por separado, dejando por último el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se mezclan los componentes. Se esteriliza por 15 minutos a 121°C.

## **2. Reactivos y soluciones**

### **Electroforesis clásica**

#### **Gel de agarosa**

Agarosa D-1 Media EEO (Pronadisa)

Agarosa D-1 Alta EEO (Pronadisa)

Solución de bromuro de etidio 10 mg/ml (Iberlabo)

Pesar la agarosa y transferir a un matraz, añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar y atemperar hasta 50°C. Los geles son teñidos una vez finalizada la electroforesis en una solución 800 ml de Tampón TAE 1X con 5 gotas

de bromuro de etidio y dejando el gel entre 10-15 minutos para luego ser visualizado.

### **Tampón de carga**

Azul bromofenol 1% 2,5 ml  
Ficoll 2,5 g  
EDTA 0,5 M 1 ml  
Agua MilliQ 4 ml

### **Marcadores de pesos moleculares.**

100 bp DNA LAdder Plus (Fermentas SM0323) de 100 a 3000 pb  
50 bp DNA Ladder (BioLabs 323-1S) de 100 a 1517 pb

### **100 mM Tris- HCl pH 7.2**

Se toma 1,211 gramos de Tris base cuyo peso molecular es 121.1gr/mol y se afora con agua destilada hasta 100 ml, el pH se condiciona con ácido clorhídrico.

### **100 mM EDTA pH 8**

Se pesan 3.72 gramos de EDTA cuyo peso molecular es 372.2 g/mol y se afora con agua destilada estéril hasta 100 ml.

### **10% SDS**

Se pesan 10gramos de dodecil sulfato sódico (SDS), se adicionan 90 ml de agua destilada estéril, se calienta a 68°C, se ajusta el pH a 7.2 con HCl y se afora a 100 ml, no necesita ser esterilizado

### **Solución tampón:**

100 mM Tris- HCl pH 7.2  
100 mM EDTA pH 8  
10% SDS pH 7.2

Se coloca en el tubo eppendorf 250 µl de cada uno y se mantiene todo en frío

### **Proteinaza K (20mg/ml).**

Se pesan 20mg de proteinaza K y se le adiciona 1 ml de agua destilada estéril.

### **NaCl 5M**

Para 100 ml se pesan 29.22 gramos de NaCl y se le adiciona 80 ml de agua destilada estéril y se afora a 100 ml.

### **CTAB/NaCl**

Se pesan 10 gramos de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) y se le adicionan 100 ml de NaCl al 0.7 M (pesar 4.09 gramos de NaCl y diluirlos en 100ml de agua destilada estéril).

### **Cloroformo/Alcohol isoamílico 24:1**

Se mide 24 partes de cloroformo por una de alcohol isoamilico.

### **Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1)**

Se utilizo Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA. de SIGMA.

### **TE**

Pesar 121gramos de Trisma® base y 0.372 gramos EDTA disolver en 1000ml de agua miliQ

### **Tampón TAE 50X**

Trisma® base 2 M 242 gramos, ácido acético glacial 50mM 57.1 ml. y EDTA 1mM. Llevar a 1000 ml con agua destilada.

### **TAE 1X**

20 ml de TAE 50X en 980 ml de agua

### **RNAsa**

25 mg/mL

Tabla 1: Porcentaje de granos contaminados maíz campo

Muestra	PDA-CI		AVM		Muestra	PDA-CI		AVM	
	Nº granos	% granos	Nº granos	% granos		Nº granos	% granos	Nº granos	% granos
F1	25	100	11	44	F52	0	0	0	0
F2	13	52	17	68	F53	2	8	5	20
F3	11	44	15	60	F54	4	16	0	0
F4	17	68	11	44	F55	4	16	1	4
F5	15	60	7	28	F56	10	40	3	12
F6	16	64	11	44	F57	20	80	8	32
F7	8	32	14	56	F58	0	0	1	4
F8	10	40	10	40	F59	17	68	10	40
F9	15	60	4	16	F60	5	20	2	8
F10	21	84	18	72	F61	2	8	11	44
F11	19	76	17	68	F62	8	32	2	8
F12	25	100	25	100	F63	4	16	1	4
F13	23	92	12	48	F64	10	40	6	24
F14	14	56	21	84	F65	1	4	0	0
F15	15	60	17	68	F66	6	24	5	20
F16	20	80	9	36	F67	2	8	0	0
F17	9	36	2	8	F68	6	24	1	4
F19	15	60	3	12	F69	9	36	1	4
F20	13	52	6	24	F70	1	4	0	0
F21	24	96	11	44	F71	1	4	2	8
F22	9	36	8	32	F72	0	0	2	8
F23	4	16	4	16	F73	5	20	5	20
F24	23	92	23	92	F74	5	20	3	12
F25	1	4	1	4	F75	9	36	5	20
F26	4	16	2	8	F76	10	40	5	20
F27	13	52	8	32	F77	1	4	0	0
F28	0	0	10	40	F78	3	12	2	8
F29	20	80	12	48	F79	1	4	0	0
F30	25	100	24	96	F80	12	48	15	60
F31	25	100	25	100	F81	8	32	9	36
F32	24	96	24	96	F82	11	44	7	28
F33	20	80	11	44	F83	5	20	10	40
F34	12	48	11	44	F84	10	40	6	24
F35	11	44	3	12	F85	2	8	7	28
F36	9	36	10	40	F86	5	20	3	12
F37	18	72	12	48	F87	2	8	7	28
F38	16	64	9	36	F88	6	24	2	8
F39	17	68	13	52	F89	10	40	5	20
F40	20	80	15	60	F90	2	8	4	16
F41	17	68	13	52	F91	4	16	7	28
F42	13	52	9	36	F92	2	8	3	12
F43	14	56	4	16	F93	3	12	3	12
F44	15	60	1	4	F94	9	36	2	8
F45	14	56	7	28	F95	4	16	6	24
F46	4	16	0	0	F96	1	4	3	12
F47	5	20	4	16	F97	2	8	2	8
F48	3	12	2	8	F98	1	4	1	4
F49	4	16	2	8	F99	17	68	17	68
F50	2	8	0	0	F100	4	16	5	20
F51	11	44	16	64	F101	7	28	3	12
<b>Total</b>						974	38.96	732	29.28

Tabla 2: Distribución de la contaminación fúngica en maíz campo

Medio Potato Dextrosa Agar con cloranfenicol (PDA-CI)															
Muestra	Total	NºAlt	%Alt	NºAsp	%Asp	NºCla	%Cla	NºFus	%Fus	NºGe	%Geo	NºMuc	%Muc	NºPen	%Pen
F1	39		0	34	87,18	0	5	12,8		0		0		0	
F2	17	1	5,88	12	70,59	0	4	23,5		0		0		0	
F3	11		0	2	18,18	0	4	36,4		0	5	45,45		0	
F4	17		0	16	94,12	0		0		0	1	5,882		0	
F5	16		0	10	62,5	0		0	1	6,25	5	31,25		0	
F6	17		0	2	11,76	0	8	47,1		0	7	41,18		0	
F7	9		0	5	55,56	0		0		0	4	44,44		0	
F8	10		0	1	10	0	6	60		0	3	30		0	
F9	10		0	4	40	0	1	10	1	10	4	40		0	
F10	12		0	3	25	0		0		0	9	75		0	
F11	22		0	10	45,45	0	11	50		0	1	4,545		0	
F12	33		0	21	63,64	0		0		0	12	36,36		0	
F13	23		0	13	56,52	0		0		0	10	43,48		0	
F14	16		0	6	37,5	0		0		0	8	50	2	12,5	
F15	16		0	15	93,75	0		0		0		0	1	6,25	
F16	16		0	14	87,5	0		0		0		0	2	12,5	
F17	12		0	9	75	0		0		0	2	16,67	1	8,33	
F19	26		0	0	0	0	2	7,69		0		0	24	92,3	
F20	19		0	3	15,79	0		0		0		0	16	84,2	
F21	20		0	3	15	0		0		0	13	65	4	20	
F22	11		0	4	36,36	0		0		0	4	36,36	3	27,3	
F23	4		0	0	0	0		0		0	3	75	1	25	
F24	33		0	2	6,061	0	22	66,7		0	8	24,24	1	3,03	
F25	1		0	0	0	0		0		0		0	1	100	
F26	5	1	20	0	0	0		0		0	1	20	3	60	
F27	16		0	2	12,5	0	8	50		0		0	6	37,5	
F28	0		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
F29	33		0	4	12,12	0	5	15,2		0		0	24	72,7	
F30	55		0	1	1,818	0	15	27,3		0		0	39	70,9	
F31	187		0	5	2,674	0	6	3,21		0	1	0,535	175	93,6	
F32	72		0	0	0	0	3	4,17		0	5	6,944	64	88,9	
F33	20		0	3	15	0	1	5		0		0	16	80	
F34	5		0	0	0	0	1	20		0		0	4	80	
F35	30		0	4	13,33	0	2	6,67		0		0	24	80	
F36	11		0	6	54,55	0	2	18,2		0		0	3	27,3	
F37	16		0	4	25	0	6	37,5		0		0	6	37,5	
F38	18		0	2	11,11	0	9	50		0		0	7	38,9	
F39	31		0	4	12,9	0	5	16,1		0		0	22	71	
F40	28		0	12	42,86	0	6	21,4		0		0	10	35,7	
F41	24		0	5	20,83	0	12	50		0	2	8,333	5	20,8	
F42	15		0	3	20	3	20	6	40		0		0	3	20
F43	23		0	1	4,348	8	34,8	4	17,4		0		0	11	47,8

Continuación tabla 2

Medio Potato Dextrosa Agar con cloranfenicol (PDA-CI)															
Muestra	Total	N°Alt	%Alt	N°Asp	%Asp	N°Cla	%Cla	N°Fus	%Fus	N°Geo	%Geo	N°Muc	%Muc	N°Pen	%Pen
F44	18	1	5,56	4	22,22		0	3	16,7		0		0	10	55,6
F45	5		0		0		0		0		0		0	5	100
F46	6	1	16,7	2	33,33		0		0		0		0	3	50
F47	6	1	16,7		0	1	16,7	2	33,3		0		0	2	33,3
F48	4		0		0		0	3	75		0		0	1	25
F49	4		0		0		0	4	100		0		0		0
F50	2	1	50		0		0		0		0		0	1	50
F51	11		0		0		0	10	90,9		0		0	1	9,09
F52	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F53	2		0		0		0	1	50		0		0	1	50
F54	5	1	20		0		0		0	2	40		2	40	40
F55	5	2	40		0		0	1	20		0		0	2	40
F56	5	2	40	2	40		0	1	20		0		0		0
F57	15		0		0		0		0		0	15	100		0
F58	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F59	20	12	60	1	5		0	4	20	1	5	2	10		0
F60	6	2	33,3		0		0	2	33,3	2	33,3		0		0
F61	3		0	1	33,33		0	1	33,3	1	33,3		0		0
F62	3		0		0		0	3	100		0		0		0
F63	5	1	20	2	40		0		0		0	1	20	1	20
F64	10		0		0		0	9	90	1	10		0		0
F65	1		0		0		0		0		0		0	1	100
F66	6		0		0		0		0		0	6	100		0
F67	2	1	50		0		0		0		0		0	1	50
F68	1		0		0		0	1	100		0		0		0
F69	4	1	25	1	25		0		0		0	2	50		0
F70	1		0		0		0	1	100		0		0		0
F71	1		0		0		0	1	100		0		0		0
F72	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F73	5	4	80		0		0		0		0		0	1	20
F74	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F75	4		0		0		0		0		0	4	100		0
F76	5	1	20		0		0	4	80		0		0		0
F77	1	1	100		0		0		0		0		0		0
F78	3	2	66,7	1	33,33		0		0		0		0		0
F79	1	1	100		0		0		0		0		0		0
F80	7		0		0		0	6	85,7		0		0	1	14,3
F81	8	1	12,5	1	12,5		0	6	75		0		0		0
F82	6	2	33,3		0		0	4	66,7		0		0		0
F83	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F84	10		0		0		0	7	70	3	30		0		0
F85	2	1	50		0		0	1	50		0		0		0
F86	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F87	2		0		0		0		0		0	2	100		0
F88	6		0		0		0	6	100		0		0		0
F89	11	4	36,4		0		0	7	63,6		0		0		0
F90	2		0		0		0	2	100		0		0		0
F91	4		0		0		0	3	75	1	25		0		0
F92	3		0		0		0		0		0		0	3	100
F93	3	2	66,7		0		0		0		0		0	1	33,3

Continuación tabla 2

Medio Potato Dextrosa Agar con cloranfenicol (PDA-CI)															
Muestra	Total	NºAlt	%Alt	NºAsp	%Asp	NºCla	%Cla	NºFus	%Fus	NºGeo	%Geo	NºMuc	%Muc	NºPen	%Pen
F94	4		0		0		0	4	100		0		0		0
F95	4		0		0		0	4	100		0		0		0
F96	1		0		0		0		0	1	100		0		0
F97	2		0		0		0	2	100		0		0		0
F98	1		0	1	100		0		0		0		0		0
F99	17		0	2	11,76		0	15	88,2		0		0		0
F100	4		0		0		0	4	100		0		0		0
F101	7		0		0		0	7	100		0		0		0
Total	1273	47		263		12		283		12		142		515	
Medio verde malaquita (AVM)															
Muestra	Total	NºAlt	%Alt	NºAsp	%Asp	NºCla	%Cla	NºFus	%Fus	NºGeo	%Geo	NºMuc	%Muc	NºPen	%Pen
F1	12		0	6	50		0	5	41,67		0		0	1	8,333
F2	17		0		0		0	17	100		0		0		0
F3	15		0	7	46,67		0	7	46,67		0	1	6,667		0
F4	11		0	10	90,91		0		0		0	1	9,091		0
F5	8		0	8	100		0		0		0		0		0
F6	11		0	3	27,27		0	5	45,45		0	3	27,27		0
F7	9		0	5	55,56		0		0		0	4	44,44		0
F8	10		0	4	40		0	6	60		0		0		0
F9	4		0		0		0	1	25		0	3	75		0
F10	18		0		0		0		0		0	17	94,44	1	5,556
F11	17		0	9	52,94		0	7	41,18	1	5,88		0		0
F12	38		0	11	28,95		0		0		0	20	52,63	7	18,42
F13	13		0	7	53,85		0		0		0	4	30,77	2	15,38
F14	22		0	19	86,36		0		0		0	1	4,545	2	9,091
F15	23		0	8	34,78		0		0	1	4,35		0	14	60,87
F16	9		0	5	55,56		0		0		0	4	44,44		0
F17	2		0	2	100		0		0		0		0		0
F19	3		0		0		0	2	66,67		0		0	1	33,33
F20	6		0	6	100		0		0		0		0		0
F21	11		0	2	18,18		0		0	2	18,2	7	63,64		0
F22	8		0	1	12,5		0	4	50		0	1	12,5	2	25
F23	4		0	1	25		0	3	75		0		0		0
F24	26		0		0		0	25	96,15	1	3,85		0		0
F25	1		0	1	100		0		0		0		0		0
F26	2	1	50		0		0		0		0	1	50		0
F27	8		0		0		0	8	100		0		0		0
F28	10		0		0		0	9	90		0		0	1	10
F29	20		0		0		0	4	20		0		0	16	80
F30	35	1	2,9	2	5,714		0	17	48,57		0		0	15	42,86
F31	71		0		0		0	1	1,408		0		0	70	98,59
F32	61	1	1,6		0		0	1	1,639		0	8	13,11	51	83,61
F33	15		0		0		0	4	26,67		0		0	11	73,33
F34	6		0		0		0	3	50		0	1	16,67	2	33,33
F35	5		0	2	40		0	2	40		0		0	1	20
F36	10		0	2	20		0	5	50		0		0	3	30
F37	12		0	2	16,67		0	8	66,67		0	1	8,333	1	8,333
F38	9		0		0		0	4	44,44		0	3	33,33	2	22,22
F39	18		0	1	5,556		0	3	16,67		0		0	14	77,78
F40	18		0	9	50		0	5	27,78		0		0	4	22,22

Continuación tabla 2

Medio verde malaquita (AVM)															
Muestra	Total	NºAlt	%Alt	NºAsp	%Asp	NºCla	%Cla	NºFus	%Fus	NºGeo	%Geo	NºMuc	%Muc	NºPen	%Pen
F41	16		0	2	12,5		0	10	62,5		0	0	0	4	25
F42	9		0		0		0	7	77,78		0	0	0	2	22,22
F43	6		0	1	16,67		0	2	33,33		0	0	0	3	50
F44	1		0		0		0	1	100		0	0	0		0
F45	7		0		0		0	3	42,86	2	28,6		0	2	28,57
F46	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F47	4		0		0		0	3	75		0	0	0	1	25
F48	2		0		0		0	2	100		0	0	0		0
F49	2		0		0		0	2	100		0	0	0		0
F50	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F51	16		0		0		0	16	100		0	0	0		0
F52	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F53	5		0		0		0	5	100		0	0	0		0
F54	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F55	1	1	100		0		0		0		0	0	0		0
F56	3		0	2	66,67		0		0		0	0	0	1	33,33
F57	8		0		0		0		0	6	75	2	25		0
F58	1		0		0		0		0		0	0	0	1	100
F59	11	2	18		0		0	9	81,82		0	0	0		0
F60	2		0		0		0	2	100		0	0	0		0
F61	11		0		0		0	11	100		0	0	0		0
F62	2		0		0		0	2	100		0	0	0		0
F63	1		0		0		0		0		0	1	100		0
F64	6		0	1	16,67		0	5	83,33		0	0	0		0
F65	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F66	5		0		0		0	3	60	2	40		0		0
F67	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F68	1		0		0		0	1	100		0	0	0		0
F69	1		0		0		0	1	100		0	0	0		0
F70	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F71	2		0		0		0	2	100		0	0	0		0
F72	2		0	2	100		0		0		0	0	0		0
F73	5	5	100		0		0		0		0	0	0		0
F74	3		0		0		0		0		0	3	100		0
F75	5	2	40		0		0	3	60		0	0	0		0
F76	5	1	20		0		0	4	80		0	0	0		0
F77	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F78	2	1	50		0		0		0		0	1	50		0
F79	0		-----		-----		-----		-----		-----		-----		-----
F80	15		0		0		0	15	100		0	0	0		0
F81	9	1	11		0		0	8	88,89		0	0	0		0
F82	7		0		0		0	7	100		0	0	0		0
F83	10		0		0		0		0	9	90	1	10		0
F84	6		0		0		0	6	100		0	0	0		0
F85	7	1	14		0		0	6	85,71		0	0	0		0
F86	3		0		0		0		0		0	3	100		0
F87	7		0		0		0	7	100		0	0	0		0
F88	2		0		0		0	2	100		0	0	0		0
F89	5	3	60		0		0	2	40		0	0	0		0
F90	4		0		0		0	4	100		0	0	0		0
F91	7		0		0		0	5	71,43	1	14,3	1	14,29		0
F92	3		0		0		0	3	100		0	0	0		0
F93	3		0		0		0	3	100		0	0	0		0

Continuación tabla 2

Medio verde malaquita (AVM)															
Muestra	Total	NºAlt	%Alt	NºAsp	%Asp	NºCla	%Cla	NºFus	%Fus	NºGeo	%Geo	NºMuc	%Muc	NºPen	%Pen
F94	2		0		0		0	1	50		0	1	50		0
F95	6		0		0		0	6	100		0		0		0
F96	3		0		0		0		0	3	100		0		0
F97	2		0		0		0	1	50		0	1	50		0
F98	1		0		0		0	1	100		0		0		0
F99	17		0		0		0	17	100		0		0		0
F100	5		0		0		0	5	100		0		0		0
F101	3	1	33		0		0	2	66,67		0		0		0
<b>Total</b>	870	21		141		0		351		28		94		235	

## Recuento de hongos maíz experimental

1º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
P.1.P.1-1	4	6	6	4	7	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
P.1.P.1-2	2	8	6	7	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
P.1.P.1-3	2	4	5	4	5	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
P.1.P.1-4	3	2	2	6	7	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras	
P.1.P.1-5	1	2	3	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
P.1.V.1-1	1	-	2	1	-	<i>Penicillium</i> sp.	-	
P.1.V.1-2	-	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.1.V.1-3	1	2	3	4	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.1.V.1-4	2	1	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.1.V.1-5	2	3	3	1	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.1-1	2	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.2.P.1-2	4	2	1	1	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.1-3	3	2	3	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.1-4	4	3	3	4	4	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
P.2.P.1-5	3	2	2	1	2	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.V.1-1	2	2	1	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.2.V.1-2	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.2.V.1-3	2	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.2.V.1-4	3	3	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.V.1-5	2	1	1	2	2	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.P.1-1	-	-	-	-	-		-	
C.1.P.1-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.P.1-3	-	-	1	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.1.P.1-4	-	-	-	-	-		-	
C.1.P.1-5	-	-	-	-	-		-	
C.1.V.1-1	-	-	-	-	-		Levaduras	
C.1.V.1-2	-	-	-	-	-		-	
C.1.V.1-3	-	-	-	-	-		-	
C.1.V.1-4	-	1	-	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.1-5	-	-	-	-	-		-	
C.2.P.1-1	-	-	-	-	-		-	
C.2.P.1-2	-	-	-	-	-		-	
C.2.P.1-3	-	-	1	-	-	<i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.1-4	-	-	-	-	-		-	
C.2.P.1-5	-	-	3	-	-	<i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.V.1-1	-	-	-	-	-		-	
C.2.V.1-2	-	-	-	-	-		-	
C.2.V.1-3	-	-	-	1	-	<i>Alternaria</i> sp.	-	
C.2.V.1-4	-	-	-	-	-		-	
C.2.V.1-5	-	-	-	-	-		-	

**Anejo II**

<b>1º MUESTREO</b>							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.1-1	2	-	-	-	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.1-2	-	-	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
N.1.P.1-3	1	-	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Levaduras
N.1.P.1-4	1	1	1	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.1-5	1	1	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Levaduras
N.1.V.1-1	1	1	2	1	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.1-2	1	1	-	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	Levaduras
N.1.V.1-3	-	-	-	-	-		-
N.1.V.1-4	-	-	-	-	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
N.1.V.1-5	-	-	-	-	-		Levaduras
N.2.P.1-1	1	2	1	1	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.1-2	-	-	-	-	-		Levaduras
N.2.P.1-3	-	-	-	-	-		-
N.2.P.1-4	-	-	-	1	-	<i>Fusarium</i> sp.	Levaduras
N.2.P.1-5	-	-	-	-	-		Levaduras
N.2.V.1-1	1	-	-	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.1-2	1	-	-	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.1-3	-	-	-	-	-		-
N.2.V.1-4	-	-	-	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.1-5	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
<b>2º MUESTREO</b>							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.2-1	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.P.2-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.P.2-3	1	3	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.1.P.2-4	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.P.2-5	2	1	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.V.2-1	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.V.2-2	2	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.,	-
P.1.V.2-3	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.,	-
P.1.V.2-4	2	3	2	3	3	<i>Aspergillus</i> sp.,	-
P.1.V.2-5	2	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp.,	-
P.2.P.2-1	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.2-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.2-3	1	2	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.2-4	2	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.2-5	2	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.V.2-1	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.,	-
P.2.V.2-2	2	3	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.2-3	3	3	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.2-4	2	2	2	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.2-5	2	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-

2º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
C.1.P.2-1	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.2-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.P.2-3	1	1	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.2-4	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras	
C.1.P.2-5	1	-	-	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.V.2-1	1	1	1	1	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.V.2-2	-	1	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.2-3	-	-	-	1	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.V.2-4	-	-	1	-	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.V.2-5	1	1	-	-	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.P.2-1	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.P.2-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.P.2-3	1	-	1	1	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.P.2-4	1	-	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.2-5	1	1	-	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
C.2.V.2-1	1	-	-	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.2-2	2	1	-	-	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.2-3	1	1	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.V.2-4	-	1	-	-	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.V.2-5	1	1	1	2	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.P.2-1	2	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.2-2	1	-	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.1.P.2-3	1	-	-	2	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.2-4	1	2	2	2	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.2-5	1	1	2	-	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.V.2-1	-	1	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.1.V.2-2	1	1	-	-	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.1.V.2-3	-	1	-	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.1.V.2-4	1	1	1	-	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.1.V.2-5	1	1	1	1	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.2-1	-	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.2-2	1	1	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Levaduras	
N.2.P.2-3	1	2	1	-	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Levaduras	
N.2.P.2-4	2	-	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras	
N.2.P.2-5	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.2-1	2	1	2	-	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.V.2-2	1	-	1	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.2-3	1	2	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.2-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.2.V.2-5	-	1	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	

Anejo II

3º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
P.1.P.3-1	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
P.1.P.3-2	2	2	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.P.3-3	1	2	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.1.P.3-4	2	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
P.1.P.3-5	2	1	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.V.3-1	1	2	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.3-2	3	2	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.3-3	3	1	1	3	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.3-4	2	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.3-5	1	1	3	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.P.3-1	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	-	
P.2.P.3-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mucoral	
P.2.P.3-3	1	1	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mucoral	
P.2.P.3-4	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mucoral	
P.2.P.3-5	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.	Mucoral	
P.2.V.3-1	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.3-2	1	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.,	-	
P.2.V.3-3	2	1	2	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.3-4	3	2	1	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.3-5	3	2	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.P.3-1	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.P.3-2	1	1	-	1	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.1.P.3-3	1	-	-	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras	
C.1.P.3-4	1	1	-	-	-	<i>Aspergillus</i> sp.	Levaduras	
C.1.P.3-5	1	1	1	1	-	<i>Aspergillus</i> sp.	Bacterias	
C.1.V.3-1	1	-	-	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.3-2	-	-	1	-	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.3-3	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.3-4	1	-	2	-	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.3-5	1	-	-	-	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.P.3-1	2	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.3-2	2	3	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Levaduras	
C.2.P.3-3	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.	Levaduras	
C.2.P.3-4	2	2	1	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	-	
C.2.P.3-5	2	2	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.3-1	3	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.3-2	3	2	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.3-3	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	Mucoral	
C.2.V.3-4	1	2	1	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.3-5	-	1	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	Mucoral	

## 3º MUESTREO

PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.3-1	-	-	-	-	-		Levaduras
N.1.P.3-2	1	1	1	-	1	<i>Fusarium</i> sp.	Levaduras
N.1.P.3-3	1	2	-	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	Levaduras
N.1.P.3-4	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.1.P.3-5	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.1.V.3-1	1	2	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
N.1.V.3-2	1	1	1	-	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.3-3	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.3-4	1	1	1	2	-	<i>Fusarium</i> sp.,	-
N.1.V.3-5	1	2	2	-	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.3-1	-	-	-	-	-		Mucoral
N.2.P.3-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.3-3	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.	-
N.2.P.3-4	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.2.P.3-5	1	1	1	3	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.2.V.3-1	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.3-2	1	2	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.3-3	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.3-4	1	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.3-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-

## 4º MUESTREO

PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.4-1	3	5	3	2	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.1.P.4-2	4	4	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.1.P.4-3	4	3	2	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.1.P.4-4	-	-	-	-	-		Mucoral
P.1.P.4-5	3	2	3	6	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.1.V.4-1	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.4-2	1	2	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.4-3	1	2	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.4-4	2	1	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.4-5	3	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.P.4-1	2	1	1	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.P.4-2	1	1	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.P.4-3	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.P.4-4	3	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.P.4-5	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.V.4-1	1	3	3	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.4-2	1	2	2	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.4-3	2	4	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.4-4	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.4-5	2	3	2	3	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-

Anejo II

4º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
C.1.P.4-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.4-2	2	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.1.P.4-3	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.1.P.4-4	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.1.P.4-5	1	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.1.V.4-1	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.4-2	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.4-3	2	2	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.4-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.4-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.P.4-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.4-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.4-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.4-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.4-5	1	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.2.V.4-1	2	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.4-2	2	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.4-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.V.4-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.V.4-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.P.4-1	1	2	-	-	1	<i>Penicillium</i> sp.	Levaduras	
N.1.P.4-2	1	1	-	1	-	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras	
N.1.P.4-3	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.1.P.4-4	4	-	6	2	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bact.,levaduras	
N.1.P.4-5	2	4	4	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
N.1.V.4-1	2	-	-	-	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.4-2	1	-	-	-	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.4-3	-	2	-	1	-	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.4-4	2	-	-	-	-	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.4-5	1	-	-	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.P.4-1	2	2	1	2	2	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.2.P.4-2	1	2	2	2	1	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.2.P.4-3	2	3	1	1	2	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.2.P.4-4	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.2.P.4-5	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
N.2.V.4-1	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.4-2	2	1	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.4-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.4-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.4-5	1	1	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-	

5º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
P.1.P.5-1	1	1	3	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.1.P.5-2	1	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus terreus</i>	-	
P.1.P.5-3	2	1	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.P.5-4	1	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.P.5-5	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.V.5-1	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.V.5-2	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
P.1.V.5-3	2	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.5-4	3	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.5-5	2	2	2	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.P.5-1	1	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.5-2	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
P.2.P.5-3	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.5-4	1	2	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.5-5	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
P.2.V.5-1	3	1	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.5-2	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.5-3	2	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.5-4	2	3	2	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.5-5	3	3	7	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.P.5-1	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.P.5-2	3	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.P.5-3	2	2	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.5-4	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.P.5-5	3	1	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.5-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.5-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.5-3	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.5-4	1	1	3	2	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.5-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.P.5-1	1	1	1	2	2	<i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.2.P.5-2	2	2	2	3	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.2.P.5-3	1	2	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
C.2.P.5-4	3	1	1	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.2.P.5-5	2	1	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias	
C.2.V.5-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.5-2	1	2	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.5-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.5-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.5-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	

**Anejo II**

5º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.5-1	1	1	3	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.5-2	1	2	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.5-3	1	2	1	3	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.5-4	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.1.P.5-5	1	1	2	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.1.V.5-1	1	1	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.5-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.5-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.5-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.5-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.5-1	1	-	-	-	1	<i>Penicillium</i> sp.	Bact.,levaduras
N.2.P.5-2	-	-	1	1	-	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Bact.,levaduras
N.2.P.5-3	-	-	-	-	1	<i>Aspergillus terreus</i>	Levaduras
N.2.P.5-4	1	1	-	-	-	<i>Penicillium</i> sp.	Levaduras
N.2.P.5-5	-	-	2	2	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras
N.2.V.5-1	-	-	-	2	-	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.5-2	-	-	-	-	-		-
N.2.V.5-3	-	1	-	-	-	<i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.5-4	-	-	1	-	-	<i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.5-5	-	-	-	-	-		-

6º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.6-1	2	2	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.6-2	1	1	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.6-3	2	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.6-4	3	1	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.6-5	3	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.V.6-1	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.V.6-2	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.V.6-3	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.V.6-4	1	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.1.V.6-5	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.6-1	1	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.6-2	2	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	Mucoral
P.2.P.6-3	1	2	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.6-4	1	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	-
P.2.P.6-5	2	2	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Mucoral
P.2.V.6-1	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.6-2	3	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.6-3	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.6-4	2	2	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.6-5	2	3	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-

6º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
C.1.P.6-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.6-2	2	2	1	2	3	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	-	
C.1.P.6-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.6-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.6-5	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.V.6-1	2	1	2	1	2	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.6-2	1	2	2	1	1	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.6-3	3	2	2	1	1	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.6-4	2	2	1	2	1	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.6-5	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	-	
C.2.P.6-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.6-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.6-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.6-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.P.6-5	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.2.V.6-1	1	1	2	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
C.2.V.6-2	2	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
C.2.V.6-3	1	2	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
C.2.V.6-4	2	2	1	1	2	<i>Fusarium sp.</i>	-	
C.2.V.6-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.1.P.6-1	1	2	3	2	2	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Bacterias	
N.1.P.6-2	1	1	1	2	1	<i>Fusarium sp.</i>	Bacterias	
N.1.P.6-3	1	3	2	1	1	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Bacterias	
N.1.P.6-4	1	2	1	3	1	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Bacterias	
N.1.P.6-5	3	4	1	1	3	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	-	
N.1.V.6-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.1.V.6-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.1.V.6-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.1.V.6-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.1.V.6-5	2	1	1	2	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.2.P.6-1	2	4	3	4	3	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Bacterias	
N.2.P.6-2	1	4	5	5	2	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	-	
N.2.P.6-3	3	2	3	2	2	<i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	Bacterias	
N.2.P.6-4	5	5	7	3	3	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	-	
N.2.P.6-5	3	2	2	2	3	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>	-	
N.2.V.6-1	1	2	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.2.V.6-2	1	1	1	2	2	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	-	
N.2.V.6-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.2.V.6-4	1	1	1	2	1	<i>Fusarium sp.</i>	-	
N.2.V.6-5	1	1	1	2	5	<i>Fusarium sp.</i>	-	

Anejo II

7º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.7-1	1	1	1	1	2	<i>Aspergillus flavus</i>	-
P.1.P.7-2	1	2	3	3	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	Mucoral
P.1.P.7-3	1	2	3	3	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
P.1.P.7-4	2	1	3	2	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
P.1.P.7-5	3	2	4	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
P.1.V.7-1	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.1.V.7-2	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.1.V.7-3	2	2	2	3	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.1.V.7-4	2	2	3	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.1.V.7-5	3	3	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.2.P.7-1	2	2	3	2	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.2.P.7-2	1	1	1	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
P.2.P.7-3	3	4	2	3	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
P.2.P.7-4	3	2	4	2	4	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
P.2.P.7-5	3	3	3	1	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
P.2.V.7-1	2	2	3	1	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
P.2.V.7-2	4	4	2	2	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
P.2.V.7-3	3	2	3	4	4	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
P.2.V.7-4	3	3	5	4	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
P.2.V.7-5	2	2	3	4	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
C.1.P.7-1	2	2	2	3	2	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.1.P.7-2	1	5	1	3	3	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.1.P.7-3	2	2	1	3	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.1.P.7-4	3	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.1.P.7-5	2	4	1	2	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.1.V.7-1	2	-	1	1	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-
C.1.V.7-2	1	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
C.1.V.7-3	1	2	-	1	1	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	-
C.1.V.7-4	1	3	2	1	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
C.1.V.7-5	1	3	1	1	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	-
C.2.P.7-1	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus sp., Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.2.P.7-2	2	3	3	2	3	<i>Aspergillus sp., Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.2.P.7-3	2	1	4	2	2	<i>Aspergillus sp., Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	Bacterias
C.2.P.7-4	-	-	-	-	-		Mucoral
C.2.P.7-5	4	4	5	2	1	<i>Aspergillus sp., Aspergillus sp., Fusariums sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias
C.2.V.7-1	2	2	1	1	1	<i>Fusarium sp.,</i>	-
C.2.V.7-2	1	2	2	1	1	<i>Fusarium sp.,</i>	-
C.2.V.7-3	4	1	2	2	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
C.2.V.7-4	2	1	5	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-
C.2.V.7-5	1	2	3	3	4	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-

7º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.7-1	3	3	4	5	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.1.P.7-2	4	1	4	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.7-3	2	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.7-4	3	2	2	3	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.7-5	2	5	3	4	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.7-1	2	2	3	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.7-2	2	1	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.7-3	3	3	3	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.7-4	2	1	2	3	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.7-5	2	1	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.7-1	4	4	3	1	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.7-2	5	3	3	4	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Levaduras
N.2.P.7-3	3	5	3	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.2.P.7-4	4	3	1	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.7-5	5	2	6	5	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.2.V.7-1	1	2	2	1	3	<i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.7-2	3	2	1	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.7-3	3	1	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.7-4	2	2	3	1	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.7-5	3	3	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
8º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.8-1	4	3	5	4	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.8-2	3	4	3	5	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.1.P.8-3	3	2	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.8-4	4	2	3	4	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.8-5	4	4	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.V.8-1	2	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.8-2	2	3	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.8-3	4	3	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.8-4	2	3	4	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.8-5	3	1	1	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.P.8-1	3	3	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.8-2	4	4	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.8-3	3	3	4	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.8-4	4	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.8-5	3	3	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.V.8-1	2	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.8-2	1	2	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.8-3	1	2	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.8-4	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.8-5	1	1	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-

**Anejo II**

<b>8º MUESTREO</b>							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.8-1	2	2	3	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.1.P.8-2	2	2	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.8-3	3	2	2	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.1.P.8-4	6	4	3	4	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.1.P.8-5	5	4	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.8-1	-	-	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-
N.1.V.8-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.8-3	2	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-
N.1.V.8-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.8-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.8-1	2	2	4	3	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.2.P.8-2	1	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.8-3	2	3	1	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.8-4	3	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
N.2.P.8-5	2	2	2	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.8-1	3	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.8-2	2	3	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.8-3	2	2	3	3	1	<i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.8-4	3	3	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.8-5	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
<b>9º MUESTREO</b>							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.9-1	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	Mucoral
P.1.P.9-2	-	-	-	-	-		Mucoral
P.1.P.9-3	2	2	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.9-4	1	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.9-5	2	2	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.V.9-1	2	3	2	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.9-2	1	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.9-3	2	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.9-4	3	3	1	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	Mucoral
P.1.V.9-5	1	2	3	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.P.9-1	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.P.9-2	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.P.9-3	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.P.9-4	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.P.9-5	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.V.9-1	1	2	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.9-2	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.9-3	2	1	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.9-4	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.9-5	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-

9º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
C.1.P.9-1	6	4	5	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.9-2	5	4	4	6	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.9-3	4	4	3	4	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.9-4	2	3	1	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral	
C.1.P.9-5	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.V.9-1	5	6	6	6	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.9-2	5	8	5	7	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.9-3	5	6	3	5	4	, <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.9-4	4	6	6	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.9-5	3	4	6	5	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., , <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.9-1	2	3	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.9-2	2	3	3	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.9-3	3	2	4	1	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.9-4	2	2	1	2	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.9-5	3	4	2	2	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.V.9-1	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.9-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.9-3	2	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.9-4	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.9-5	1	2	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.P.9-1	5	3	3	6	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.9-2	2	2	1	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.9-3	2	3	1	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.9-4	2	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.9-5	3	2	4	1	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
N.1.V.9-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.9-2	1	1	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.9-3	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.9-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.9-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.P.9-1	2	2	2	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.9-2	3	3	1	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.9-3	2	2	1	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.9-4	2	3	2	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.9-5	1	2	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
N.2.V.9-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.9-2	1	1	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.9-3	2	1	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.9-4	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.9-5	1	1	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	

**Anejo II**

10º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
P.1.P.10-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.10-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.10-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.10-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.10-5	1	2	2	2	1	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	-	
P.1.V.10-1	1	3	3	2	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	
P.1.V.10-2	1	2	2	3	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	
P.1.V.10-3	1	1	3	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-	
P.1.V.10-4	1	1	3	2	3	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	
P.1.V.10-5	3	4	3	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	
P.2.P.10-1	5	4	5	7	6	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	-	
P.2.P.10-2	5	4	5	4	3	<i>Penicillium sp.</i>	-	
P.2.P.10-3	3	4	5	4	6	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias	
P.2.P.10-4	3	5	3	2	4	<i>Aspergillus sp., Penicillium sp.</i>	Bacterias	
P.2.P.10-5	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.2.V.10-1	3	2	2	3	2	<i>Penicillium sp.</i>	-	
P.2.V.10-2	2	4	2	3	2	<i>Penicillium sp.</i>	-	
P.2.V.10-3	2	3	1	4	2	<i>Penicillium sp.</i>	-	
P.2.V.10-4	3	4	2	3	3	<i>Aspergillus sp.,</i>	-	
P.2.V.10-5	3	4	2	1	3	<i>Aspergillus sp.,</i>	Bacterias	
C.1.P.10-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.10-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.10-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.10-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.10-5	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.V.10-1	1	2	1	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.10-2	1	3	1	2	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.10-3	1	2	2	1	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.10-4	2	2	1	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-	
C.1.V.10-5	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	-	
C.2.P.10-1	4	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	Bacterias	
C.2.P.10-2	1	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	Bacterias	
C.2.P.10-3	3	2	2	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	Bacterias	
C.2.P.10-4	3	2	2	3	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	Bacterias	
C.2.P.10-5	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.</i>	Bacterias	
C.2.V.10-1	4	3	1	2	3	<i>Fusarium sp.,</i>	-	
C.2.V.10-2	2	2	3	2	4	<i>Fusarium sp.,</i>	-	
C.2.V.10-3	4	4	3	2	2	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	
C.2.V.10-4	2	2	3	2	4	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	
C.2.V.10-5	3	2	4	2	4	<i>Aspergillus sp., Fusarium sp.,</i>	-	

10º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.10-1	2	3	4	2	2	<i>Acremonium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.10-2	3	2	3	2	2	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.10-3	3	4	3	3	3	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.P.10-4	2	4	3	3	4	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.10-5	5	2	3	3	4	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.10-1	2	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.10-2	1	1	1	2	2	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.10-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.10-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.10-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.10-1	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.10-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.10-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.2.P.10-4	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.10-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
N.2.V.10-1	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.10-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.10-3	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.10-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.10-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	Bacterias
11º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.11-1	2	3	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.11-2	-	-	-	-	-		Mucoral
P.1.P.11-3	-	-	-	-	-		Mucoral
P.1.P.11-4	3	4	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.1.P.11-5	3	3	4	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.1.V.11-1	3	2	3	2	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.11-2	2	2	2	4	3	<i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.11-3	3	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.11-4	3	3	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.11-5	3	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.P.11-1	-	-	-	-	-		Mucoral
P.2.P.11-2	3	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.P.11-3	2	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.P.11-4	3	3	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.P.11-5	4	1	2	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.V.11-1	3	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.11-2	5	3	4	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.11-3	3	3	2	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.11-4	3	3	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.V.11-5	1	2	2	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-

Anejo II

11º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
C.1.P.11-1	5	6	5	4	3	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.11-2	5	4	6	5	7	<i>Acremonium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.11-3	7	8	5	7	5	<i>Acremonium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
C.1.P.11-4	5	4	6	7	6	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
C.1.P.11-5	3	6	7	4	4	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias	
C.1.V.11-1	1	2	3	1	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.V.11-2	1	2	3	2	3	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.V.11-3	2	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.V.11-4	2	2	2	2	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.V.11-5	3	3	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.P.11-1	3	2	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.11-2	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.11-3	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.11-4	3	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.11-5	1	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.V.11-1	1	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.11-2	2	2	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.11-3	1	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.11-4	1	2	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.11-5	1	2	1	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.P.11-1	1	2	4	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.11-2	3	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral	
N.1.P.11-3	2	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.11-4	2	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.11-5	2	2	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.V.11-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.11-2	1	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.11-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.11-4	1	2	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.11-5	2	1	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.P.11-1	3	2	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.11-2	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.11-3	1	2	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.11-4	2	2	4	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.11-5	4	2	2	2	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.V.11-1	2	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.11-2	2	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.11-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.11-4	1	1	3	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.11-5	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	

12º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
P.1.P.12-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.12-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.12-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.12-4	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.P.12-5	-	-	-	-	-		Mucoral	
P.1.V.12-1	3	2	4	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.12-2	2	3	3	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.12-3	3	3	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.12-4	2	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.1.V.12-5	3	2	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.P.12-1	4	4	3	5	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.12-2	5	4	4	6	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.12-3	4	3	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral	
P.2.P.12-4	4	5	6	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.P.12-5	4	4	4	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
P.2.V.12-1	1	2	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.12-2	3	2	2	1	4	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.12-3	2	3	2	2	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.12-4	2	3	2	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
P.2.V.12-5	2	2	2	3	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.1.P.12-1	5	4	3	4	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.12-2	5	4	6	4	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.12-3	5	4	3	5	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.12-4	4	4	8	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.12-5	5	6	6	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.12-1	2	3	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.12-2	2	3	2	3	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.12-3	2	3	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.12-4	2	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.12-5	3	4	2	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.12-1	4	3	4	4	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.12-2	3	5	4	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.12-3	3	2	4	6	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.12-4	3	2	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.12-5	3	3	2	3	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.V.12-1	1	2	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.12-2	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.12-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.12-4	2	2	2	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.V.12-5	2	2	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	

**Anejo II**

<b>12º MUESTREO</b>							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
N.1.P.12-1	5	3	4	4	5	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.12-2	7	5	7	4	8	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.12-3	3	5	4	4	5	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.12-4	5	4	6	7	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.P.12-5	3	3	4	5	7	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.1.V.12-1	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.12-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.12-3	1	2	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.12-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.1.V.12-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.P.12-1	5	5	4	7	8	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.12-2	5	6	4	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.12-3	4	7	8	6	7	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.P.12-4	5	4	5	7	-	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
N.2.V.12-1	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.12-2	2	1	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.12-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
N.2.V.12-4	3	4	2	1	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
<b>13º MUESTREO</b>							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.13-1	4	3	4	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.1.P.13-2	3	4	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.1.P.13-3	-	-	-	-	-		Mucoral
P.1.P.13-4	3	4	3	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.13-5	-	-	-	-	-		Mucoral
P.1.V.13-1	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.13-2	2	1	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.13-3	2	2	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.13-4	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.13-5	2	2	1	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.P.13-1	3	2	5	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.13-2	5	3	4	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.13-3	3	5	4	4	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.13-4	2	4	3	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.13-5	3	2	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.V.13-1	2	2	2	3	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.13-2	1	2	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.13-3	1	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.13-4	2	3	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.13-5	3	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-

## 13º MUESTREO

PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
C.1.P.13-1	3	2	3	2	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.13-2	3	2	4	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.1.P.13-3	2	2	3	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.1.P.13-4	3	2	3	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.1.P.13-5	2	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.1.V.13-1	1	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.13-2	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.13-3	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.13-4	3	3	1	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.13-5	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.P.13-1	6	5	7	6	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.13-2	3	5	6	4	7	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.13-3	5	7	4	6	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.13-4	3	5	5	5	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.13-5	3	3	5	4	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.V.13-1	1	2	1	1	3	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.13-2	2	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.13-3	2	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.13-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.13-5	2	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-

## 14º MUESTREO

PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
P.1.P.14-1	4	3	4	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.14-2	3	4	3	5	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.1.P.14-3	2	3	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.1.P.14-4	3	3	5	4	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.P.14-5	2	3	4	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.1.V.14-1	1	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.1.V.14-2	2	2	3	1	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.14-3	2	2	2	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.14-4	3	2	2	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.1.V.14-5	3	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
P.2.P.14-1	2	3	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
P.2.P.14-2	2	2	4	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.P.14-3	3	3	4	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
P.2.P.14-4	3	3	4	3	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.2.P.14-5	3	2	4	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Mucoral
P.2.V.14-1	2	2	3	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.14-2	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.14-3	1	1	2	2	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.14-4	1	1	1	1	3	<i>Fusarium</i> sp.	-
P.2.V.14-5	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-

Anejo II

14º MUESTREO								
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS	
C.1.P.14-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.14-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
C.1.P.14-3	5	4	4	5	7	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.14-4	7	4	6	5	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.P.14-5	7	5	6	7	4	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.1.V.14-1	2	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.14-2	2	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.14-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.14-4	2	1	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
C.1.V.14-5	2	1	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
C.2.P.14-1	3	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.14-2	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.14-3	2	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.14-4	3	3	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.P.14-5	2	2	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
C.2.V.14-1	3	2	2	2	4	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.14-2	2	2	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.14-3	2	3	1	2	2	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.14-4	3	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
C.2.V.14-5	3	2	2	2	1	<i>Fusarium</i> sp.,	-	
N.1.P.14-1	-	-	-	-	-		Mucoral	
N.1.P.14-2	-	-	-	-	-		Mucoral	
N.1.P.14-3	-	-	-	-	-		Mucoral	
N.1.P.14-4	3	4	3	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.P.14-5	2	2	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.1.V.14-1	2	1	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.14-2	1	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.14-3	2	2	1	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.14-4	2	2	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.1.V.14-5	2	2	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.P.14-1	2	2	3	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.P.14-2	1	2	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.2.P.14-3	2	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.2.P.14-4	2	1	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp.	-	
N.2.P.14-5	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-	
N.2.V.14-1	2	3	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
N.2.V.14-2	2	2	2	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
N.2.V.14-3	2	2	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	
N.2.V.14-4	3	3	2	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-	
N.2.V.14-5	2	1	2	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.	-	

15º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
C.1.P.15-1	2	3	3	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.15-2	3	2	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.15-3	1	1	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.15-4	1	1	1	2	1	<i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.15-5	2	2	1	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.V.15-1	3	3	2	2	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.V.15-2	2	2	1	1	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.V.15-3	2	4	2	3	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.V.15-4	2	1	2	2	2	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.V.15-5	3	3	4	3	4	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.2.P.15-1	4	3	3	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.15-2	5	4	3	3	6	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.15-3	5	4	4	2	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.15-4	4	3	7	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.15-5	4	2	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.V.15-1	3	4	2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
C.2.V.15-2	1	2	1	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.,	-
C.2.V.15-3	2	2	1	3	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.2.V.15-4	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.2.V.15-5	1	2	1	1	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
16º MUESTREO							
PLACA	G1	G2	G3	G4	G5	HONGOS	OTROS
C.1.P.16-1	3	2	2	4	1	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.16-2	3	3	3	4	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.16-3	6	3	3	2	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.1.P.16-4	2	3	2	1	2	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.P.16-5	1	3	2	3	3	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-
C.1.V.16-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.16-2	1	2	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.16-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.16-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.1.V.16-5	1	2	2	2	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.P.16-1	-	-	-	-	-		Mucoral
C.2.P.16-2	-	-	-	-	-		Mucoral
C.2.P.16-3	-	-	-	-	-		Mucoral
C.2.P.16-4	4	4	3	3	5	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Bacterias
C.2.P.16-5	-	-	-	-	-		Mucoral
C.2.V.16-1	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.16-2	1	1	2	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.16-3	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.16-4	1	1	1	1	1	<i>Fusarium</i> sp.	-
C.2.V.16-5	2	1	1	1	3	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	-

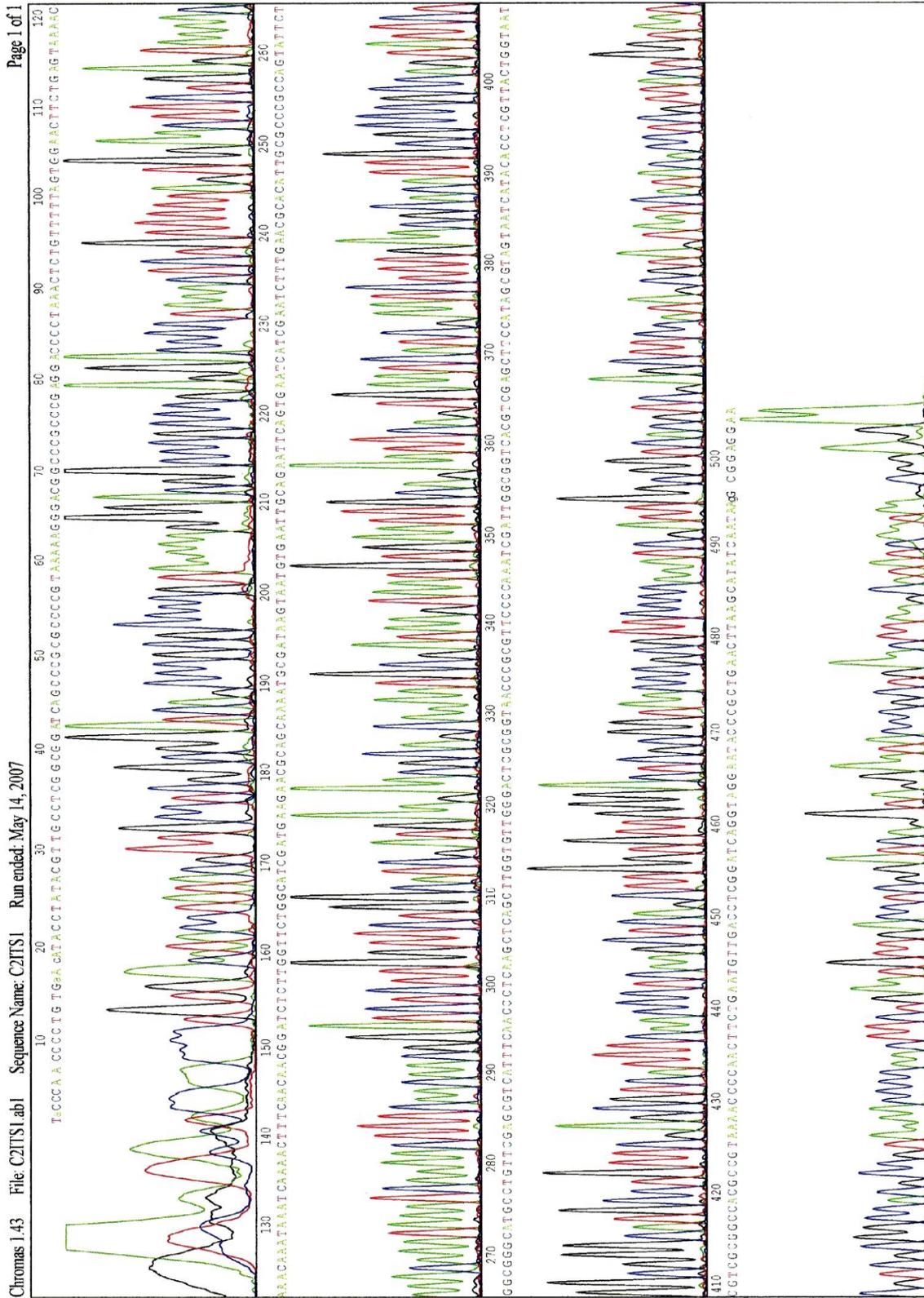


Figura 32. Electroferograma obtenido mediante programa CHROMAS. Secuencia “hacia delante” (forward). Aislado F30P51

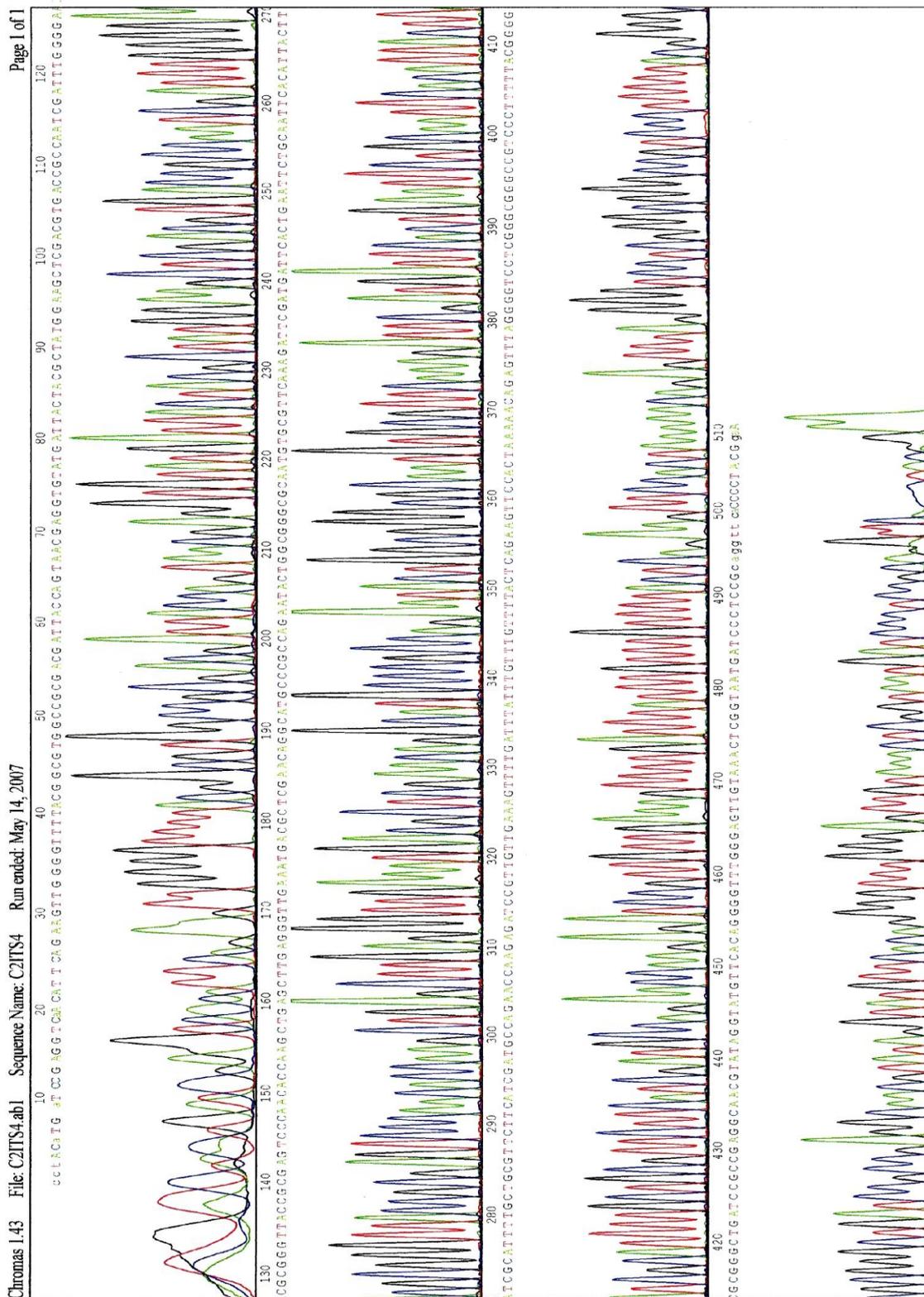


Figura 33. Electroferograma obtenido mediante programa CHROMAS. Secuencia “hacia atrás” (reverse) Aislado F30P51

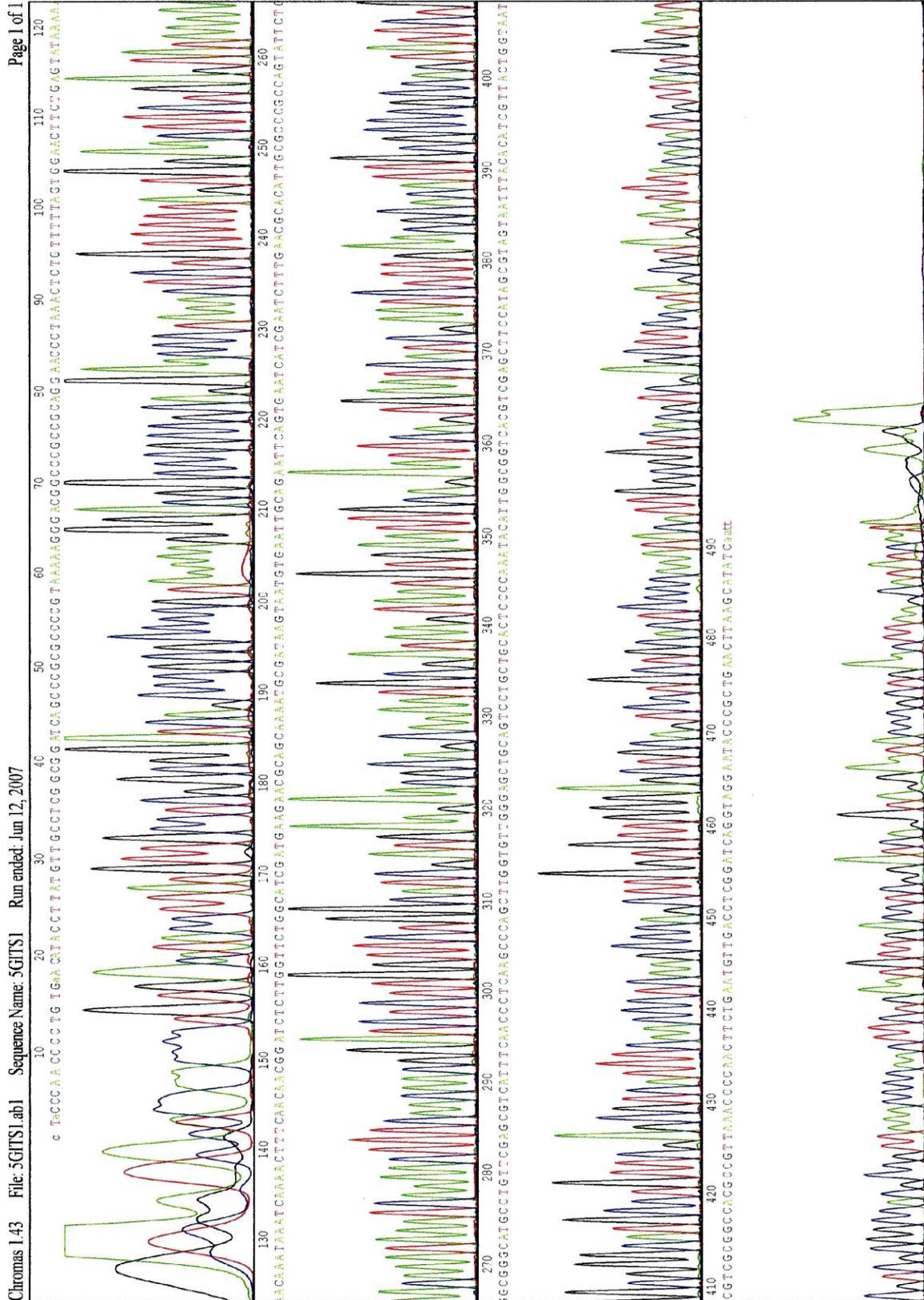


Figura 34. Electroferograma obtenido mediante programa CHROMAS. Secuencia "hacia delante" (forward). Aislado P 5.5.1



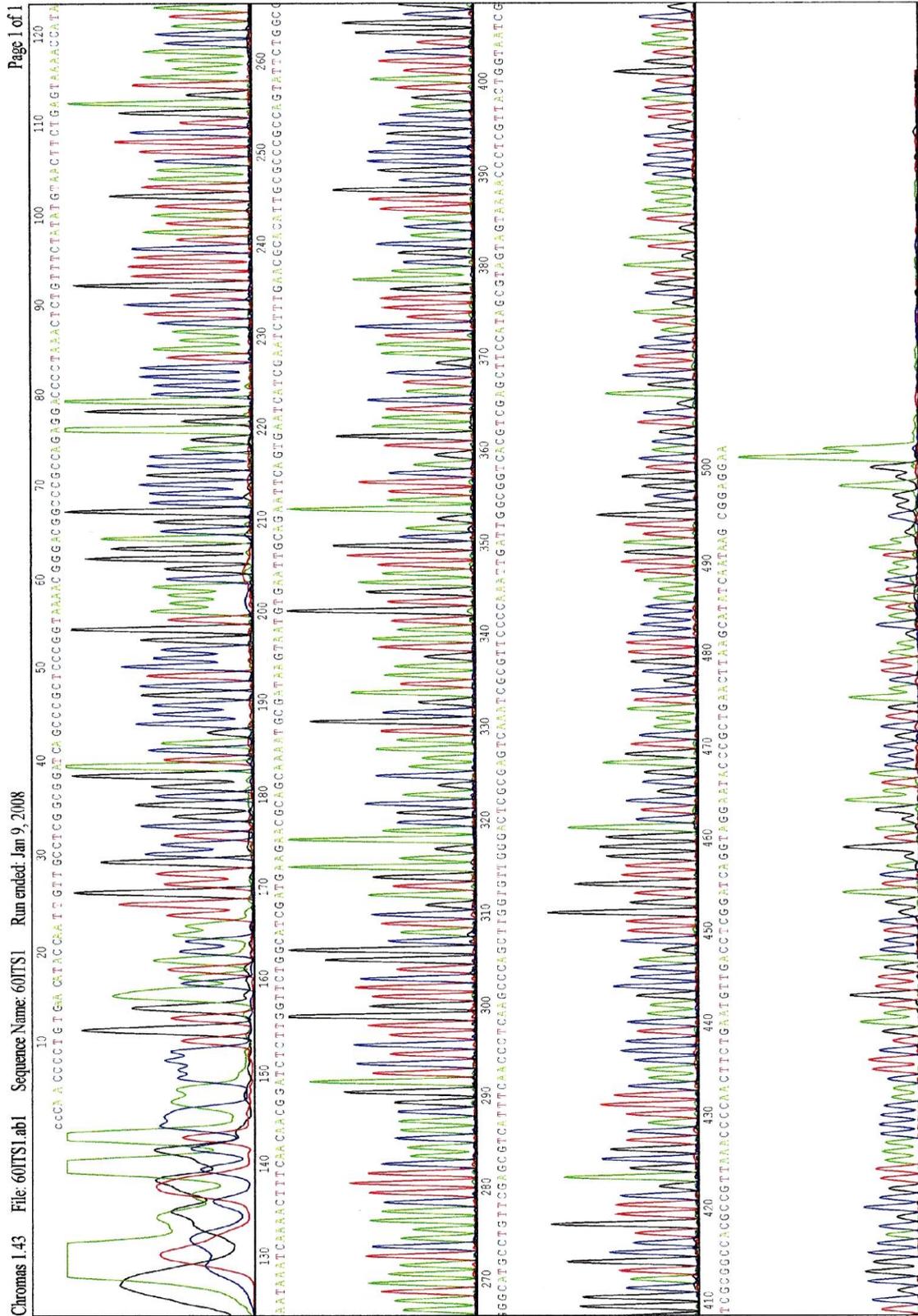


Figura 36. Electroferograma obtenido mediante programa CHROMAS. Secuencia “hacia delante” (forward). Aislado P.2.V.4-4

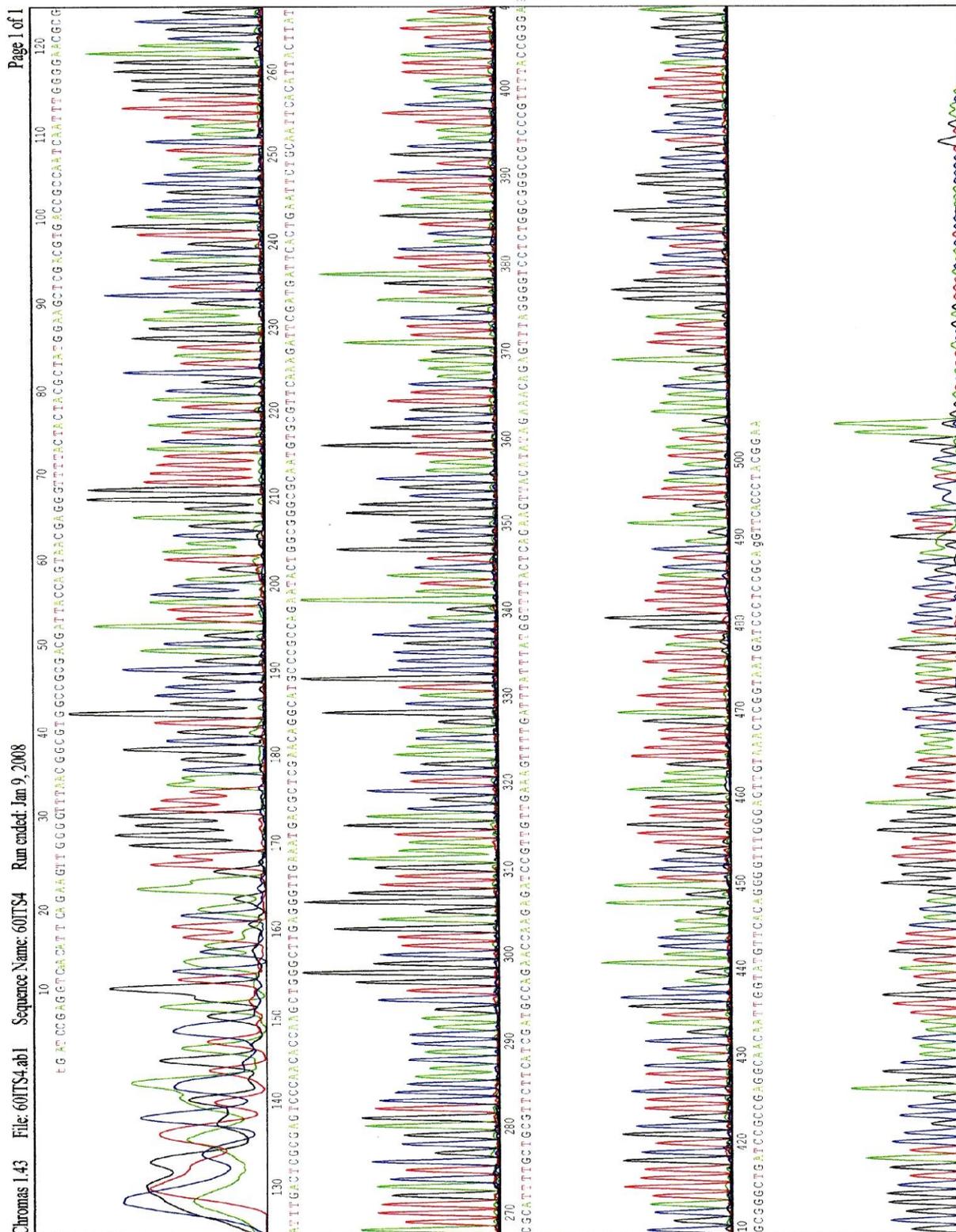


Figura 37. Electroferograma obtenido mediante programa CHROMAS. Secuencia “hacia atrás” (reverse). Aislo P.2.V.4-4

Yo vengo de montañas que se abrazan,  
de selvas y montes que cantan,  
de ríos y quebradas que ríen;  
donde se disfruta bien,  
lo bueno que es ser hombre, Colombia.

Gracias a Dios

