

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DETERMINACIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE TOXICOGÉNICOS EN
ENSILAJES DE MAÍZ, ALFALFA, TRITICALE Y AVENA

Tesis

Que presenta JAZMÍN JANET VELÁZQUEZ GUERRERO

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Junio 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



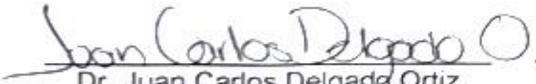
DETERMINACIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE TOXICOGÉNICOS EN
ENSILAJES DE MAÍZ, ALFALFA, TRITICALE Y AVENA

Tesis

Que presenta JAZMÍN JANET VELÁZQUEZ GUERRERO

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA


Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Director (UAAAN)


Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz
Director Externo

DETERMINACIÓN DE HONGOS POTENCIALMENTE TOXICOGÉNICOS EN
ENSILAJES DE MAÍZ, ALFALFA, TRITICALE Y AVENA

Tesis

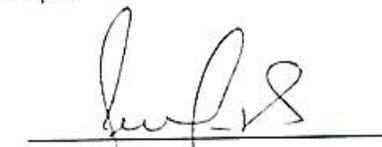
Elaborada por JAZMÍN JANET VELÁZQUEZ GUERRERO como requisito
parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Yisa María Ochoa Fuetes
Asesor principal



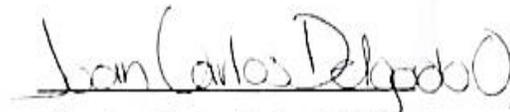
Dr. Ernesto Cerna Chávez
Asesor



Dr. Jerónimo Landeros Flores
Asesor



Dr. Teódulo Quezada Tristán
Asesor



Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante todo este tiempo, para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, que me abrió sus puertas y me dio la oportunidad de estudiar en ella.

Al Departamento de Parasitología Agrícola, por todas sus enseñanzas y todo su apoyo, ya que siempre fue incondicional.

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, No me alcanzaría la vida, ni las palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí, ya que desde el primer día que la conocí, usted creyó en mí, me brindó su apoyo incondicional y desde entonces hasta hoy usted es una de mis mayores fuerzas e inspiraciones para seguir adelante. ¡Gracias por estar en mi vida!

Dr. Ernesto Cerna Chávez le agradezco toda su confianza depositada en mí y por todo el apoyo que siempre me brindo, créame que lo valoro mucho.

Dr. Jerónimo Landeros Flores muchas gracias por todos sus consejos y sabias palabras, siempre llegaban en el momento que más las necesitaba.

Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz muchas gracias en verdad por todo tu apoyo, tiempo, enseñanza y paciencia para la realización de esta investigación.

Dr. Teódulo Quezada Tristán, han sido muchos los años y muchas las experiencias vividas juntos, desde licenciatura siendo mi maestro, en maestría siendo mi tutor y en Doctorado formando parte de mi comité, gracias por su paciencia, pero sobre todo, gracias por confiar en mí.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi pequeña y hermosa familia, que son mi motor y mi apoyo incondicional; a mi esposo Roberto ya que con su amor infinito, siempre he tenido un pilar en donde apoyarme; a mis hijas Dany y Dianita que son lo más grande que me ha dado la vida y soy muy afortunada en tenerlas; a mis papas y mis hermanos, ya que es la primera vez que me alejo de ellos para seguir mi sueño, no fue nada fácil pero era necesario y valió la pena. ¡Los amo mucho!



Texcoco, Estado de México, 05 de agosto del 2019.
Núm. Ref.: 1987-19

Dr. Yisa María Ochoa- Fuentes
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
P r e s e n t e

Por este medio le agradezco y acuso de recibido su manuscrito intitulado: **“Primer reporte de *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa”** cuyos autores (as) **Jazmín Janet Velázquez Guerrero, Ernesto Cerna Chávez, Juan Carlos Delgado Ortiz, Anselmo Hernández Perez, Teódulo Quezada Tristán y Yisa María Ochoa Fuentes**, que fue enviado para su posible publicación a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Le notificamos que el texto inicial del manuscrito, autores(as) principal y los coautores(as), autor(a) para correspondencia no podrán alterarse y quedaran como se envía en esta versión.

Asimismo, me permito informarle que su contribución será sometida a revisión técnica por los árbitros que se designen en caso de ser aceptado, se le notificará sobre las observaciones correspondientes.

Agradezco su colaboración y le envío un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Dora Ma. Sangerman-Jarquín
Editora en Jefa de la Revista
Mexicana de Ciencias Agrícolas

c.c.p. * Archivo
DMSJ/jgm

Recepción de artículo monascus

----- Forwarded Message -----

From: Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas <revista_atm@yahoo.com.mx>

To: yisa8a@yahoo.com <yisa8a@yahoo.com>

Sent: Monday, August 5, 2019, 11:02:40 AM CDT

Subject: Acuse de recibido de manuscrito 1987-19

Estimada doctora Ochoa- Fuentes,

Buenos días, por medio de este correo me permito enviar el acuse de recibo del manuscrito con número de referencia 1987-19: “ **Primer reporte de *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa**”, el cual fue enviado para su posible publicación a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Le notificamos que el texto inicial del manuscrito, autores(as) principal, coautores(as) y autor(a) para correspondencia no podrán alterarse y quedarán como se envía en esta versión.

Asimismo, me permito informarle que su contribución será sometida a revisión técnica por los árbitros que se designen en caso de ser aceptado, se le notificará sobre las observaciones correspondientes.

Pido de la manera más atenta incorpore en plataforma figuras en formato JPG o en archivo Excel de ser el caso de gráficas, además de proporcionarnos los correos electrónicos de todos los autores(as).

Saludos cordiales,

Lic. Jazmin Gonzalez

Asistente Editorial

Dra. Dora M. Sangerman-Jarquín

Editora en Jefa de la Revista

Mexicana de Ciencias Agrícolas

Campo Experimental Valle de México

Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5

Coatlinchan, Texcoco, Edo. de México, México

C. P. 56250. Tel. 55 38 71 87 00 Ext. 85353

Skype: remexca

Facebook: Remexca

<http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/>

ISSN impreso: 2007-0934

ISSN on line: 2007-9230

4/11/2019

Scientia Fungorum

Tareas 0

Envíos

🌐 Español (España)

👁 Ver el sitio

👤 yochoafuentes



Envíos

Envíos

Mi lista

Archivos

📄 Ayuda

Mis envíos asignados

Nuevo envío

🔍 Buscar

1246

Jazmin Janet Velazquez Guerrero...
Primer reporte de Monascus ruber...

🔄 Revisión

👤 2/2

1 de 1 envíos

Platform &
workflow by
OJS / PKP

----- Forwarded Message -----

From: Gerardo Mata <gerardo.mata@inecol.mx>
To: Dra. Yisa María Ochoa Fuentes <yisa8a@yahoo.com>
Sent: Friday, February 1, 2019, 12:06:59 PM CST
Subject: [SF] Acuse de recibo de envío

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes:

Gracias por enviar el manuscrito, "Primer reporte de *Monascus ruber* en ensilaje de maíz y alfalfa en México" a *Scientia Fungorum*. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial:

URL del manuscrito:

<http://www.scientiafungorum.org.mx/index.php/micologia/author/submission/1246>

Nombre de usuario/a: yochoafuentes

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Gerardo Mata
Scientia Fungorum

Scientia Fungorum
scientiafungorum.org.mx



Envíos activos

ACTIVO/A ARCHIVAR

ID	DOI-REV Envío	SECC	AUTORES	TÍTULO	ESTADO
5221	01-16	ART	Velazquez, Rios Valadez, Cerna...	DETERMINACIÓN DE HONGOS TOXICOGÉNICOS EN ENSILAJE DE MAÍZ	EN REVISIÓN

Elementos 1 - 1 de 1

Empezar un nuevo envío

[HAGA CLIC AQUÍ](#) para ir al primer paso del proceso de envío en cinco pasos.

Enlaces reback

TODOS NUEVO PUBLICADO OMITIDOS



ISSN e: 2448-6698



Journal Citation Reports 0.884

Scimago Journal Rank en
Scopus 0.260



Enlaces reback
Inicio
Inicio

: Fw: [RMCP] Seguimiento a manuscrito ID 5221

----- Forwarded Message -----

From: Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias <rev.mex.cienc.pecu@gmail.com>

To: "yisa8a@yahoo.com" <yisa8a@yahoo.com>

Cc: "cienciaspecuarias@inifap.gob.mx" <cienciaspecuarias@inifap.gob.mx>

Sent: Monday, December 16, 2019, 09:05:28 AM CST

Subject: Fwd: [RMCP] Seguimiento a manuscrito ID 5221

****ESCRIBO DESDE ESTE CORREO POR ÚNICA OCASIÓN, TENEMOS PROBLEMAS TÉCNICOS EN EL SERVIDOR DE INIFAP, FAVOR DE CONFIRMAR DE RECIBIDO AL CORREO INSTITUCIONAL, GRACIAS****

De: REVISTA PECUARIA INIFAP

Enviado: jueves, 12 de diciembre de 2019 12:02 p. m.

Para: Yisa Ochoa

Asunto: Re: Seguimiento a manuscrito

Estimada Dra. Ochoa,

Su manuscrito se encuentra en revisiones, unos de los revisores no ha dado su recomendación. Me pondré en contacto con el editor de sección para verificar que se lleve el proceso.

Estamos en contacto.

Saludos cordiales,

MVZ. Arturo García Fraustro

Editor en Jefe de la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

INIFAP, CENID-Microbiología Animal

Km. 15.5 Carretera México-Toluca

Colonia Palo Alto. México, D.F. 05110

Tel. 01 (55) 38 71 87 00 ext. 80316

cienciaspecuarias@inifap.gob.mx

<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>

INTRODUCCIÓN

En producción de carne a nivel mundial México ocupa el octavo lugar por debajo de USA, Brasil, Unión Europea, China, India, Argentina y Australia (SIAP, 2018) con una producción de 1´495,818 de cabezas de ganado de los cuales 1´121,057 son rumiantes en México; Veracruz, Jalisco, Chiapas, San Luis Potosí y Sinaloa son los estados que representan la mayor producción de ganado bovino, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas representan el 20% de la producción de cabezas de ganado a nivel nacional, con un valor económico de \$23´348,656 (SIAP, 2017). La dieta base de este tipo de ganado está constituida por, concentrado (maíz rolado, sorgo), aditivos nutricionales rico en vitaminas, minerales y forraje como es el caso del ensilaje; el propósito principal del ensilaje es maximizar la preservación de nutrientes originales del cultivo forrajero y evitar la disminución en la calidad nutricional (Alonso *et al.*, 2013). El ensilaje es de gran importancia en los sistemas de producción del ganado lechero en todo el mundo y en la producción del ganado de carne en Europa y América, debido a que representa entre un 45 a 60% en su ración diaria de alimento (Keady *et al.*, 2008; Millen *et al.*, 2009; Alpizar., 2015). Uno de los riesgos a lo largo del proceso de elaboración del ensilaje es la contaminación por hongos, un incremento fúngico en el ensilaje conduce a la pérdida de nutrientes y de materia seca, disminuyendo la palatabilidad y consumo de ensilaje, que genera como consecuencia las pérdidas en el rendimiento en ganancia de peso y producción de leche del animal (Garon *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2013), datos reportados por varios autores indican que los hongos que se encuentran con mayor frecuencia en los ensilajes de maíz son: *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp y *Geotrichum* spp. (Reyes- Velázquez *et al.*, 2008; Keller *et al.*, 2012; Alpizar., 2015); otros autores como Baliukoniene y colaboradores (2012), al igual que Keller colaboradores (2012) reportan la presencia de los generos de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* en ensilaje de trébol, ryegrass, sorgo, triticale, avena y mezcla de pastos en los países de Lituania y Brasil; varias especies de estos géneros de hongos pueden producir

micotoxinas como: Zearalenona, Aflatoxina, Fumonisina, Ocratoxina y Tricotecenos (Gallo et al., 2016; Loi et al., 2017), cuando los animales se alimentan con ensilajes contaminados con estas micotoxinas, estas son capaces de ocasionar: disminución en la ingesta de alimentos, problemas reproductivos, problemas renales, hepáticos, baja producción en carne y leche, inmunosupresión y muerte (Ogunade et al., 2018).

Justificación

La contaminación natural de los ensilajes por hongos como *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp y *Penicillium* spp, en la alimentación del ganado bovino, tiene un impacto económico en las explotaciones pecuarias a nivel mundial, debido a que estos hongos son catalogados como toxicogénicos, debido a su capacidad de producir micotoxinas como Aflatoxina B1 y Zearalenona, ya que afectan la salud animal, disminuyen las ganancias de peso, la eficiencia alimenticia, la fertilidad, aumenta los problemas metabólicos debido a la demanda de forrajes e incluso llegar a producir la muerte de los animales por una intoxicación aguda debido al consumo de micotoxinas, por tal motivo es valiosa, la identificación de estos agentes patológicos, para prevenir enfermedades y pérdidas económicas.

Hipótesis

Existen hongos toxicogénicos como *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* que generan micotoxinas como Aflatoxina, Fumonisina, Deoxinivalenol (DON), Zearalenona y Ocratoxina que pudieran desarrollarse en el ensilaje utilizado para el consumo de los rumiantes.

Objetivo General

Identificar los hongos que se encuentran presentes en el ensilaje y determinar, la presencia de genes precursores de micotoxinas, en los aislados obtenidos.

Objetivo Específico

Identificar los hongos que se encuentran presentes en los ensilajes de maíz, avena, triticale y alfalfa; determinar la presencia de genes precursores de micotoxinas de los diferentes hongos obtenidos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de la ganadería

La ganadería trata de criar, medicar y reproducir animales domésticos de la mejor calidad para el consumo humano. A nivel mundial en el año 2018 la producción de carne bovina alcanzó las 63 millones de toneladas, incrementándose en un 3% la producción con respecto a 2014. Los principales países productores de carne bovina a nivel mundial son: Estados Unidos, Brasil, Unión Europea, China, India, Argentina, Australia y México los cuales generan el 78% de la producción global (SIAP, 2018); México es un país ganadero del cual se destinan 109.8 millones de hectáreas en la que se produce ganado de tipo bovino, porcino, ovino, caprino y avícola, ocupando el 8° lugar en producción mundial de ganadería (SIAP, 2018).

Cuadro 1. Participación en la producción mundial de carne bovina, 2018.

País	Producción mundial de carne (%)
E.U.A	20
Brasil	15.7
Unión Europea	12.5
China	11.6
India	6.8
Argentina	4.6
Australia	3.7
México	3.2
Otros	21.9

SIAP/FAS (2018)

A nivel mundial, México ocupa el octavo lugar debido a su producción de 1'904,000 toneladas carne (CIMA, 2018) y una productividad de 1'495,818 de cabezas de ganado de los cuales 1'121,057 son rumiante; Veracruz con 257,935 t, Jalisco 238,586 t y San Luis Potosí 121,493 t son los estados con mayor producción de carne bovina en México; Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas representan el 20% de la producción de cabezas de ganado a nivel

nacional, con un valor económico de \$23´348, 656 (SIAP, 2017); el consumo anual per cápita de carne bovina en México es de 15.2 kg (SIAP, 2019). La ganadería bovina destinada a la producción de carne es una de las actividades más difundidas en el medio rural y se realiza en todas las regiones agroecológicas del país.

Dieta diaria de ganado

La dieta del ganado debe de estar balanceada de acuerdo a la edad y el fin zootécnico del mismo, lo que se busca en la ganadería con estos nutrientes es maximizar el consumo y minimizar las pérdidas de energía, para alcanzar el máximo potencial de producción en menor tiempo (Garon *et al.*, 2006; Alpizar, 2015).

El ganado que tiene como fin zootécnico la producción de carne requiere de raciones con alta cantidad de nutrientes, para que logren desarrollarse de forma rápida y eficiente, esto dependerá de la digestibilidad de la dieta que reciban (SIAP, 2019). La dieta debe de estar constituida por concentrados, ensilaje, forraje, vitaminas y minerales (FAO, 2020) ya que en la dieta debe de tener alimentos concentrados o balanceados que incluyan subproductos de oleaginosas, granos de cereales, harina de pescado, melaza de caña, maíz rolado, los cuales le permiten satisfacer las necesidades nutricionales diarias del animal para su crecimiento, desarrollo y etapa productiva en la que se encuentre el ganado, es por eso que ocupan de un 50 a un 30% en la dieta diaria del ganado (SIAP, 2019). Pero no se recomienda como único alimento para nutrir al ganado ya que da un aporte insuficiente de proteína, vitamina D, calcio y fósforo (Fassio *et al.*, 2018); por eso es necesario agregar vitaminas como Vit. A, E, K, B12, tiamina y minerales como son Ca, P, Mg, Na, Zn, Co, Fe; ya que las vitaminas las requiere el ganado en mayor cantidad durante su crecimiento (desarrollo de huesos, músculos, epitelios); reproducción (desarrollo normal de placenta, embrión e incluso la calidad del semen); para la producción de leche y/o carne. Mientras que los minerales son esenciales para la formación del esqueleto, mantenimiento y formación de huesos, para el crecimiento, la reproducción, para

funciones básicas del organismo e incluso para la producción de la leche; siendo el 10% en la ración final diaria (Alpizar, 2015; Fassio *et al.*, 2018).

Los forrajes, como es el caso del ensilaje, es la parte vegetal de las gramíneas y leguminosas las cuales son un buen alimento para el ganado bovino, debido a su rico contenido de carbohidratos es la base de su alimentación y ocupa de un 40 a un 60% en la alimentación diaria del ganado (Alpizar, 2015; SIAP, 2019).

Ensilaje

El ensilaje es la conservación de los forrajes por medio de fermentación, con un mínimo de pérdida de materia seca (MS) y de nutrientes, que proporciona un alimento de calidad a un bajo costo en cualquier época del año (Prospero-Bernal *et al.*, 2017).

Después de la cosecha del maíz, este debe colocarse en silos para su almacenamiento y compactación e iniciar la fermentación que es básicamente limitar el contacto del maíz con el oxígeno y así conservar su valor nutricional; esta fermentación es láctica espontánea en condiciones de anaerobiosis, en donde las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del ensilaje, originando ácido láctico y ácido acético en menor cantidad, al producirse estos ácidos el pH del ensilado disminuye y la temperatura incrementa tanto que inhabilitan la presencia de microorganismos que inducen la pudrición (FAO, 2020).

Para que un ensilaje se considere de buena calidad, debe cumplir con varias características, un pH que oscile entre 3.8 - 5 (ácido), tamaño de partícula de entre dos o cuatro centímetros, temperatura de 30 - 35°C, con un porcentaje de humedad que fluctúe entre 54.6 - 68.34%, de color verde olivo, olor agradable, con un sabor dulce, que sea apetitoso para el ganado y con buenas condiciones de anaerobiosis para inhibir el desarrollo de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos (OudeElferink y Driehuis, 2001; Garon *et al.*, 2006; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008).

Sabiendo que el ensilaje constituye un porcentaje importante en la dieta diaria del ganado (Alpizar, 2015), las malas condiciones de almacenamiento pueden

ser un factor para el desarrollo de microorganismos indeseables, como son los hongos y la producción de micotoxinas, perjudicando la preservación del cultivo, el rendimiento animal o la salud de animales y humanos (Duniere *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2013).

Factores de contaminación

La contaminación por hongos es un problema con el que nos podemos enfrentar al producir alimentos almacenados como es el caso del ensilaje en la dieta de los rumiantes, debido a que la contaminación se da previa, durante o posterior a la cosecha ya que los forrajes están en contacto directo con esporas de los hongos (Alonso *et al.*, 2013). Otros factores como roedores, pájaros e insectos participan en el proceso de contaminación al causar lesiones físicas en el tejido vegetal promoviendo la penetración de las esporas (Garon *et al.* 2006).

Los granos del ensilaje pueden contener altas concentraciones de hongos, dependiendo de las condiciones climáticas, la etapa de crecimiento y cosecha por lo cual el valor nutricional del material ensilado puede disminuir teniendo un efecto negativo para el ganado (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008). Garon *et al.* (2006) reportan que la reducción o pérdida del valor nutricional del material ensilado durante su almacenamiento ocurre debido al desarrollo de hongos, los cuales se pueden presentar desde antes de la cosecha debido a diversos factores como condiciones climatológicas, la selección de semilla y disponibilidad de nutrientes, debido a que los forrajes están en contacto directo con esporas de los hongos. Un incremento fúngico en el ensilaje conduce a la disminución de la absorción de los nutrientes, ocasionando reducción en las funciones metabólicas e inmunológicas y alterando las funciones endocrinas (Alpizar, 2015).

Existen factores que favorecen el crecimiento y el desarrollo de los hongos en el ensilaje como es el caso de los factores endógenos: pH, actividad del agua (A_w), temperatura, la presencia de oxígeno y la composición nutricional; y los factores exógenos como es el sellado del silo, condiciones de almacenamiento, las

condiciones climatológicas y la fauna nociva como roedores, pájaros e insectos además de animales domésticos como perros o mascotas (Auerbach 2003).

La actividad del agua (A_w) nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema - alimento/medio ambiente, siendo unos de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y micotoxinas en el ensilaje (Alpizar, 2015)

La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 25 y 30°C con un límite máximo de entre 40 y 45°C. La mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5°C, aunque existen hongos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus* que pueden crecer sin problemas hasta los 55°C. Otros hongos como *Penicillium expansum* y *Penicillium cyclopium* son capaces de crecer a 0°C (Soriano, 2007).

Los hongos toleran un amplio intervalo de pH (2.5 a 7.5) aunque prefieren el medio ácido que el alcalino e incluso los mismos hongos son capaces de alterar el pH y que pueden aparecer durante el período de deterioro del alimento (Baliukoniene et al., 2012; Alpizar, 2015) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones propicias de la producción de micotoxinas por diferentes hongos, 2015.

Especie	Temperatura °C		pH		Actividad de agua (a_w)	
	Rango	Máximo	Rango	Máximo	Rango	Máximo
<i>Aspergillus spp.</i>	12-40	27-33	2.2-8.0	5-6	0.77-0.88	0.82-0.99
<i>Fusarium spp.</i>	0.0-31	22-28	2.0-6.0	3-4	0.85-0.97	0.85-0.87
<i>Penicillium spp.</i>	-3-40	15-30	2.1-10.0	5-7	0.80-0.95	0.80-0.86

Fuente: Alpizar, 2015.

Hongos toxicogénicos

Se estima que el 25 a 40 % de los cereales destinados para el consumo del ganado, se encuentra contaminado por algún tipo de hongos, como es el caso de los cereales, debido a las condiciones de humedad y de temperatura que el alimento presente (Pittet, 1998; FAO, 2020).

En el ensilaje el crecimiento de los hongos se da por las condiciones de anaerobiosis que se presentan cerca de la superficie, también por un sellado deficiente donde el plástico ha sufrido perforaciones o en ensilados con una baja densidad ya que su compactado no es el apropiado (Clarke, 1988; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008).

Estudios realizados en Francia por Garon *et al.* (2006), reportaron que los principales géneros de hongos asociados con el ensilaje son: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Varios autores indican que los hongos que se encuentran con mayor frecuencia en los ensilajes de maíz de México, Centro América y Brasil son: *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. y *Geotrichum* spp., (cuadro 3) estos hongos tienen la capacidad de producir micotoxinas que causan enfermedades y muerte tanto a humanos como a los animales (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Keller *et al.*, 2012; Alpizar, 2015). El género *Fusarium* spp. es capaz de colonizar e infectar las plantas del maíz ocasionando infecciones asintomáticas (Silva *et al.*, 2004). Desjardins *et al.* (2000), indican que las infecciones por hongos del género *Fusarium* spp. ocurren sistemáticamente en todas las partes de la planta de maíz, dañando los tejidos vegetales, además de que algunas especies de *Fusarium* producen metabolitos secundarios como son: Fumonisinias (FUM), Tricótesenos y Desoxinivalenol (DON).

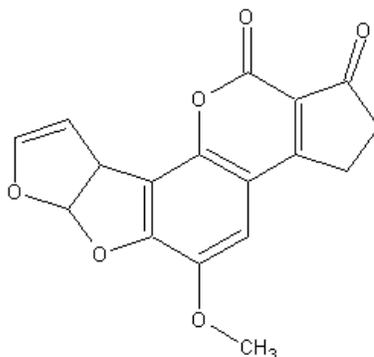
Cuadro 3. Géneros y especies de hongos filamentosos más frecuentes en ensilajes, reportados por autores de diversas regiones del mundo.

Autor	Género y especies reportados	País	Material de estudio
Baliukoniene <i>et al.</i> 2012	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i>	Lituania	Ensilaje de maíz, trébol, ryegrass y mezcla de pastos
Keller <i>et al.</i> 2012	<i>Aspergillus spp</i> <i>A. fumigatus</i>	Brasil	Maíz, sorgo, granos cervecería pre fermentación
Eckard <i>et al.</i> 2011	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium equiseti</i>	Suiza	Ensilaje de maíz
Van Asselt <i>et al.</i> 2012	<i>Fusarium crookwellense</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Holanda	Ensilaje de maíz
O'Brien <i>et al.</i> 2008	<i>Penicillium roqueforti</i> <i>Schizophyllum comune</i> <i>Penicillium paneum</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Geotrichum</i>	Irlanda	Ensilaje de pastos
Storm <i>et al.</i> 2010	<i>Penicillium roqueforti</i> <i>Zygomycetes</i> <i>Penicillium paneum</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Dinamarca	Ensilaje de maíz
Roigé <i>et al.</i> 2009	<i>Penicillium spp</i> <i>Aspergillus spp</i> <i>Scopulariopsis spp</i>	Argentina	Maíz y trigo fermentados
González <i>et al.</i> 2008	<i>Aspergillus spp:</i> <i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. nigger</i> <i>Fusarium spp:</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. solani</i> <i>F. equiseti</i>	Argentina	Ensilaje de maíz
Reyes-Velázquez <i>et al</i> 2008	<i>Mucor</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	México	Ensilaje de maíz

Micotoxinas y sus efectos

Las micotoxinas son productos altamente tóxicos generados del metabolismo secundario de algunos hongos, principalmente pertenecientes a los generos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp; la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación) calcula que una cuarta parte de los cultivos, alimentos básicos y piensos, están contaminados con micotoxinas, causando una pérdida de 1000 millones de toneladas de al año, e incluso la acumulación de estas toxinas en los alimentos y piensos, representa una importante amenaza para la salud humana y animal, causando enfermedades como es el caso de cáncer, problemas reproductivos, mutaciones, renales y muerte (FAO, 2020).

Aflatoxina B1 (AFB1)



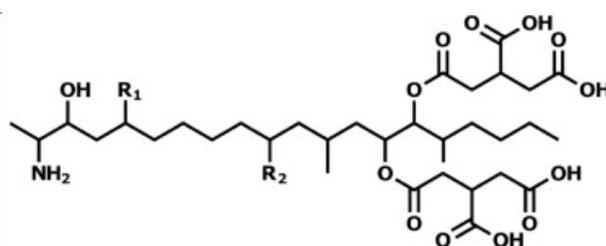
Estructura química de la aflatoxina
(Fuente: Williams *et al.*, 2004)

En 1962 se tiene el primer contacto con las micotoxinas, a causa de la muerte de pavos en Londres donde descubrieron que las causantes de la enfermedad fueron las aflatoxinas (Serrano-Colli y Cardona-Castro, 2015).

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por mohos del género *Aspergillus*, crecen en cacahuetes, maíz, semillas de algodón, frutos secos y cereales, es uno de los metabolitos secundarios más tóxicos según la Agencia internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC 2002) que la clasifico en el grupo 1 de compuesto carcinogénico en humanos (Marin *et al.*, 2013)., esta toxina se

absorbe en el tracto gastrointestinal por difusión pasiva a nivel ruminal, se metaboliza en el hígado, por la actividad del citocromo p450 transformando AFB1 a AM1 (Alpizar, 2015), siendo secretada en leche, orina, semen y bilis, al igual puede almacenarse en la carne y vísceras como hígado y riñones (Coppock *et al.*, 2012), se ha demostrado que una exposición a largo plazo a esta toxina provoca cáncer de hígado e inmunodepresión (Warburton y Williams, 2014).

Fumonisin



	R1	R2
Fumonisina B1	OH	OH
Fumonisina B2	OH	H
Fumonisina B3	H	OH

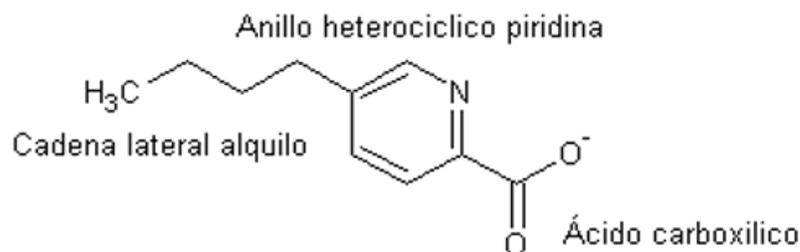
Estructura química de fumonisin
(Fuente: De la Torre-Hernández *et al.*, 2014)

Investigadores sudafricanos en 1988 aislaron *Fusarium verticillioides* de cultivos de maíz donde identificaron y purificaron a las fumonisin la cual fue considerada como agente causal de leucoencefalomalacia equina; también el mismo año se ilustró la estructura química de la fumonisin y hasta la fecha se han identificado más de 60 estructuras químicas relacionadas con la fumonisin (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Fumonisin es una toxina producidas por al menos 11 especies diferentes del hongo *Fusarium*, que incluyen las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum* crecen maíz, avena, sorgo, al igual que en cebollas, ajo (Leslie *et al.*, 2004; Yazar y Omurtag, 2008; Proctor *et al.*, 2008). La fumonisin se absorbe en el tracto gastrointestinal en mamíferos y se metaboliza en el hígado, excretándose en

orina y heces es importante recalcar que la fumonisina no se secreta en leche ni en carne (Smith, 2012) Se ha reportado que la ingesta de maíz contaminado con fumonisina está directamente asociado al cáncer de esófago en humanos, puede causar leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, hemorragias, problemas genotóxicos, hepáticos y renales en rumiantes, además de cáncer neural en roedores (Marasas *et al.*, 2004; Pizzo *et al.*, 2016).

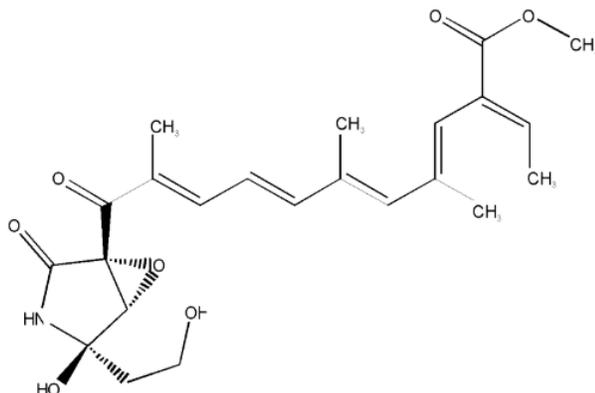
Ácido fusárico



Estructura química del ácido fusarico
(Fuente: Brown *et al.*, 2012)

El ácido fusarico (FA) fue aislado en 1934 por Yabuta en plantas de arroz (Bernar y Ruiz; 2016), FA es un metabolito secundario que actúa en una amplia gama de cultivos como son: pepino, plátano, maíz, ajo y es producida por el género *Fusarium*, de las especies *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* y *F. heterosporum* (Bernar y Ruiz, 2016). El ácido fusárico es un agente hipotensor en ratas, conejos, perros y gatos, reportando que la dosis LD₅₀ del ácido fusarico para ratones es de 100 mg/kg vía intravenosa (Porter *et al.*, 1995). El ácido fusárico en dosis agudas pueden elevar las concentraciones de triptófano y serotonina en el cerebro; también es un potente inhibidor de la dopamina-β-hidroxilasa, que es una enzima clave en la regulación de la síntesis de la norepinefrina y en dosis agudas puede causar vómito y letargo en el cerdo (Weidenborner, 2011).

Fusarinas

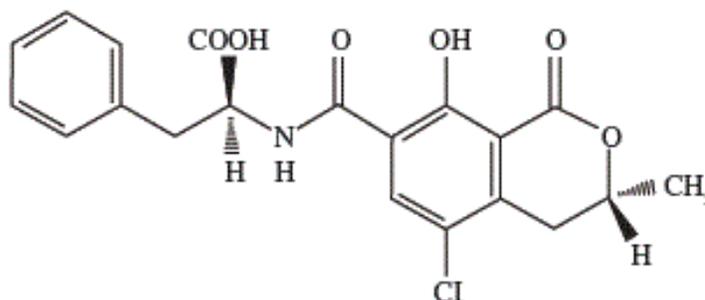


Estructura química de Fusarina

(Fuente: Soriano, 2007)

Las fusarinas es un grupo de metabolitos secundarios producidos por *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium graminearum* (Niehaus *et al.*, 2013), se han reposrado siete anmalogos diferentes del los que destacan: Fusarina A, Fusarina C y Fusarina D, que son clasificadas como micotoxinas que contaminan a los cereales como: trigo, maíz, avena, cebada y centeno (Maragos *et al.*, 2008; Sondergaard *et al.*, 2011). Estudios realizados por Sondergaard *et al.*, (2011), indican que la zearalenona y la fusarina C (FUSA) estimulan una línea celular del cáncer de mama y se unen a los receptores de estrógenos llamándolas micoestrogénicas.

Ocratoxina

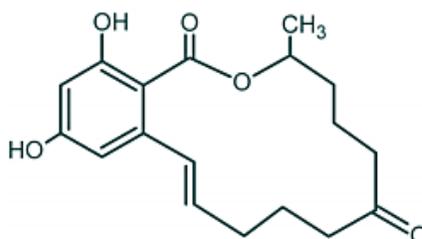


Estructura química de Ocratoxina

(Fuente: Ravelo *et al.*, 2011)

Es una toxina producida por los hongos *A. ochraceus*, *A. niger* y *P. verrucosum* que se encuentra ampliamente distribuido como contaminante natural de cereales como trigo, maíz, cebada, avena; leguminosas como el frijol y café verde y afecta principalmente a animales monogástricos (Serrano-Colli y Cardona-Castro., 2015). Y está catalogada por la IARC como posible carcinogénica. Esta toxina se absorbe por el estómago e intestino delgado de especies monogástricos, en el ganado bovino hay una hidrólisis a nivel ruminal por las enzimas de bacterias y protozoarios, por lo que la cantidad detectada en carne o leche suele ser muy poca (Alpizar, 2015). Al escaparse del metabolismo ruminal, lo poco que se absorbe se metaboliza en el tejido gastrointestinal, riñón e hígado y se excreta por orina y heces (Battacone *et al.*, 2010).

Zearalenona



Estructura química de Zearalenona

(Fuente: Soriano, 2007)

Es una micotoxina producida por el género *Fusarium*, principalmente por *F. graminearum* y *F. culmorum* que son hongos que afectan principalmente maíz, trigo, cebada, avena sorgo y soya, la IARC y la OMS clasifican a la zearalenona en el grupo 3 como posible carcinogénico en humanos por sus efectos estrogénicos (Yazar y Omurtag, 2008).

Se absorbe rápidamente cavidad bucal, sufre una serie de modificaciones en rumen, dando origen a alfa zearalenol, y beta zearalenol, se metaboliza a nivel hepático y se excreta por medio de la bilis (Hassan *et al.* 2010). Mostrom (2012) menciona que la zearalenona, la alfa zearalenona y la beta zearalenona pueden secretarse en la leche de vacas y ovejas que consuman altas dosis de la toxina en el alimento.

Métodos de detección de micotoxinas

A causa de la contaminación de los alimentos del ganado bovino con micotoxinas, se han desarrollado métodos analíticos, como es la cromatografía en capa fina (TLC), las cuales se ha establecido como método oficial de la Asociación of Analytical Chemistry (AOAC) por su alta precisión de identificación; otros métodos que se han estado utilizando son: La cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), cromatografía líquida / espectroscopía de masas (LC / MS), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunoafinidad con fluorescencia (Sudini *et al.*, 2015).

La cromatografía es un método analítico confiable y preciso que se usa principalmente para la separación de los componentes de una muestra, mediante su distribución en dos fases, una estacionaria y otra móvil (Vargas *et al.*, 2012).

Cromatografía líquida de Alta resolución (HPLC) Es un tipo de cromatografía en columna de alta sensibilidad y especificidad la cual se ha usado para la detección de diferentes micotoxinas, y es la aprobada por la AOAC, para la cuantificación de AF en el alimento del ganado (Sudini *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2012).

Cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica cualitativa, relativamente económica pero desafortunadamente no es una técnica muy sensible, se usa para identificar la presencia de AF en la dieta del ganado, pero desafortunadamente no indica las concentraciones de las micotoxinas (Vargas *et al.*, 2012).

ELISA se han usado para el análisis de micotoxinas, son ensayos competitivos heterogéneos, un sistema es ELISA directo, se utiliza un conjugado enzima-micotoxina y el otro sistema es ELISA indirecto, dado que se utiliza un conjugado proteína-micotoxina y un anticuerpo secundario con el cual una enzima ha sido conjugada, la sensibilidad de los kit de ELISA es específica para cada micotoxina, logrando una sensibilidad de 0.01 µg/kg como es el caso de Aflatoxina M a 300 µg/kg en Deoxinivalenol, comparándolo la técnica de ELISA con un HPLC, la técnica no tiene la misma veracidad que el análisis del HPLC con un 99% y el de ELISA con un 90% de veracidad, otro punto es que lamentablemente el tiempo de espera de resultados es alto, llegando a ser de 2 a 3 horas, otra desventaja es el uso el kit ya que se recomienda usarlos en laboratorios de investigación, (FAO, 2020).

Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección de muchos investigadores para los estudios genéticos y de biología molecular (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

El uso de esta técnica de PCR ha sido útil en los análisis epidemiológicos (Sreenivasa *et al.*, 2006), para la identificación de la taxonomía fúngica y recientemente se han utilizado para la detección de patógenos fúngicos en tejidos vegetales y la identificación de genes precursores de micotoxinas en los hongos, indicando la presencia o ausencia de estas toxinas gracias a la utilización de iniciadores que corroboran la presencia la ausencia de los genes de las micotoxinas (Cuadro 4); un punto importante en la utilización de la técnica de

PCR es que solo se requieren pequeñas cantidades de muestra para confirmar la presencia o ausencia del ADN del patógeno (El-Yazeed *et al.*, 2011).

Cuadro 4. Primer utilizados para la identificación de micotoxinas del *Fusarium*.

PRIMER	GEN	SECUENCIA	PESO (pb)	REFERENCIA
FUM1F	FUM1	CCATC ACAGTG GGACACAGT	183	El-Yazeed <i>et al.</i> , 2011
FUM1R		CGTATCGTCAGCATGATGTA GC		
Fum1F1	FUM1	CACATCTGTGGGCGATCC	1126	Stepien <i>et al.</i> , 2011
Fum1R2		ATATGGCCCCAGCTGCATA		
P6F	FUB1	CCATTGCCTAGTTAGCTGATAG	800	Brown <i>et al.</i> , 2012
P6LFI	(Ac. fusarico)	AGCCATTGGAGAGAGTCAT		
878	FUSA	GCAACGGCTCTTGCTTGAAGCTGT	780	
879	(Fusarinas)	CAGTGAAGAAGGCTTCGTGAATAGC		

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alonso, V.A.; Pereyra, C.M.; Keller, L.A.M.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Cavaglieri, L.R. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview, *J. Appl. Microbiol.* 115 (3):637-643.
- Alpizar, S.C. 2015. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Rev. Cienc. Veterin.* 33 (1):7-31.
- Auerbach, H. 2003. Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions. In: Lyons T., Jacques K. (ed) *Proceedings of Alltech's Nineteenth Annual Symposium.* p: 247-265.
- Baliukoniene, V.; Bakutis, B.; Vaivadaite, T.; Bartkienė. E.; Jovaišienė, J. 2012. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Vet. Med. Zoot.* 59 (81): 9 p.
- Battacone, G., Nudda, A. & Pulina, G. 2010. Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins.* 2 (7): 1796-1824. doi: 10.3390/toxins2071796.

- Bernar, E.M.; Ruiz, J.A. 2016. El ácido fusárico, micotoxina producida por *Fusarium* spp., afecta negativamente el crecimiento de *Pseudomonas protegens* Pf-5 mediante el secuestro de hierro y la producción de especies reactivas de oxígeno. *Revista Química Viva*. 3: 28-46.
- Brown, D.W.; Butchko, R.A.; Busman, M.; Proctor, R.H. 2012. Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol*. 49: 521–532.
- Clarke, A.F. 1988. Mycology of silage and mycotoxicosis. *Silage and Health*, 19 - 33
- CIMA 2018 Centro de Información de Mercados Agropecuarios, Reporte del mercado de carne de bovino 2018 www.cima.aseca.gob.mx/models/cima/pdf/cadena/2018/reportedemercadodecarnebovino
- Coppock, R.; Christian, R.; Jacobsen, B. 2012. Aflatoxins. In: R. Gupta (ed). *Veterinary Toxicology*. Ed. 2ª edición. Elsevier. Oxford, Estados Unidos. pp. 1186-1188.
- De la Torre-Hernández, M.E.; Sánchez-Rangel, D.; Galeana-Sánchez, E.; Plasencia-de la Parra, J. 2014. Fumonisin-Síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides*-Maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 17(1):77-91.
- Desjardins, A.E.; Manandhar, H.K.; Plattner, R.D.; Manandhar, G.G.; Poling, S.M.; Margos, C.M. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxin and gibberellic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 1020-1025.
- Dunier, L.; Sindou, J.; Chaucheyras-Durand, F.; Chevallier, I.; Thevenot-Sergentet, D. 2013 Silage processing and strategies to prevent persistence

of undesirable microorganisms. *Animal feed Science and Technology*. 182:1-15.

Eckard, S.; Wettstein, F.; Forrer, H.; Vogelgsang, S. 2011. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in maize silage. *Toxins*. 3 (8): 949–67.

doi: 10.3390/toxins3080949.

El-Yazeed, H.A.; Hassan, A.; Reda, E.A.M.; Hamed, M.; Refai, M. 2011. Molecular detection of Fumonisin-producing *Fusarium* species in animal feeds using polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Sciences Research*. 7: 420-427.

Fassio A.; Ibañez W.; Fernández E.; Cozzolino D.; Pérez O.; Restaino E.; Pascal A.; Rabaza C.; Vergara G. 2018. El cultivo de maíz para la producción de forraje y grano y la influencia del agua. *Revista del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay*. 239: 5-10.

FAO <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>
19/02/2020

Gallo, A.; Bertuzzi, T.; Giuberti, G.; Moschini, M.; Bruschi, S.; Cerioli, C.; Masoero, F. 2016. New assessment based on the use of principal factor analysis to investigate corn silage quality from nutritional traits, fermentation end products and mycotoxins. *J. Scien. Agric. food*. 96: 437-448.

Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P. 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental Study. *J. Agric. Food Chem* 54:3479-3484.

González, M.; Alonso, V.; Sager, R.; Morlaco, M.; Magnoli, C.; Astoreca, A.; Rosa, C.; Chiacchiera, S.; Dalcero, A.; Cavaglieri, L. 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 104 (4): 1034–41.

- Hassan, M., Fatemeh, R. & Kobra, B. 2010. Zearalenone is bioactivated in the river Buffalo (*Bubalus bubalis*): hepatic biotransformation. Trop Anim Health Prod. 42 (6): 1229-1234. doi: 10.1007/s11250-010-9554-x.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 82. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans II, Press Lyon France.
- Keady, T.W.J.; Kilpatrick, D.J.; Mayne, C.S.; Gordon, F.J. 2008 Effects of replacing grass silage with maize silages, differing in maturity, on performance and potential concentrate sparing effect of dairy cows offered two feed value grass silages. Livestock Science 119:1–11.
- Keller, L.A.M.; Gonzalez Pereyra, M.L.; Keller, K.M.; Alonso, V.A.; Oliveira, A.A.; Almeida, T.X.; Barbosa, T.S.; Nunes, L.M.T.; Cavaglieri, L.R.; Rosa, C.A.R. 2013 Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. J. Stored Products Research 52:42-47
- Keller, M.; Keller, K.; Monge, M.; Pereyra, C.; Alonso, V.; Cavaglieri, L.; Chiachiera, S.; Rosa, C. 2012. Gliotoxin contamination in pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. J. Appl. Microbiol. 5: 865-873.
- Leslie, J.F.; Zeller, K.A.; Logrieco, A.; Mulé, G.; Moretti, A.; Ritieni, A. 2004. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. Appl Environ. Microbiol. 70: 2254-2262.
- Loi, M.; Fanelli, F.; Liuzzi, V.C.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. 2017 Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. Toxins (Basel) 9:111

- Maragos, C.M.; Busman, M.; Plattner, R.D. 2008. Development of monoclonal antibodies for the fusarin mycotoxins. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 25: 105-114.
- Marasas, W.F.; Riley, R.T.; Hendricks, K.; Stevens, V.L.; Sadler, T.W.; Gelineauvan, W.J.; Missmer, S.A.; Cabrera, J.; Torres, O.; Gelderblom, W.C.; Allegood, J.; Martínez, C.; Maddox, J.; Miller, J.D.; Starr, L.; Sullards, M.C.; Roman, A.V.; Voss, K.A.; Wang, E.; Merrill, A.H. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J. Nutr.* 134: 711-716.
- Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. 2013. "Mycotoxins: Occurrence, Toxicology, and Exposure Assessment." *Food and Chemical Toxicology* 60. Elsevier Ltd: 218–37. doi:10.1016/j.fct.2013.07.047
- Millen, D.D.; Pacheco, R.D.L.; Arrigoni, M.D.B.; Galyean, M.L.; Vasconcelos, J.T. 2009. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *Journal of Animal Science.* 87:3427–3439.
- Mostrom, M. 2012. Zearalenone. In: R. Gupta (ed). *Veterinary Toxicology*. Ed. 2^a edición. Elsevier. Oxford, Estados Unidos. 1267-1268.
- Niehaus, E.M.; Kleigrewe, K.; Wiemann, P.; Studt, L.; Sieber, C.M.; Connolly, L.R.; Freitag, M.; Güldener, U.; Tudzynski, B.; Humpf, H.U. 2013. Genetic manipulation of the *Fusarium fujikuroi* fusarin gene cluster yields insight into the complex regulation and fusarin biosynthetic pathway. *Chem Biol.* 20:1055-1066.
- O'Brien, M.; Kiely, P.; Forristal, P.; Fuller, H. 2008. Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms : predominant mould and yeast species and features of bales and silage. *Grass and Forage Science.* 63: 121–137.

- Ogunade, I.M.; Martinez-Tupia, C.; Queiroz, O.C.M.; Jiang, Y.; Wu, F.; Vyas, D.; Adesogan, E.N. 2018. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J Dairy Sci.*101: 4034-4059.
- OudeElferink, S.J.; Driehuis, S.F. 2001. Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Electronic conference on Tropical silage.*
- Prospero-Bernal, F.; Martínez-García, C.G.; Olea-Pérez, R.; López-González, F.; Arriaga-Jordán, C.M. 2017. Intensive grazing and maize silage to enhance the sustainability of smallscale dairy systems in the highlands of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 49(7), 1537-1544.
- Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Rev Med Vet* 149: 479-492.
- Pizzo, F.; Caloni, F.; Schreiber, N.B.; Cortinovis, C.; Spicer, L.J. 2016. In vitro effects of deoxynivalenol and zearalenone major metabolites alone and combined, on cell proliferation, steroid production and gene expression in bovine small-follicle granulosa cells. *Toxicol.* 109: 70–83.
- Porter, J.K.; Bacon, C.W.; Wray, E.M.; Hagler, W.M. 1995. Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats. *Natural Toxins.* 3: 91-100.
- Proctor, R.H.; Busman, M.; Seo, J.A.; Lee, Y.W.; Plattner, R.D. 2008. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genet Biol.* 45: 1016-1026.
- Ravelo, A.A.; Rubio, A.C.; Gutiérrez, F.A.J.; Hardisson- De la Torre, A. 2011. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutr. Hosp.* 26: 1215-1226.

- Reyes-Velázquez, W.P.; Espinoza, V.H.; Rojo, F.; Jiménez-Plasencia, C.; Palacios, E.; Hernández-Góborra, J.; Ramírez-Álvarez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25:182-185.
- Roigé, M.; Aranguren, S.; Riccio, M.; Pereyra, S.; Soraci, A.; Tapia, M. 2009. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 26 (4): 233-237. doi: 10.1016/j.riam.2009.03.003.
- Serrano-Colli, H.A.; Cardona-Castro, N. 2015 Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev.CES Med.* 29(1):143-152.
- SIAP 2017 Servicio de información agroalimentaria y pesquera USDA-ERS Livestock, Dairy and Poultry Outlook. producción ganadera. http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/apecnal.jsp?id=2.
- SIAP 2018 Servicio de información agroalimentaria y pesquera 28/01/2020 <https://www.gob.mx/siap/articulos/la-ganaderia-simbolo-de-fortaleza-del-campo-mexicano>
- SIAP 2019 Servicio de información agroalimentaria y pesquera http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp
28/01/2020
- Silva, J.B.; Dilkin, H.; Fonseca, B.; Corrêa, C. 2004. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Braz. J. Microbiol.* 35: 182-186.
- Smith, G. 2012. Fumonisin. P 1206. In: R. Gupta (ed). *Veterinary Toxicology*. Ed.. 2ª edición. Elsevier. Oxford, Estados Unidos.
- Sondergaard, T.E.; Hansen, F.T.; Purup, S.; Nielsen, A.K.; Bonefeld-Jorgensen, E.C.; Giese, H.; Sorensen, J.L. 2011. Fusarin C acts like an estrogenic

agonist and stimulates breast cancer cells in vitro. *Toxicol Lett.* 205: 116-121.

Soriano, J.M. 2007. *Micotoxinas en alimentos. Introducción.* Díaz de Santos. España. pp. 255, 372 y 396.

Sreenivasa, M.Y.; Dass, R.S.; Charith, A.P.; Janardhana, G.R. 2006 Molecular Detection of Fumonisin Producing *Fusarium* Species of Freshly Harvested Maize Kernels Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Taiwania.* 51(4): 251-257.

Stepien, L.; Koczyk, G.; Waskiewicz, A. 2011. *FUM* cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal biology.* 115: 112 - 123.

Storm, I.; Kristensen, K.; Raun, B.; Smedsgaard, J.; Thrane, U. 2010. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *J. Appl. Microbiol.* 109 (3): 1017-1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x.

Sudini, H.; Srilakshmi, P.; Vijay Krishna Kumar, K.; Njoroge, S.; Moses Osiru.; Anitha Seetha.; Waliyar, F. 2015 Detection of aflatoxigenic *Aspergillus* strains by cultural and molecular methods: A critical review. *Academic Journal.* 9: 484-489

Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad.* 2 (2):70-78.

Van Asselt, E.D.; Azambuja, W.; Kastelein, P.; De Rijk, T.C.; Stratakou, I.; Van Der Fels-Klerx, H. 2012. A Dutch field survey on fungal infection and mycotoxin concentrations in maize. *Food Add. Cont.* 29 (10): 1556-1565. doi: 10.1080/19440049.2012.689997.

Vargas, E.; Glauner, T.; Köppen, R.; Mayer, K.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Berthiller, F. 2012. Stable isotope dilution assay for the accurate

determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. Anal Bioanal Chem. 402(9): 2675–2686.

Warburton, M.L.; Williams W.P. 2014. “Aflatoxin Resistance in Maize: What Have We Learned Lately?” *Advances in Botany*, 1–10. doi:10.1155/2014/352831.

Weidenborner, M. 2011. *Mycotoxins in feedstuffs* book p. 200

Williams, J.H.; Phillips, T.D.; Jolly, P.E.; Stiles, J.K.; Jolly, C.M.; Aggarwal, D. 2004. Aflatoxinas humanas en países en desarrollo: revisión de toxicología, exposición, consecuencias potenciales a la salud, e intervenciones. *Am J. Clin Nutr*;80:1106-22.

Yazar, S.; Omurtag, G.Z. 2008. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 2062-2090.

Primer reporte de *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz avena, triticale y alfalfa

Jazmín Janet Velázquez-Guerrero¹
Ernesto Cerna Chávez¹
Juan Carlos Delgado Ortiz²
Anselmo Hernández Pérez³
Teódulo Quezada Tristán⁴
Yisa María Ochoa Fuentes^{1§}

¹Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 449 1389427. (jazzguerrero@hotmail.com; jabaly1@yahoo.com). ²CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (moe.788@hotmail.com). ³Campo Experimental Uruapan-INIFAP. Av. Latinoamericana 1101, Uruapan, Michoacán CP. 60150. México. Tel. 452 5237392. (hernandez.anselmo@inifap.gob.mx). ⁴Centro de Ciencias Agropecuarias-Universidad Autónoma de Aguascalientes. Jesús María, Aguascalientes, México. (tquezada@correo.uaa.mx).

[§]Autora para correspondencia: yisa8a@yahoo.com.

Resumen

Monascus purpureus es utilizado en la industria alimentaria como un pigmento natural, principalmente por los países asiáticos; sin embargo, este hongo produce una micotoxina llamada citrinina, que causa enfermedades como hepatotoxicidad, teratogenicidad, tumores y mutaciones, en mamíferos. Este hongo fue encontrado en Serbia en ensilaje de maíz y alfalfa. El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia del hongo *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa, el muestreo se realizó en los periodos de noviembre-diciembre de 2017 y abril-mayo de 2018, en los estados de Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato de la República Mexicana, se realizaron aislamientos de los ensilajes en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), fueron identificados morfológicamente y molecularmente. Se obtuvieron 63 cepas diferentes, siete fueron *Monascus purpureus*, una en alfalfa, dos en maíz, dos en avena y dos en triticale. Esta investigación reporta por primera vez, la presencia de hongos *Monascus purpureus* en los ensilajes de maíz, avena, triticale y alfalfa.

Palabras clave: hongos, inocuidad, identificación.

Recibido: noviembre de 2019

Aceptado: diciembre de 2019

En la década de 1960 la utilización del ensilaje en la industria ganadera incrementó considerablemente y se volvió el método de preservación de forraje que más se utiliza para la alimentación del ganado (Cheli *et al.*, 2013), este representa entre 45-60% de las dietas en los sistemas de producción de ganado lechero en todo el mundo, así como en la producción del ganado productor de carne en América y Europa (Adesogan, 2009; Millen *et al.*, 2009; Tangni *et al.*, 2013; Alpizar, 2015), el ensilaje puede ser de diferentes cultivos o forrajes como alfalfa, avena, maíz, mezcla de mazorcas o pulpa de remolacha (Tangni *et al.*, 2013), el objetivo de este es maximizar la preservación de nutrientes originales del cultivo forrajero, con una pérdida mínima en su calidad nutricional (Alonso *et al.*, 2013). Uno de los problemas que presenta el ensilaje es la contaminación por bacterias y hongos, que provocan la pérdida de materia seca y nutrientes (Garon *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2013), ocasionando que el ganado disminuya el consumo del mismo, afectando la producción de leche, rendimiento en ganancia diaria de peso (GDP) y la salud de los animales (Alpizar, 2015).

Carrillo (2003) indica que la contaminación por hongos en los alimentos puede ser antes, durante y después de la cosecha, en el transporte y almacenamiento, ya que los alimentos se encuentran permanentemente en contacto directo con esporas de los hongos toxicogénicos. Reyes-Velázquez *et al.* (2008); Keller *et al.* (2012); Alpizar (2015) reportan que la contaminación del ensilaje de maíz en México, Argentina, Brasil, Lituania, Suiza, Holanda, Irlanda y Dinamarca es provocada por hongos principalmente de los géneros: *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. y *Geotrichum* spp.

Mientras que otros estudios realizados en Lituania y Brasil, han reportado la presencia de hongos de los generos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp., en ensilajes de trébol, ryegrass, sorgo, triticale, avena y mezcla de pastos (Baliukoniene *et al.*, 2012; Keller *et al.*, 2012). Algo muy similar ha sido reportado en ensilajes de maíz y alfalfa, donde los hongos contaminantes fueron: *Penicillium* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii*, *Monascus ruber* y *Monascus purpureus* (Bočarov-Stančić *et al.*, 2014).

Monascus purpureus es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria como un colorante natural en la cultura oriental y en países asiáticos. Este hongo crece a una temperatura de 25 a 37 °C, con un máximo de 45 °C, puede crecer en un amplio intervalo de pH, desde 2.5 a 8 (Pineda-Insuasti *et al.*, 2016). Es capaz de producir citrinina, una micotoxina que afecta al riñón, pero también se han notificado otros órganos diana, como el hígado y la médula ósea, esta micotoxina es nefrotóxica, embriocida, fetotóxica, teratogénica y genotóxica causando daño a humanos y animales (Flajs y Peraica, 2009; Bensassi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017).

Los posibles mecanismos toxicológicos de la citrinina son ubicados en la mitocondria renal y hepática, causando atrofia en la interferencia del proceso del transporte de electrones, además de la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} y la generación de estrés oxidativo (Chia-Ding *et al.*, 2014). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a la citrinina en el grupo 3 de los carcinógenos, debido a la evidencia limitada de su carcinogenicidad en animales y no hay evidencia para humanos (Flajs y Peraica, 2009). Por otro lado, Bočarov-Stančić *et al.* (2014), realizaron estudios en ensilaje de maíz y alfalfa en Serbia encontrando hongos del género *Monascus* en sus muestras. El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia del hongo *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa.

En los periodos de noviembre-diciembre de 2017 y abril-mayo de 2018, se utilizó la técnica 'W' para la toma de las muestras (Bautista y Santos, 2004), se obtuvieron un total de 16 muestras de ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa, de cuatro localidades por cada entidad, Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco. Con el uso de la técnica antes mencionada, se tomó un kilogramo de cinco puntos del ensilaje, los cuales se homogenizaron obteniendo un total de cinco kilogramos y se extrajo una submuestra de 5 g, se les realizaron cortes de aproximadamente 5 mm, obteniendo 12 submuestras por muestra, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, se dejaron secar, se inocularon en placas petri 20 mL con medio PDA acidificado (200 µL de ácido láctico al 85% por cada litro), se incubaron a 28 ± 2 °C por siete días.

Posteriormente, se observó el crecimiento micelial de las muestras de silo inoculado; se realizó la purificación de cada hongo, en medio PDA acidificado e incubando a 27 °C, durante 8 días en que se desarrollan las estructuras reproductivas necesarias para la identificación del hongo. Se tomaron porciones de micelio con esporas, se realizaron las tinciones, se colocaron en un portaobjetos donde ya se tenía una gota del colorante azul de algodón y se colocaba en el cubreobjetos, después se observaron al microscopio y se identificaron en base a las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

Mediante la técnica PCR-ITS, se realizó la identificación molecular, a las cepas aisladas se les extrajo el ADN mediante el método de Doyle y Doyle modificado (1990). El producto de la extracción se corrió en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. Posteriormente se desarrolló el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), utilizando Taq&GO Maternix (1.5 mM MgCl₂, 200 µM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 µL de ITS1 a 20 µM; 0.5 µL de ITS4 a 20 µM; 1 µL de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 µL.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 s, 30 ciclos de extensión a 72 °C por 2 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se mandó secuenciar al laboratorio MacroGen en Maryland, Estados Unidos de América.

A las muestras de ensilaje de alfalfa, maíz, avena y triticale se les realizó una evaluación macroscópica para identificar posibles anomalías en su apariencia, observándose que los ensilajes eran compactos y presentaban una consistencia dura que hacía difícil al corte, en la evaluación se observó tonos de color rojo intenso como se aprecia en las Figuras 1 y 2, las cuales muestran tonalidades semejantes a las reportadas para *Fusarium* spp.

De las 16 muestras obtenidas de los ensilajes, se logró aislar 63 cepas diferentes de hongos de las cuales 11.1% (7/63) correspondieron al hongo *Monascus purpureus*. Se lograron obtener siete cepas de hongos *Monascus purpureus*, dos en ensilaje de maíz, uno en alfalfa, dos en triticale y dos en avena que representan 3.17, 1.58, 3.17 y 3.17% respectivamente.



Figura 1. Muestra de ensilaje de maíz donde se aprecia la tonalidad del hongo y apelmazamiento del ensilaje.



Figura 2. Muestra de ensilaje de maíz donde se observa el apelmazamiento del ensilaje.

Asimismo, en los cultivos que se realizaron de cada una de las muestras, se pudo observar una gama de colores que fueron desde el blanco, crema, anaranjado, rojo intenso hasta un color tinto en el micelio como se observa en el anverso de las cajas de Petri (Figura 3), mientras que en el reverso las coloraciones fueron de un color anaranjado a rojas como se observa en la Figura 4.



Figura 3. En el micelio se observan las diferentes tonalidades del hongo.



Figura 4. Se observa el rojo intenso que caracteriza el hongo *Monascus*.

Microscópicamente se lograron observar ascocarpos de paredes delgadas y cadenas de conidios redondos (Figura 5), paralelamente también se logró observar ascosporas en el interior del ascocarpo (Figura 6).

Pineda-Insuasti *et al.* (2016), indican que el hongo *Monascus* crece fácilmente en residuos agroindustriales como es el capacho u hoja de maíz y raquis de palma de aceite, aunado a las condiciones de crecimiento: temperatura, pH, humedad y concentración de nutrientes (nitrógeno, zinc, manganeso y hierro) provocan que el hongo se desarrolle y propague en campo, lo que conlleva a uno de los principales problemas de contaminación del ensilaje (Kim *et al.*, 2002).

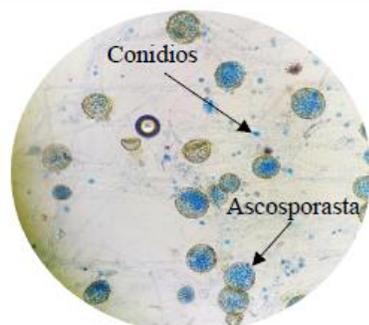


Figura 5. Vista microscópica del hongo *Monascus* spp., se observan las estructuras ascosporas y los conidios característicos de este hongo (objetivo de 40x).

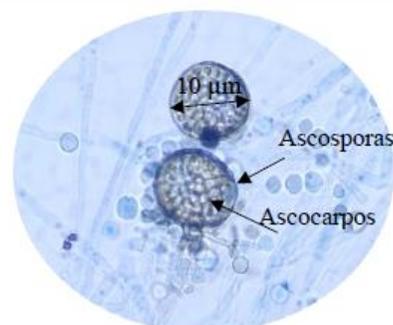


Figura 6. Vista microscópica del hongo *Monascus* spp., se observa una mejor definición de las estructuras ascosporas, ascocarpos y tamaño características de este hongo (objetivo de 100x).

Bočarov-Stančić *et al.* (2014), realizaron estudios en ensilaje de maíz y alfalfa en Serbia encontrando hongos del género *Monascus* en sus muestras. Garon *et al.* (2006), reportan la presencia de *Monascus* en ensilaje de maíz en Francia, ellos realizaron las tomas de muestras del ensilaje de maíz en los meses de noviembre, diciembre y febrero, datos que coinciden con nuestras tomas de muestras de los diferentes tipos de ensilaje y la presencia del hongo *Monascus* en los ensilajes de maíz, alfalfa, triticale y avena.

Las secuencias obtenidas del análisis molecular fueron comparadas con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de EE.UU (www.ncbi.nlm.nih.gov/), mediante el uso del programa BLAST, donde se obtuvo como resultado que 95.58% de las muestras aisladas mostraron similitud al hongo *Monascus purpureus* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA, presente en los ensilajes de alfalfa, maíz, avena y triticale.

Aislado	Especie	Número de acceso	IS (%)
1	<i>Monascus purpureus</i>	KY828906.1	95.58
2	<i>Monascus purpureus</i>	MK087167.1	95.58
3	<i>Monascus purpureus</i>	MK087147.1	95.58
4	<i>Monascus purpureus</i>	GQ503882.1	95.58
5	<i>Monascus purpureus</i>	MK621210.1	95.06
6	<i>Monascus purpureus</i>	MK087172.1	95.06
7	<i>Monascus purpureus</i>	MG576116.1	95.58

1= ensilaje de alfalfa; 2, 3= ensilaje de maíz; 4, 5= ensilaje de avena; 6, 7= ensilaje de triticale.

Conclusiones

Esta investigación reporta la presencia del *Monascus purpureus* en ensilajes de maíz, avena, triticale y alfalfa de los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas.

Literatura citada

- Adesogan, A. T. 2009. Challenges of tropical silage production. Proc. 15th international silage conference, Madison, Wisconsin. 139-156 p.
- Alonso, V. A.; Pereyra, C. M.; Keller, L. A. M.; Dalcero, A. M.; Rosa, C. A. R.; Chiacchiera S. M. and Cavaglieri, L. R. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115(3):637-643.
- Alpizar, S. C. 2015. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Rev. Cienc. Veterin.* 33(1):7-31.
- Baliukoniene, V.; Bakutis B.; Vaivadaite T.; Bartkienė E. and Jovaišienė, J. 2012. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika* 59(81):3-9.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Saint Paul, Minnesota. 157-158 pp.
- Bautista, A. y Santos, S. 2004. Manual de técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. 351-355 pp.
- Bensassi, F.; Bouslimi A.; El Golli-Bennour, E.; Gargouri S.; Hajlaoui, M. R. and Bacha H. 2011. Comparative cytotoxicity of the possibly occurring mycotoxins in wheat on the basis of a mycological analysis. *J. Mycol.* 32(3):295-306.
- Bočarov-Stančić, A.; Stanković, S.; Lević, J.; Janković, S.; Adamović, M.; Novaković, Ž. and Kuzevski, J. 2014. Presence of mycobiota and mycotoxins in silage. *Feed technology. In: XVI International Symposium Novi Sad, Serbia, octubre 28-30.* 1-6 p.
- Carrillo, L. 2003. Mohos y micotoxinas. *In: Universidad Nacional de Salta. (Ed.). Los hongos de los alimentos y Forrajes.* Salta, Argentina. 1-24 pp.
- Cheli, F.; Campagnoli, A. and Dell'Orto, V. 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *J. Animal Feed Sci. Technol.* 183(1-2):1-16. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.013.
- Chia-Ding, L.; Ying-Chun, C.; Hsu-Yang, L.; Lih-Ching, C. and Yang-Chih, S. D. 2014. Incidence of citrinin in red yeast rice and various comercial *Monascus* products in Taiwan from 2009 to 2012. *J. Food Control.* 38:178-183.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12(1):13-15.
- Flajs, D. and Peraica, M. 2009. Toxicological properties of citrinin. *Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia.* 60(4):457-464.
- Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchart, V.; Pottier D. and Lebailly, P. 2006. Mycoflora and multimycotoxin Detection in corn silage: experimental study. *J. Agric. Food Chem.* 54(9):3479-3484.
- Keller, L. A.; Keller K. M.; Monge, M. P.; Pereyra, C. M.; Alonso, V. A.; Cavaglieri, L. R.; Chiacchiera, S. M. and Rosa, C. A. 2012. Gliotoxin contamination in pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Río de Janeiro State, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 112(5):865-873.
- Kim, H. J.; Kim, J. H.; Oh, H. J. and Shin, C. S. 2002. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. *Process Biochem.* 38(5):649-655.
- Millen, D. D.; Pacheco, R. D. L.; Arrigoni, M. D. B.; Galyean, M. L. and Vasconcelos, J. T. 2009. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *J. Animal Sci.* 87(10):3427-3439.

- Pineda-Insuasti, J. A.; Duarte-Trujillo, A. S.; Ayala-Pastaz, K. B.; Soto-Arroyave, C. P. y Pineda-Soto, C. A. 2016. Producción de metabolitos por *Monascus* spp. una revisión. Rev. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 50(2):43-52.
- Reyes-Velázquez, W. P.; Espinoza, V. H. I.; Rojo, F.; Jiménez, C.; Palacios, E. D.; Hernández, J. and Ramírez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. Rev. Iberoam. Micol. 25(3):182-185.
- Tangni, E. K.; Pussemier, L. and Van Hove, F. 2013. Mycotoxin contaminating maize and grass silages for dairy cattle feeding: current state and challenges. J. Animal Sci. Adv. 10(3):492-511.
- Wang, H.; Zhang, S.; Lin, T.; Zheng, D. 2017. Introduction and safety evaluation of citrinin in foods. J. Food Nutr. Sci. 5(5):179-183. Doi: 10.11648/j.jfns.20170505.13.

Primer reporte de *Monascus ruber* en ensilaje de maíz y alfalfa en México

First report of *Monascus ruber* on corn and alfalfa silage in Mexico

Jazmín Janet Velázquez-Guerrero¹ (0000-0001-8562-467X), Roberto Rios Valadez¹ (0000-0003-3826-8291), Ernesto Cerna Chávez² (0000-0003-2263-4322), Juan Carlos delgado Ortiz³ (0000-0003-4899-9995), Jerónimo Landero Flores² (0000-0001-7924-4443), Teóduo Quezada Tristán⁴ (0000-0002-3793-4582), *Yisa María Ochoa Fuentes² (0000-0001-7859-8434).

¹ Estudiante del postgrado Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315.

³ Catedrático CONACyT-UAAAN Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila

⁴ Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Jesús María, Aguascalientes, México

yisa8a@yahoo.com (*email contact address)

RESUMEN

Antecedentes: *Monascus ruber* es un hongo utilizado en la industria alimentaria como un pigmento natural principalmente por los países asiáticos, sin embargo se ha descubierto que *Monascus ruber* produce una micotoxina llamada citrinina, la cual ocasiona hepatotoxicidad, teratogenicidad, tumores, mutaciones, esto es causante de enfermedades y muerte tanto a los humanos como a los animales.

Objetivo: Este estudio reportar por primera vez en México la presencia de *Monascus ruber* en ensilaje de maíz y alfalfa.

Métodos: Las cepas se obtuvieron a partir de los muestreos de ensilaje de maíz y alfalfa realizados en los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco.

Resultados y conclusión: Las cepas fueron identificadas morfológicamente y molecularmente como *Monascus ruber*, esta investigación porta por primera ocasión, la presencia de *Monascus ruber* en ensilaje de Maíz y alfalfa.

PALABRAS CLAVE: Ganado, ensilaje de maíz, ensilaje de alfalfa, *Monascus ruber*.

ABSTRACT

Background: *Monascus ruber* is a fungus used in the food industry as a natural pigment mainly by Asian countries, however it has been discovered that *Monascus ruber* produces a mycotoxin called citrinin, which causes hepatotoxicity, teratogenicity, tumors, mutations, this is a cause of diseases and death to both humans and animals.

Objective: Therefore, this study is to report for the first time in Mexico the presence of *Monascus ruber* in maize and alfalfa silage.

Methods: The strains were obtained from the corn and alfalfa silage samples taken in the states of Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato and Jalisco.

Results and conclusions: The strains were identified morphologically and molecularly as *Monascus ruber*, this research carries for the first time, the presence of *Monascus ruber* in corn and alfalfa silage.

KEY WORDS: Cattle, corn silage, alfalfa silage, *Monascus ruber*.

El ensilaje constituye entre un 40 a 60% en la ración de consumo diario en la dieta del ganado productor de carne y leche, el ensilaje es forraje verde preservado por fermentación láctica espontánea en condiciones anaeróbicas (Alpízar., 2015), el propósito principal del ensilaje es aprovechar al máximo los nutrientes del cultivo forrajero con una mínima pérdida de la calidad nutricional (Alonso *et al.*, 2013). La contaminación por hongos es uno de los riesgos que se pueden presentar en alimento almacenados como es el caso del ensilaje (Garon *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2013); Un incremento fúngico en el ensilaje conduce a la pérdida de nutrientes y de materia seca, disminuyendo la palatabilidad y consumo de ensilaje, que genera como consecuencia las pérdidas en el rendimiento en ganancia de peso y producción de leche del animal (Alpízar, 2015). La contaminación del alimento se da desde antes, durante y después de la cosecha, durante el transporte y almacenamiento, ya que los forrajes están en contacto directo con esporas de hongos toxicogénicos (Carrillo, 2003). Datos reportados por otros autores indican que los hongos que se encuentran con mayor frecuencia en los ensilajes de maíz son: *Mucor* spp. *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria*, *Cladosporium* spp y *Geotrichum* spp (Reyes *et al.*, 2008, Keller *et al.*, 2012 y Alpízar, 2015).; Algunos autores reportan la presencia de los generos de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* en ensilaje de

trébol, ryegrass, sorgo, triticale, avena y mezcla de pastos en los países de Lituania y Brasil (Baliukoniene *et al.*, 2012; Keller *et al.*, 2012); En un estudio realizado en Serbia por Bočarov-Stančić y colaboradores (2014) en ensilaje de maíz y alfalfa, mencionan la existencia de *Aspergillus fumigatus*, *Monascus purpureus*, *Trichoderma viride*, *Penicillium*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii* y *Monascus ruber*.

Monascus ruber es utilizado en la cultura china como un colorante natural utilizado tradicionalmente en los productos alimenticios y las industrias farmacéuticas, pero en el Wang *et al.* (2017), hacen referencia de *Monascus ruber* es capaz de producir una micotoxina llamada Citrinina donde su órgano diana es el riñón, causando nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, teratogenicidad, puede causar mutaciones, tumores y muerte tanto en humanos como en animales, en este mismo estudio hacen referencia de la dosis LD50 en ratones es de 110 mg/kg y que la toxicidad de citrinina está al mismo nivel que la aflatoxina B1. Esta investigación tuvo como objetivo reportar por primera vez en México la presencia de *Monascus ruber* en ensilaje de maíz y alfalfa.

Las cepas se obtuvieron a partir de los muestreos de ensilaje de maíz y alfalfa realizados en los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco, las cepas fueron identificadas morfológicamente y molecularmente.

En los periodos de Noviembre-Diciembre del 2017 y Abril-Mayo del 2018, se realizó el muestreo de cuatro localidades de cada uno de los estados Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y de Jalisco donde produjeran ensilaje de maíz y alfalfa, utilizando la técnica “W” (Bautista *et al.*, 2004) para la toma de las muestras de las cuales se tomaron sub muestras de cinco puntos del ensilaje, de cada uno de los puntos se tomo en promedio un kilogramo, los cinco kilogramos se homogenizaron para obtener una sola muestra y de

esta muestra, extraer un kilogramos compuesto. Los aislados se realizaron de cada una de las muestras del ensilaje de maíz y alfalfa, las cuales se desinfectaron con hipoclorito sodio al 3% durante 1 minuto, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, se sembró en placas de Petri con medio PDA acidificado (200 μ L de ácido láctico al 85 %), se incubaron a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 7 días, pasado este tiempo se tomaron explantes del borde de los distintos tipos y coloraciones de micelio de los diferentes hongos generados, se inocularon en cajas de Petri con medio PDA acidificado por 12 a 24 horas, a 27°C durante el tiempo en que tardó en desarrollar las estructuras reproductivas necesarias para la identificación del hongo. En los cultivos puros, se realizaron tinciones miceliales con azul de lactofenol, tomando porciones de micelio con esporas; las cuales se observaron al microscopio con el aumento 10x y 40x y fueron identificados con base en las claves de Barnett y Hunter (1998). Se usó la técnica PCR-ITS de Doyle y Doyle (1990) para realizar la extracción de ADN, lo obtenido de la extracción se observó en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis, el siguiente paso fue el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S usando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), utilizando Taq&GO Maternmix (1.5 mM MgCl_2 , 200 μ M DNTP's) haciendo caso a las recomendaciones del fabricante (MP[®]); 0.5 μ L de ITS1 a 20 μ M; 0.5 μ L de ITS4 a 20 μ M; 1 μ L de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 μ L. El programa de la reacción de PCR fue: 1 ciclo de desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. La amplificación se visualizó

en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. Los resultados de la PCR se mandaron secuenciar a Macrogen Maryland EUA.

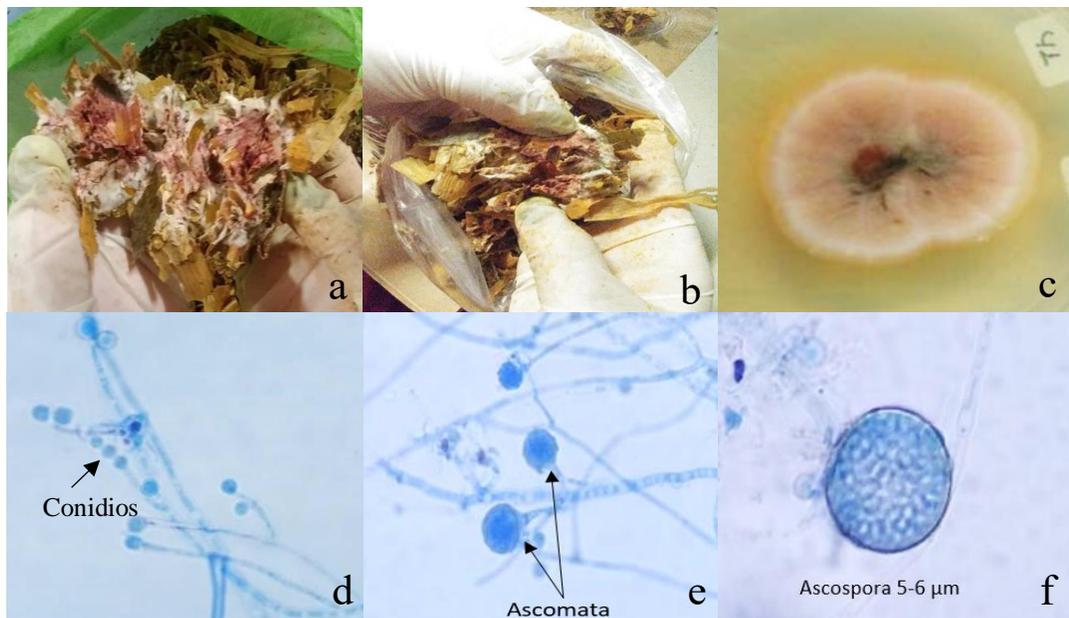
En una muestra de ensilaje de alfalfa y en cuatro muestras de ensilaje de maíz se encontró apelmazamiento, los cuales al momento de hacer los cortes para el aislamiento se observó una tonalidad de rojo oscuro intenso (Fig. a y b), la cual era muy parecida a los tonos del hongo *Fusarium*, se realizó el aislamiento como se describe en la metodología y se realizaron montas para observarlo al microscopio y se observaron las estructuras que se muestran las Fig. c, d, e y f; Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information) de EUA (www.ncbi.nlm.nih.gov/), mediante el uso del programa BLAST; dando como resultado de un 95 % a un 97 % de similaridad con *Monascus ruber* (tabla 1).

Tabla 1. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA.

AISLADO	ESPECIE	N. DE ACESO	IS
1	<i>Monascus ruber</i>	AY629430.1	97%
2	<i>Monascus ruber</i>	AF451858.1	96%
3	<i>Monascus ruber</i>	MH856005.1	96%
4	<i>Monascus ruber</i>	JN942658.1	96%
5	<i>Monascus ruber</i>	AY629427.1	95%

Los aislados 1, 2,3 y 5 son de ensilaje de Maíz y el aislado 4 es de ensilaje de Alfalfa

Debido a que este hongo es utilizado como colorante y se hallaron reportes de países asiáticos, donde el hongo *Monascus* es utilizado desde hace mil años en China (Wang *et al.*, 2017), este resultado también coincide con Garon *et al.*, 2006 realizado en ensilaje de maíz en Francia; otros países que lo reportan es Japón, Estados Unidos, Serbia y Malaysia también en ensilaje de maíz (Wang *et al.*, 2017). Cabe señalar que Bočarov, *et al.*, 2014 realizo estudios en Serbia en ensilaje de maíz y alfalfa donde encontró la presencia de *Monascus* en sus muestras. Con base a la búsqueda que se realizó y con respecto a los reporte señalados, este es el primer reporte de *Monascus ruber* en ensilaje de maíz y de alfalfa, que se hace en la República Mexicana.



LITERATURA CITADA

- Alonso VA., Pereyra CM., Keller LAM., Dalcero AM., Rosa CAR., Chiacchiera SM., Cavaglieri LR. 2013, Fungi and mycotoxins in silage: an overview, *Journal of Applied Microbiology* No. 115, 637-643.
- Alpizar Solís Carlos 2015, Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes, *Revista Ciencias veterinarias*, Vol. 33, No. 1, 7-31.
- Baliukoniene,V., Bakutis, B., Vaivadaite, T., Bartkienė, E.; Jovaišienė, J. 2012. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Vet Med Zoot.* 59 (81): 9 p.
- Bautista F; Delfín H; Delgado MC; Palacio JL, 2004. Manual de Tecnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. 351-355
- Barnett HL, Hunter BB, 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. APS Press. Saint Paul, Minnesota.
- Bočarov-Stančić A, Slavica Stanković, Jelena Lević, Snežana Janković, Milan Adamović, Željko Novaković, Janja Kuzevski, 2014 *XVI International Symposium "Feed Technology"* Novi Sad, Serbia. p.1-6.
- Carrillo, L., 2003 Mohos y Micotoxinas. *J. Agric Food Chem* 1-24.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990. 12:13-15.

- Garon, D.; Richard E.; Sage L.; Bouchart V.; Pottier D.; Lebailly P. 2006. Mycoflora and ultimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. *J. Agric. Food Chem.* (54), 3479-3484.
- Keller, M., Keller, K., Monge, M., Pereyra, C., Alonso, V., Cavaglieri, L., Chiachiera, S. & Rosa, C. 2012. Gliotoxin contamination in pre- and postfermented corn, sorgum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 112 (5): 865-873.
- Kung, L. 2001. Silage fermentation and additives. In: Lyons T., Jacques K. (ed) *Proceedings of Alltech's Seventeenth Annual Symposium.* p.145-159.
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Burkinafaso. Laboratory manual.* Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa, 2006.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J. and Vilgalys, R. (2005) Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5544–5550.
- Reyes-Velázquez, W.P., V.H.I., Espinoza, F., Rojo, C., Jiménez, E.D., Palacios, J Hernández,, A Ramírez,, 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* (25), 182-185.
- Wang H., Zhang S., Lin T., Zheng D., 2017. Introduction and Safety Evaluation of Citrinin in Foods, *Journal of Food and Nutrition Sciences.* 5 (5), 179-183.

Determinación de hongos toxicogénicos en ensilaje de maíz

Determination of toxicogenic fungi in corn silage

Resumen

Entre la dieta base de los rumiantes en México se encuentra el ensilaje de maíz, que constituye de 35 a 50% de la dieta diaria, uno de los riesgos en el proceso de elaboración del ensilaje es la contaminación por hongos fitopatógenos, los géneros reportados en el ensilaje de maíz son: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Scopulariopsis* spp. y *Mucor* spp.; estos hongos tienen la capacidad de producir micotoxinas que causan enfermedades y muerte tanto a los humanos como a los animales, se muestrearon los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco, en ensilaje de maíz en los periodos de noviembre-diciembre del 2017 y abril-mayo del 2018, se utilizò la técnica “W” en cada uno de los ensilajes, el análisis de las muestras se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, Mexico, en este estudio se aislaron e identificaron morfológicamente las especies *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces*, que contaminan el ensilaje de maíz en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas y Jalisco, cuya identificación se confirmó con la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Palabras clave: Ganado de carne, ensilaje, maíz, hongos toxicogénicos.

Abstract

Among the base diet of ruminants in Mexico is corn silage, which constitutes 35 to 50% of the daily diet, one of the risks in the process of making silage is contamination by

phytopathogenic fungi, the genera reported in corn silage are: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Scopulariopsis* spp. and *Mucor* spp. ; These fungi have the ability to produce mycotoxins that cause disease and death in both humans and animals, the states of Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato and Jalisco were sampled in corn silage in the periods of November-December 2017 and April -May 2018, the "W" technique was used in each of the silages, the analysis of the samples was carried out at the Autonomous Agrarian University Antonio Narro, Saltillo Coahuila, Mexico, in this study the *Fusarium* species were isolated and morphologically identified moniliforme, *Aspergillus fumigatus*, *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces*, which contaminate corn silage in the states of Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas and Jalisco, whose identification was confirmed with the chain reaction technique of PCR polymerase.

Keywords: Beef cattle, silage, corn, toxicogenic fungi.

Introducción

En producción de carne a nivel mundial México ocupa el octavo lugar por debajo de USA, Brasil, Unión Europea, China, India, Argentina y Australia (USDA, 2017) con una producción de 1´495,818 de cabezas de ganado de los cuales 1´121, 057 son rumiantes; Veracruz, Jalisco, Chiapas, San Luis Potosí y Sinaloa son los estados que representan la mayor producción de ganado bovino en México, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas representan el 20% de la producción de cabezas de ganado a nivel nacional, con un valor económico de \$23´348, 656 (SIAP, 2017). La dieta base de este tipo de ganado está constituida por, concentrado (maíz rolado, sorgo), aditivos nutricionales, rico en vitaminas, minerales y forraje como es el caso del ensilaje; el ensilaje es forraje verde

preservado por fermentación láctica espontánea en condiciones anaeróbicas (Kung, 2001), el propósito principal del ensilaje es maximizar la preservación de nutrientes originales del cultivo forrajero con pérdidas mínimas en la calidad nutricional (Alonso *et al.*, 2013), el ensilaje es de gran importancia en los sistemas de producción del ganado lechero en todo el mundo y en la producción del ganado de carne en Europa y América, debido a que representa entre un 35 a 50% en su ración diaria de alimento (Keady *et al.*, 2008; Millen *et al.*, 2009; Alpizar., 2015). Para que un ensilaje se considere de buena calidad, debe cumplir con varias características, un pH que oscile entre 3.8 - 5 (ácido) tamaño de partícula de entre dos o cuatro centímetros, temperatura de 30 - 35°C, humedad que fluctuó entre 54.6 - 68.34%, de color verde olivo, olor agradable, buen sabor y con buenas condiciones de anaerobiosis (OudeElferink y Drienhuis, 2001; Garon *et al.*, 2006; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008). Sin embargo, las malas condiciones de almacenamiento del ensilaje, causadas por un secado insuficiente, calentamiento excesivo, filtración de agua de lluvia e infestación de insectos, podrían conducir a un crecimiento indeseable de hongos (Garon *et al.*, 2006). La contaminación por hongos es un problema con el que nos podemos enfrentar con los alimentos almacenados, como es el caso del ensilaje (Alonso *et al.*, 2013). Un incremento fúngico en el ensilaje conduce a la pérdida de nutrientes y de materia seca, disminuyendo la palatabilidad y consumo de ensilaje, que genera como consecuencia las pérdidas en el rendimiento en ganancia de peso y producción de leche del animal (O'Brien *et al.*, 2008). Datos reportados por varios autores indican que los hongos que se encuentran con mayor frecuencia en los ensilajes de maíz son: *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. y *Geotruchum* spp., estos hongos tienen la capacidad de producir micotoxinas que causan enfermedades y muerte tanto a humanos como a los animales (Reyes-Velázquez *et*

al.,2008; Keller *et al.*, 2012; Alpizar, 2015). El objetivo de este estudio fue identificar los hongos que se encuentran presentes en los ensilajes de maíz, de los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas y Jalisco.

Materiales y Métodos

Muestreo. El muestreo se realizó en cuatro localidades de cada uno de los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco, donde se produjera ensilaje de maíz, utilizando la técnica “W” (Bautista *et al.*, 2004) se tomo submuestras en cinco puntos diferentes del ensilaje de un peso promedio de un kilogramo, estos se homogenizaron y se extrajo una sola muestra de los cinco puntos, estos pasos se repitieron en cada una de las localidades de los estados antes mencionados, los muestreos se realizaron en los periodos de noviembre-diciembre del 2017 y abril-mayo del 2018.

Aislamiento del hongo del ensilaje. El aislado se realizó tomando 3 gramos de cada una de las muestras del ensilaje de maíz, las cuales se desinfectaron con hipoclorito sodio al 3% durante 1 minuto, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, se dejó secar sobre papel estéril por un lapso de 15 minutos cerca del mechero, se sembró en placas de petri con medio PDA adicionado con ácido láctico (200 μ L de ácido láctico al 85 %) y se incubaron a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 7 días, posteriormente se observó el crecimiento micelial de los diferentes hongos, de cada uno de los hongos que crecieron se tomaron explantes de cada uno de estos, se resembraron nuevamente en cajas petri con medio PDA acidificado por un lapso de 12 a 24 horas a 27°C , se purificaron los hongos por punta de hifa y se incubo a 27°C durante 7 días, en función de los tipos y coloraciones de micelio desarrollados fue el número de explantes que se realizaron, esto con la finalidad de obtener un cultivo puro.

Identificación morfológica. Con los cultivos puros, se realizaron tinciones miceliales tomando porciones de micelio con esporas; las cuales se observaron al microscopio y fueron identificados con base en las claves de Barnett y Hunter (1998) y en el caso del género *Fusarium*, se realizó la identificación a especie empleando las claves de Leslie y Summerell (2006).

Identificación molecular. Se utilizó en método Doyle y Doyle (1990) para realizar la extracción de ADN, los resultados de la extracción se observaron en un gel de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis, enseguida se realizó la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en búsqueda de las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S utilizando los primers de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), utilizando Taq&GO Maternix (1.5 mM MgCl₂, 200 μM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 μL de ITS1 a 20 μM; 0.5 μL de ITS4 a 20 μM; 1 μL de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 μL. Se utilizó el programa de PCR para las ITS: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72 °C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. La amplificación se observó en gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis. El resultado de la PCR se mandó secuenciar a un laboratorio de Estados Unidos. Las secuenciaciones resultantes se cotejaron con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Resultados

Se obtuvieron 35 cepas aisladas en total del número de muestreo realizados, se identificaron morfológicamente seis especies de hongos (Cuadro 1) los cuales: un 6% fue *Fusarium moniliforme*, que presento las siguientes características: macroconidios con forma de hoz en línea curva con las superficies dorsal y ventral casi paralelas, presentaron paredes delgadas con una célula basal y una célula apical que a menudo fue alargada, las microconidias fueron principalmente unicelulares y con forma ovoide con una base truncada, naciendo de una cadenas largas y cabezas falsas; un 17% fue *F. oxysporum* que produjo micelio aéreo algodonoso de color blanco a violeta claro, microconidias abundantes unicelulares y bicelulares de forma ovoide a elipsoide, formadas en falsas cabezas, monofialides cortas y macroconidias pequeñas en forma de canoa con una corta célula apical y ligeramente curvada y célula basal trunca, con 3 a 5 septos; con 17% fue *F. chlamydosporum* las colonias son blancas, el micelio abundante de color blanco a lila, los macroconidios de paredes gruesas y moderadamente curvados con una curvatura dorsiventral desigual, células apicales cortas, curvas y puntiagudas, generalmente con muescas, pero en ocasiones con células basales en forma de pie, de 3 a 5 septos, los microconidios fueron abundantes, 0-septos las clamidosporas se formaron rápidamente en cadenas de hasta tres células; con un 31% fue *Aspergillus fumigatus* macroscópicamente las colonias se observan en el agar de color verde-azulado a verde-grisáceo, micelio blanco; textura aterciopelada, plana o con surcos radiales, las características microscópicas: cabezas conideales uniseriadas, vesícula piriforme o en forma de cuchara; las fiálides ocupando la mitad o dos tercios de la vesícula, los conidios globosos a ovoides; con un 17% fue *A. flavus* las colonias de color verde oliváceo a verde amarillento, micelio

blanco, textura de la colonia variable, generalmente lanosa, las características microscópicas: cabezas conideales uniseriadas, principalmente radiales, vesícula esférica; mótulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula, los conidios globosos o elipsoidales, lisos; con un 11% *Geotrichum galactomyces* forma colonias blancas, producen hifas alargadas con ascosporas elipsoidales. Así mismo se corroboró la identidad de las mismas mediante la técnica ITS - PCR en donde los productos amplificados fueron de 600-700 pb aproximadamente, se observó que se presentaron ligeras diferencias en el peso molecular de las bandas, esto dependió de la especie analizada. Al comparar la secuencia con las del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mostro alto porcentaje de similitud del 98-100% en el caso de *Fusarium*, 97-100% en *Aspergillus* y de 97% en el caso de *Geotrichum* (Cuadro 1).

Discusión

Los hongos identificados en los cuatro estados de la republica son *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *F. chlamyosporum*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces*, estos datos coinciden con O'kiely (2006), donde reporta que el hongo con mayor presencia en el cultivo de maíz es *Aspergillus spp* con un 57.5%, mientras que *Fusarium spp.* se detectó con una prevalencia de solamente el 0.26%. Por otra parte, Beatriz *et al.* (2009) reportan haber encontrado la presencia de los hongos *Penicillium spp.* *Fusarium spp.* y *Aspergillus spp* en granos de maíz, los cuales tuvieron una prevalencia del 70.0%, 47.0% y 34.0% respectivamente; Reyes-Velázquez *et al.*, (2008) indica que los hongos con mayor incidencias en los ensilajes de maíz del estado de Jalisco, México es *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*; otros autores como Alonso *et al.* , (2009)

y González Pereyra *et al.*, (2011) reportan que en Argentina los hongos que tienen mayor presencia en el ensilaje de Maíz son : *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium roqueforti*, *P. paneum*, *P. griseofulvum*, *P. crustosum*, *Fusarium solani*, *F. equiseti*, *F. verticilloides*.

Conclusión

Se logró aislar e identificar las especies *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces* en el estado de Aguascalientes; en el estado de Guanajuato solo se encontró *A. fumigatus* y *A. flavus*; en Zacatecas las especies *A. fumigatus* y *G. galactomyces* y en el estado de Jalisco las especies *A. fumigatus* y *G. galactomyces*, cuya identificación fue corroborada con la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Agradecimientos

Se le agradece por todo el apoyo brindado a este proyecto al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT y se extiende el agradecimiento a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por permitirnos realizar la investigación en sus prestigiosas instalaciones, de igual manera agradecemos el apoyo brindado por el departamento de parasitología agrícola de la misma y al laboratorio de toxicología de dicho departamento por el apoyo brindado durante el estudio realizado.

Referencias

- 1) USDA-ERS Livestock, Dairy and Poultry Outlook. 2017.
- 2) SIAP (Servicio de información agroalimentaria y pesquera) producción ganadera. http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/apecnal.jsp?id=2 2017.
- 3) Kung L Jr. Fermentación de ensilajes y aditivos. En: Procedimientos de Alltech 's 17mo Simposio Anual. (KA Jacques y TP. Lyons, eds). Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido, p. 145-159, <http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/formulation/articles/silage-fermentation-additives-t369/800-p0.htm> 2001.
- 4) Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcero AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Cavaglieri LR, Fungi and mycotoxins in silage: an overview, *Journal of Applied Microbiology* 2013; (115):637-643.
- 5) Keady TWJ, Kilpatrick DJ, Mayne CS, Gordon FJ, Effects of replacing grass silage with maize silages, differing in maturity, on performance and potential concentrate sparing effect of dairy cows offered two feed value grass silages. *Livestock Science* 2008; (119):1–11.
- 6) Millen, DD, Pacheco RDL, Arrigoni MDB, Galyean ML, Vasconcelos JT, A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *Journal of Animal Science* 2009;(87):3427–3439.
- 7) Alpizar SC, Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes, *Revista Ciencias veterinarias* 2013;(1):7-31.

- 8) OudeElferink SJ, Drienhuis SF, Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Electronic conference on Tropical silage;2001.
- 9) Garon D, Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental Study. *J. Agric. Food Chem* 2006;(54):3479-3484.
- 10) Reyes-Velázquez WP, Espinoza VH, Rojo F, Jiménez-Plasencia C, Palacios E, Hernández-Góbora J, Ramírez-Álvarez A, Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* 2008;(25):182-185.
- 11) O'Brien M, Kiely P, Forristal P, and Fuller H, Fungal contamination of big bale grass silage on irish farms: redominantmould and yeast species and features of bales and silage. *Grass and Forage Science* 2008;(63):121–137.
- 12) Carrillo L, Mohos y Micotoxinas. *J. Agric Food Chem* 2003:1-24.
- 13) Keller M, Keller K, Monge M, Pereyra C, Alonso V, Cavaglieri L, Chiachiera S, and Rosa C, Gliotoxin contamination in pre- and postfermented corn, sorgum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Appl. Microbiol* 2012; (5):865-873.
- 14) Bautista, F.; Delfin, H.; Delgado, M.C.; Palacio, J.L, Manual de Tecnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales 2004: 351-355.
- 15) Barnett HL y Hunter BB, Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press. Saint Paul, Minnesota;1998.
- 16) Leslie JF, Summerell BA, The Fusarium Burkinafaso. Laboratory manual. Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa;2006.

- 17) Doyle JJ, Doyle JL, Isolation of plant DNA from fresh tissue Focus 1990;(12):13-15.
- 18) O'kiely P, Mceniry J y Cummins B, Quantification and identification of fungal propagules in bales of grass silage produced using standard farm procedures. TEAGASC Research reports 2006:43-44.
- 19) Beatriz RM, Mariela AS, Belén RM, Pereyra S, Soraci A, Ofelia TM, Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. Revista Iberoamericana de Micología 2009;(4):233-237.
- 20) Alonso VA, Monge MP, Dalcero AM, Keller KM, Rosa CA, Cavaglieri LR and Chiacchiera SM, Contribution of raw materials on dairy cattle feedstuff aflatoxin contamination in central Argentina. Rev Bras Med Vet 2009;(31):92–99.
- 21) González-Pereyra, ML, Chiacchiera SM, Rosa CAR, Sager R, Dalcero AM and Cavaglieri L, Comparative analysis of mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. J Sci Food Agric 2009;(91):1474–1481.
- 22) Moreno VM, Yañez MMJ, Rojas MRI, Zavaleta ME, Trinidad SA, Diversidad de hongos en semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 2005;(23):111-118.
- 23) Magos GK, Leyva MSG, Mariscal ALA, Etiología de la pudrición de bulbo y tallo de la azucena híbrida (*Lilium* spp.) y su Control en el Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología 2010;(28):162-164.

- 24) Ochoa YM, Cerna E, Gallegos G, Landeros J, Delgado JC, Hernández S, Rodríguez R, Olalde V, Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo, en Aguascalientes, México. Revista Mexicana de Micología 2012:27-31.

Cuadro 1. Resultados de la caracterización morfológica y molecular de los aislados por las secuencias intergénicas (ITS) reportadas en el banco de genes, de diferentes hongos aislados de ensilaje de maíz.

Localidad	Estado	Municipio	Hongo	No. de nucleótidos	No. De referencia de Acceso *NCBI ¹	Índice de similaridad
1	Aguascalientes	Tepezalá 1	<i>Fusarium moniliforme</i>	896	KC341968	100%
			<i>Aspergillus fumigatus</i>	979	MF276893	100%
2	Aguascalientes	Tepezalá 2	<i>F. chlamydosporum</i>	929	MG250449	99%
3	Aguascalientes	Jesús María	<i>F. oxysporum</i>	887	KY305290	98%
			<i>A. flavus</i>	976	KX426971	99%
4	Aguascalientes	Rincón de Romos	<i>Geotrichum galactomyces</i>	536	KX928828	97%
			<i>F. oxysporum</i>	885	MG020684	99%
5	Aguascalientes	San Francisco de los Romos	<i>F. moniliforme</i>	896	KC341968	99%
			<i>F. oxysporum</i>	887	MG274298	98%
6	Guanajuato	Silao	<i>A. fumigatus</i>	691	KF297598	97%
7	Guanajuato	Romita	<i>A. fumigatus</i>	637	KT899783	97%
8	Guanajuato	La Aldea	<i>A. flavus</i>	976	KX426971	99%
9	Zacatecas	Ojocaliente	<i>A. fumigatus</i>	578	MG321622	97%
10	Zacatecas	Luis Moya	<i>G. galactomyces</i>	536	JQ668720	97%
11	Zacatecas	Loreto	<i>A. fumigatus</i>	979	MF491723	99%
12	Jalisco	Betulia	<i>A. fumigatus</i>	639	KY828918	97%
13	Jalisco	Ejido de Matamoros	<i>A. fumigatus</i>	979	MG991665	100%
			<i>G. galactomyces</i>	635	AJ279451	97%

¹Base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information)

Detección molecular (PCR) de Fumonisin, Ácido Fusarico y Fusarinas en ensilaje de maíz

Jazmín Janet Velázquez-Guerrero¹, Roberto Ríos-Valadez¹, Ernesto Cerna Chávez², Juan Carlos delgado Ortiz³, Jerónimo Landero Flores², Teóduo Quezada Tristán⁴, *Yisa María Ochoa Fuentes² *Autor Correspondiente yisa8a@yahoo.com

¹ Estudiantes de doctorado del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315.

² Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315.

³ Cátedras CONACyT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315.

⁴ Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, Jesús María, Aguascalientes, México.

RESUMEN:

El hongo fitopatógeno del genero *Fusarium* spp afecta los cultivos, causando pérdidas económicas, poco rendimiento y la baja calidad del grano, estos hongos son capaces de producir micotoxinas llamadas Fumonisina, Tricotecenos, Zearalenona, Moniliformina, que contamina el alimento que consume el ganado como es el caso del ensilaje de maíz y que a su vez producen trastornos a la salud del ganado. El objetivo del estudio fue identificar los genes precursores de micotoxinas de *Fusarium* spp. en ensilaje de maíz de los estados de Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato. Se realizaron cuatro muestreos de cada estado, haciendo un total de 16, se realizaron cultivos en medio PDA, se identificaron morfológica y molecularmente (ITS), obteniendo 63 cepas, donde 14 cepas fueron del genero *Fusarium*, donde dos fueron de *F. verticillioides*, seis de *F. Chlamydosporum* y seis de *F. oxysporum*, 12 de estos fueron aislados en el estado de Aguascalientes y 2 en el estado de Guanajuato. Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR confirmó la presencia de los genes precursores de las micotoxinas; Fumonisina (FUM1), Ácido Fusarico (FUB1) y Fusarina (FUSA), en cepas de hongos *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum*. El consumo de ensilaje de maíz, en el sistema de producción bovino, compete de un 40 a 50 % en su ingesta diaria, por lo tanto la presencia de estas micotoxinas es un factor de riesgo a la salud y producción del ganado que lo consume.

Palabras Clave: ensilaje de maíz, fusarium, fumonisinas, fusarinas y ácido fusarico

ABSTRACT

The phytopathogenic fungus of the genus *Fusarium* spp affects crops, causing economic losses, poor yield and low quality of the grain, these fungi are capable of producing mycotoxins called Fumonisin, Trichothecenes, Zearalenone, Moniliformina, which contaminates the food consumed by livestock such as the case of corn silage and that in turn produce disorders to the health of cattle. The objective of the study was to identify the mycotoxin precursor genes of *Fusarium* spp. in corn silage from the states of Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes and Guanajuato. Four samples of each state were made, making a total of 16, cultures were carried out in PDA medium, morphologically and molecularly (STI) were identified, obtaining 63 strains, where 14 strains were from the *Fusarium* genus, where two were from *F. verticillioides*, six of *F. Chlamydosporum* and six of *F. oxysporum*, 12 of these were isolated in the state of Aguascalientes and 2 in the state of Guanajuato. The results obtained by the PCR technique confirmed the presence of mycotoxin precursor genes; Fumonisin (FUM1), Fusaric Acid (FUB1) and Fusarina (FUSA), in fungus strains *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum*. The consumption of maize silage, in the bovine production system, corresponds to 40 to 50% in its daily intake, therefore the presence of these mycotoxins is a risk factor to the health and production of the cattle that consume it.

KEY WORDS: corn silage, *fusarium*, fumonisins, fusarins and fusaric acid

INTRODUCCIÓN:

Las especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Penicillium* se encuentran presentes en los concentrados, henos, forraje verdes y los ensilajes (Kabak *et al.*, 2006; Ogunade *et al.*, 2018), varias especies de estos géneros de hongos, pueden producir micotoxinas como: *Zearalenona*, Aflatoxina, Fumonisina, Ocratoxina y Tricotecenos (Gallo *et al.*, 2016; Loi *et al.*, 2017), cuando los animales se alimentan con ensilajes contaminados con estas micotoxinas, estas son capaces de ocasionar: disminución en la ingesta de alimentos, problemas reproductivos, baja producción de leche, inmunosupresión y muerte (Ogunade *et al.*, 2018). Particularmente el ensilaje de maíz, es un componente importante de las dietas utilizadas en la alimentación de las vacas lecheras en todo el mundo y uno de los principales patógenos que lo afectan es el hongo *Fusarium* spp. (El Yazeed *et al.*, 2011). Los *Fusarium* spp. son capaces de colonizar e infectar las plantas del maíz ocasionando infecciones asintomáticas (Silva *et al.*, 2004). Desjardins *et al.*, (2000), indican que las infecciones por hongos del género *Fusarium* spp. ocurren sistemáticamente en todas las partes de la planta de maíz, dañando los tejidos vegetales, además de que algunas especies de *Fusarium* producen metabolitos secundarios como las Fumonisininas (FUM), Tricótesenos, T-2, Ácido Fusarico (FUB1), Desoxinivalenol (DON) y Fusarinas (FUSA).

Las Fumonisininas son micotoxinas producidas por al menos 11 especies diferentes del hongo *Fusarium*, que incluyen los patógenos del maíz como lo son el *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum* (Leslie *et al.*, 2004; Yazar y Omurtag 2008; Proctor *et al.*, 2008). La Fumonisina en el alimento se ha reportado que puede causar leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, hemorragias, problemas genotóxicos, hepáticos y renales en rumiantes y cáncer neural en roedores (Marasas *et al.*, 2004; Pizzo *et al.*, 2016). La micotoxina Fumonisina es motivo de interés tanto para la salud de los animales como para el humano, debido a que la ingesta de maíz contaminado con Fumonisina está directamente asociado al cáncer de esófago (Hendricks, 1999).

El ácido fusarico es un metabolito secundario que actúa en una amplia gama de cultivos y en varias especies animales, es producida por el género *Fusarium*, de las especies *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* y *F. heterosporum* (Bernar y Ruiz, 2016). El

Ácido fusarico es un agente hipotensor en ratas, conejos, perros y gatos, reportando que la dosis LD₅₀ del ácido fusarico para ratones es de 100 mg/kg vía intravenosa (Porter *et al.*, 1995). El ácido fusárico en dosis agudas pueden elevar las concentraciones de triptófano y serotonina en el cerebro; también es un potente inhibidor de la dopamina-β-hidroxilasa, que es una enzima clave en la regulación de la síntesis de la neurotransmisora norepinefrina y en dosis agudas puede causar vómito y letargo en el cerdo (Weidenborner, 2011).

Las Fusarinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por el *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium graminearum* (Niehaus *et al.*, 2013), contienen al menos siete análogos diferentes los más importantes son: Fusarina A, Fusarina C y Fusarina D, que son clasificadas como micotoxinas que contaminan a los cereales como: trigo, maíz, avena, cebada y centeno (Maragos *et al.*, 2008; Sondergaard *et al.*, 2011). Estudios realizados por Sondergaard *et al.*, (2011), indican que la Fusarina C (FUSA) estimula una línea celular del cáncer de mama y se une a los receptores de estrógenos llamándolas micoestrogénicas y similares a los de la zearalenona.

El uso de la técnica de PCR han sido útil para la identificación de hongos y más recientemente se ha utilizado para la detección de patógenos fúngicos en tejidos vegetales, otro aspecto importante de usar las técnicas de PCR es de que solo se requieren una pequeñas cantidades de la muestra para obtener el ADN y así confirmar la presencia o ausencia de un patógeno en el huésped (El Yazeed *et al.*, 2011). El objetivo del estudio fue identificar los genes precursores de micotoxinas de *Fusarium* spp. en ensilaje de maíz de los estados de Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestreo

Se realizó un total de 16 muestreos en cuatro localidades diferentes, en cada uno de los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco, donde se produjera ensilaje de maíz, en los periodos de Noviembre-Diciembre del 2017 y Abril-Mayo del 2018, utilizando la tecnica “W” para la toma de las muestras (Bautista *et al.*, 2004).

Aislamiento de hongos de ensilaje

Para realizar el aislado del hongo *Fusarium* spp. de cada una de las muestras de ensilaje de maíz, se tomaron porciones de 5 g, posteriormente se les realizó cortes de aproximadamente 5 mm, obteniendo de cada muestra 12 submuestras, fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito sodio al 3% durante un minuto, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, se dejaron secar, se inocularon en placas petri con medio PDA acidificado (200 µL de ácido láctico al 85 %) y se incubaron a 28 °C ± 2 por 7 días. Posteriormente, se observó el crecimiento micelial y se realizó la purificación de los hongos.

Identificación morfológica

De cada uno de los cultivos de hongos purificados, se tomaron pequeñas porciones de los micelios con esporas y se colocaron en un porta objetos, donde ya se tenía una gota del colorante azul de algodón y se cubrían con el cubre objetos, se observaron al microscopio y se realizó la identificación de la especie *Fusarium* empleando las claves de Leslie y Summerell (2006).

Identificación molecular (ITS):

Utilizando el método de Doyle y Doyle (1990) se realizó la extracción de ADN. Al tener el resultado de la extracción el producto se corrió en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. Posteriormente se desarrolló el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) buscando las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), utilizando Taq&GO Mastermix (1.5 mM MgCl₂, 200 μM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 μL de ITS1 a 20 μM; 0.5 μL de ITS4 a 20 μM; 1 μL de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 μL. El programa al que se corrió la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72 °C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de la PCR se mandó al laboratorio Macrogen de Estados Unidos a secuenciar. Las secuencias resultantes se cotejaron con las secuencias de la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information), mediante el uso del programa BLAST.

Identificación molecular de genes precursores de micotoxinas Fumonisina (FUM1):

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el par de primer de secuencia (FUM1F, 5'-CCATC ACAGTG GGACACAGT -3', FUM1R, 5' CGTATCGTCAGCATGATGTA GC -3'), utilizando Taq&GO Mastermix (1.5 mM MgCl₂, 200 μM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 μL de FUM1 F a 20 μM; 0.5 μL de FUM1 R a 20 μM; 1 μL de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 μL. La PCR se realizó usando un termociclador modelo MaxyGen (Axygwn/EE.UU.). Las condiciones de la reacción de PCR de los iniciadores (FUM1F/FUM1R) fueron: 94 ° C durante 5 min y luego se sometieron a 35 ciclos de 1 min a 94 ° C; 1 minuto a 58 °C y 1 minuto a 72 °C. La extensión final a 72 ° C durante 10 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 0.9% (El-Yazeed *et al.*, 2011).

Identificación molecular Fumonisina (FUM1):

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el par de iniciadores de secuencia (Fum1F1, 5'- CACATCTGTGGGCGATCC-3 ', Fum1R2, 5'- ATATGGCCCCAGCTGCATA -3'), utilizando Taq&GO Mastermix (1.5 mM MgCl₂, 200 μM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 μL de Fum1F1 a 20 μM; 0.5 μL de Fum1R2 a 20 μM; 1 μL de DNA ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril se aforó a 15 μL. La

PCR se realizó usando un termociclador modelo MaxyGen (Axygwn/EE.UU.). Las condiciones de la reacción de PCR de los primer (Fum1F1 /Fum1R2) fueron: 95 ° C durante 15 min y luego se sometieron a 35 ciclos de 1 min a 94 ° C; 1 minuto a 58 °C y 1 minuto a 72 °C. La extensión final se ajustó a 72 ° C durante 10 min. Enseguida la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 0.9% (Stepien *et al.*, 2011).

Identificación molecular Ácido Fusarico (FUB1):

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el par de iniciadores de secuencia (P6F, 5'-CCATTGCCTAGTTAGCTGATAG-3', P6LFI, 5'-AGCCATTGGAGAGAGTCAT -3'), utilizando Taq&GO Mastermix (1.5 mM MgCl₂, 200 μM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 μL de P6F a 20 μM; 0.5 μL de P6LFI a 20 μM; 1 μL de DNA ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril se aforó a 15 μL. La PCR se realizó usando un termociclador modelo MaxyGen (Axygwn/EE.UU.). Las condiciones de la reacción de PCR (P6F /P6LFI) fueron: 95 ° C durante 2 min y luego se sometieron a 35 ciclos de 30 seg a 95 ° C; 30 seg a 58 °C y 30 seg a 72 °C. La extensión final se ajustó a 72 °C durante 10 min. Al terminar la PCR, para la visualización de las amplificaciones se pasaron a un gel de agarosa al 0.9% (Brown *et al.*, 2012).

Identificación molecular Fusarinas (FUSA):

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el par de iniciadores de secuencia (878, 5'-GCAACGGCTCTTGCTTGAAGCTGT-3', 879, 5'-CAGTGAAGAAGGCTTCGTGAATAGC -3'), utilizando Taq&GO Mastermix (1.5 mM MgCl₂, 200 μM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 μL de 878 a 20 μM; 0.5 μL de 879 a 20 μM; 1 μL de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 μL. La PCR se realizó usando un termociclador modelo MaxyGen (Axygwn/EE.UU.). Las condiciones de la reacción de PCR (878 /879) fueron: 95 ° C durante 2 min y luego se sometieron a 30 ciclos de 30 seg a 95 ° C; 30 seg a 57 °C y 30 seg a 72 °C. La extensión final se ajustó a 72 ° C durante 10 min. Se observó la amplificación en un gel de agarosa al 0.9% (Brown *et al.*, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Identificación morfológica.

De los 16 muestreos realizados en total a ensilajes de maíz, se identificaron 35 cepas de las siguientes especies: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces*, las cuales no tienen un antecedente para la producción de fumonisinas, ácido fusarico y fusarinas; solo 14 de ellas fueron del género *Fusarium* de los cuales dos fueron de *F. verticillioides*, seis de *F. chlamydosporum* y seis de *F. oxysporum*, 12 cepas fueron de Aguascalientes y 2 cepas de Guanajuato, en los estados de Zacatecas y Jalisco no se logró la identificación de esta especie; *F. verticillioides*, presentó cadenas largas de microconidios, monofialides y macroconidios abundantes, de tamaño corto relativamente delgados con paredes delgadas ligeramente curvados, célula apical curvada y célula basal en forma de pie. Las colonias de *F. chlamydosporum* se caracterizaron por su crecimiento micelial blanco y abundantes microconidias y sus macroconidias de punta curvada. Las cepas de *Fusarium oxysporum* produjeron micelios aéreos algodonosos de color blanco a violeta claro, microconidias abundantes unicelulares y bicelulares de forma ovoide a elipsoide, formadas en falsas cabezas, monofialides cortas y macroconidias pequeñas en forma de canoa con una corta célula apical y ligeramente curvada y célula basal trunca, con 3 a 5 septos.

Identificación molecular.

De las 35 cepas aisladas se identificaron: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces*, las cuales no tienen un antecedente para la producción de fumonisinas, ácido fusarico y fusarinas; solo 14 de esas cepas fueron *Fusarium* las cuales ya se habían identificado morfológicamente y se les realizaron PCR, estos fueron de las especies *F. verticillioides* y *F. oxysporum* con los primers FUM1F /FUM1R obteniendo un producto de la amplificación de entre los 183 pb (Figura 1) se realizó un segundo PCR con los primers Fum1F1 /Fum1R2 como corroboración del primer estudio molecular, donde se obtuvo un producto de amplificación de 1126 pb (Figura 2), también se usaron los primers para la identificación de Ácido Fusarico y Fusarinas. En Ác. Fusarico (FUB1) P6F/P6LFI consiguiendo un producto de amplificación de 800pb como se observa en la figura 3 y en Fusarinas (FUSA) 878/879 obteniendo un producto de amplificación de 780pb como se

ve en la figura 4, los resultados obtenidos de las amplificaciones de los pb coinciden con los autores mencionados en el cuadro 1.

Cuadro 1. Primers empleados para la detección de genes precursores de micotoxinas de especies de *Fusarium*.

PRIMER	GEN	SECUENCIA	PESO (pb)	REFERENCIA
FUM1F FUM1R	FUM1	CCATC ACAGTG GGACACAGT CGTATCGTCAGCATGATGTA GC	183	El-Yazeed <i>et al.</i> , 2011
Fum1F1 Fum1R2	FUM1	CACATCTGTGGGCGATCC ATATGGCCCCAGCTGCATA	1126	Stepien <i>et al.</i> , 2011
P6F P6LFI	FUB1 (Ac. fusarico)	CCATTGCCTAGTTAGCTGATAG AGCCATTGGAGAGAGTCAT	800	Brown <i>et al.</i> , 2012
878 879	FUSA (Fusarinas)	GCAACGGCTCTTGCTTGAAGCTGT CAGTGAAGAAGGCTTCGTGAATAGC	780	

En el Cuadro 2, se aprecia la totalidad de las muestras que amplificaron utilizando los primers FUM1F /FUM1R y FUM1F1/FUM1R2 donde solo una de las dos de *F. verticillioides* y tres de seis de *F. oxysporum* amplificaron, a diferencia de El-Yazeed *et al.*, 2011, donde en su estudio amplificaron todas las muestras de *F. verticillioides* al FUM1 y no se presentó amplificación en la cepa de *F. oxysporum*; Stepien *et al.*, (2011) desarrollaron los primers FUM1F1/FUM1R2 para determinar la presencia del gen FUM1 en siete especies de *Fusarium* (*F. anthropilum*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*) teniendo como resultado la presencia del gen en 26 de los 30 aislados analizados. También en el cuadro 2 se observa que las muestras amplificaron ante los iniciadores P6F/P6LFI y 878/879 donde solo una de las dos de *F. verticillioides* amplificó y tres de seis de *F. oxysporum*, para indicar la presencia de fusarinas y ácido fusarico (FUB1) se utilizaron los primers P6F/P6LFI para la detección de ác. fusarico (FUB1) y 878/879 para fusarinas (FUSA) para confirmar la presencia del gen policétido sintasa (PKS), el cual es iniciador de la presencia de estas dos toxinas.

Cuadro 2. Cepas que amplificaron a alguno de los genes involucrados en la síntesis de micotoxinas

ESPECIE	FUMONISINAS		Ác. FUSARICO	FUSARINAS
	FUM1F/ FUM1R	FUM1F1/ FUM1R2	P6F/ P6LFI	878/ 879
<i>F. verticillioides</i>	1	1	1	1
<i>F. oxysporum</i>	3	3	3	3
Total		4/8	4/8	4/8

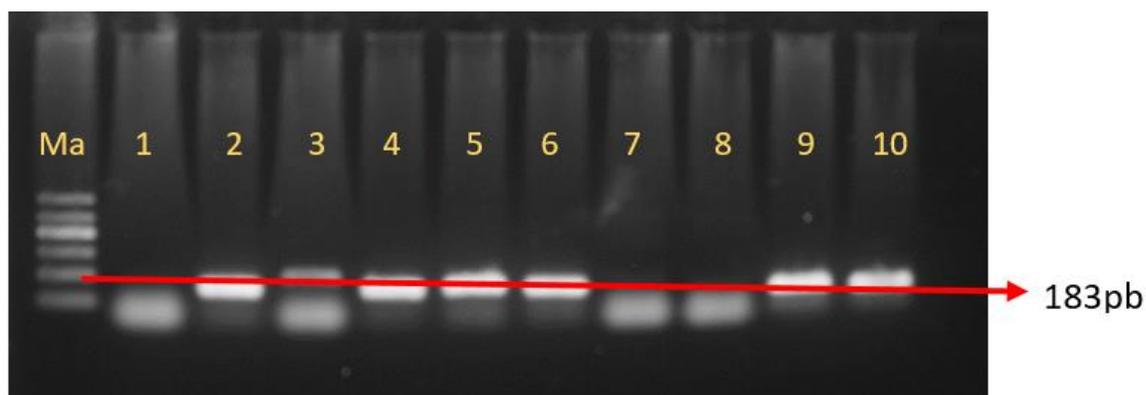


Figura. 1. Identificación Molecular (FUM1) FUM1F /FUM1R. En el gel de agarosa al 0.9%, se observa el carril de la izquierda el marcador de peso molecular (Ma), en los carriles 1-2 los aislados de *F. verticillioides*, en los carriles del 3-8 los aislados de *F. oxysporum* y en los carriles 9-10 son controles positivos, los aislados amplificaron a 183pb

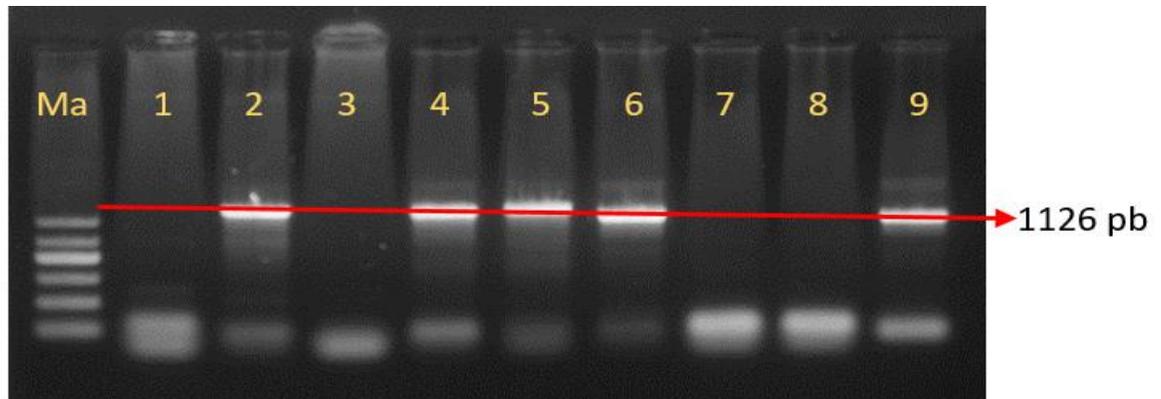


Figura. 2. Identificación Molecular (FUM1) Fum1F1 /Fum1R2. En el gel de agarosa al 0.9%, se observan el carril de la izquierda el marcador de peso molecular (Ma), en los carriles 1-2 aislados de *F. verticillioides*, en los carriles del 3-8 aislados de *F. oxysporum* y en el carril 9 el control positivo, los aislados amplificaron a 1126 pb

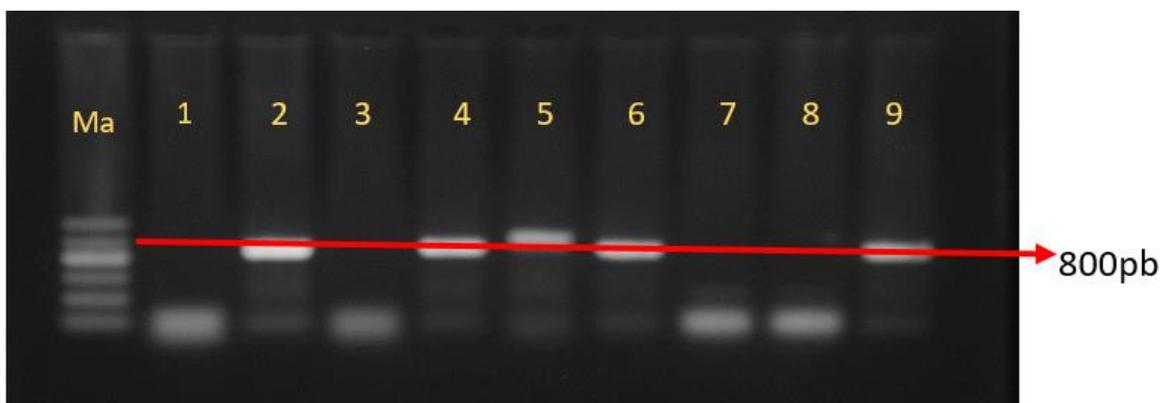


Figura.3. Identificación molecular (FUB1) P6F/P6LFI. En el gel de agarosa al 0.9% se observa en el carril de la izquierda el marcador de peso molecular (Ma), en los carriles 1-2 aislados de *F. verticillioides*, en los carriles del 3-8 aislados de *F. oxysporum* y en el carril 9 el control positivo, los aislados amplificaron a 800pb

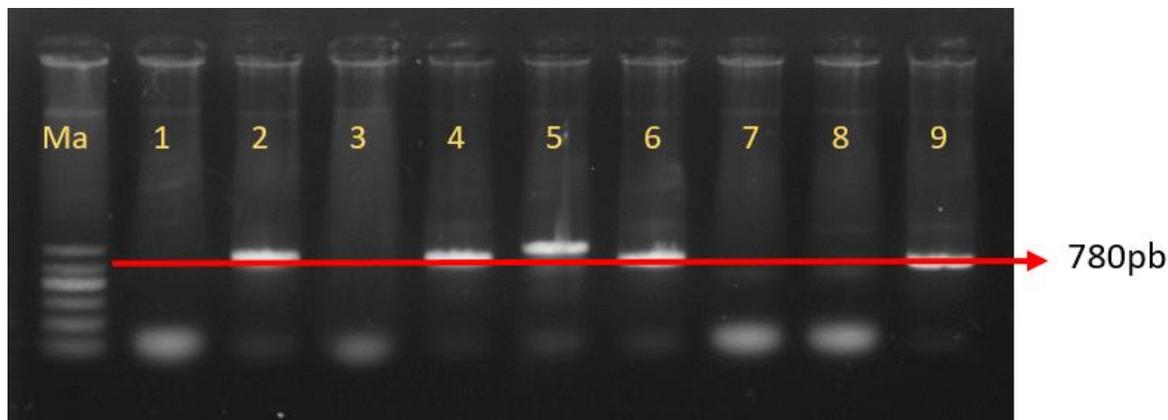


Figura. 4. Identificación molecular (FUB1) P6F /P6LFI. En el gel de agarosa al 0.9% se observa en el carril de la izquierda el marcador de peso molecular (Ma), en los carriles 1-2 aislados de *F. verticillioides*, en los carriles del 3-8 aislados de *F. oxysporum* y en el carril 9 el control positivo, los aislados amplificaron a 780pb

CONCLUSIÓN:

Este estudio se confirmó la presencia de los genes precursores de micotoxinas; fumonisina con el gen (FUM1), ácido fusárico (FUB1) y fusarinas (FUSA), en cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum* en ensilaje de maíz de los estados de Aguascalientes y Guanajuato.

BIBLIOGRAFÍA:

Bautista F; Delfín H; Delgado MC; Palacio JL, Manual de Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. 2004; 351-355.

Bernar EM, Ruiz JA. El ácido fusárico, micotoxina producida por *Fusarium* spp., afecta negativamente el crecimiento de *Pseudomonas protegens* Pf-5 mediante el secuestro de hierro y la producción de especies reactivas de oxígeno. Revista Química Viva. 2016; 3: 28-46.

Brown DW, Butchko RA, Busman M, Proctor RH. Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet Biol. 2012; 49: 521–532.

- Desjardins AE, Manandhar HK, Plattner RD, Manandhar GG, Poling SM, Margos CM. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxin and gibberlic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 1020-1025.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990; 12:13-15.
- El-Yazeed HA, Hassan A, Reda EAM, Hamed M, Refai M, Molecular detection of Fumonisin-producing *Fusarium* species in animal feeds using polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Sciences Research.* 2011; 7: 420-427.
- Gallo A, Bertuzzi T, Giuberti G, Moschini M, Bruschi S, Cerioli C, Masoero F. New assessment based on the use of principal factor analysis to investigate corn silage quality from nutritional traits, fermentation end products and mycotoxins. *Journal Science agriculture food.* 2016; 96: 437-448.
- Hendricks K. Fumonisin and neural tube defects in South Texas. *Epidemiology.* 1999; 10: 198-200.
- Jurado M, Vázquez C, Callejas C, González-Jaén MT. Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the south west of Spain. *Mycotoxin Res.* 2006; 22: 87-91.
- Kabak B, Dobson AD, Var I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006; 46: 593-619.
- Leslie JF, Zeller KA, Logrieco A, Mulé G, Moretti A, Ritieni A. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Appl Environ. Microbiol.* 2004; 70: 2254-2262.
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Burkinafaso. Laboratory manual.* Blackwell Publishing. 2006. State Avenue, Ames, Iowa.
- Loi M, Fanelli F, Liuzzi VC, Logrieco AF, Mulè G. Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins (Basel)* 2017; 9:111

- Maragos CM, Busman M, Plattner RD. Development of monoclonal antibodies for the fusarin mycotoxins. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2008; 25: 105-114.
- Marasas WF, Riley RT, Hendricks K, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van WJ, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WC, Allegood J, Martínez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J. Nutr.* 2004; 134: 711-716.
- Niehaus EM, Kleigrewe K, Wiemann P, Studt L, Sieber CM, Connolly LR, Freitag M, Güldener U, Tudzynski B, Humpf HU. Genetic manipulation of the *Fusarium fujikuroi* fusarin gene cluster yields insight into the complex regulation and fusarin biosynthetic pathway. *Chem Biol.* 2013; 20:1055-1066.
- Ogunade IM, Martinez-Tupia C, Queiroz OCM, Jiang Y, Wu F, Vyas D, Adesogan EN. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J Dairy Sci.* 2018; 101: 4034-4059.
- Pizzo F, Caloni F, Schreiber NB, Cortinovis C, Spicer LJ. In vitro effects of deoxynivalenol and zearalenone major metabolites alone and combined, on cell proliferation, steroid production and gene expression in bovine small-follicle granulosa cells. *Toxicon.* 2016; 109: 70–83.
- Porter JK, Bacon CW, Wray EM, Hagler WM. Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats. *Natural Toxins.* 1995; 3: 91-100.
- Proctor RH, Busman M, Seo JA, Lee YW, Plattner RD. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genet Biol.* 2008; 45: 1016-1026.

- Silva JB, Dilkin P, Fonseca H, Corrêa B. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Braz. J. Microbiol.* 2004; 35: 182-186.
- Sondergaard TE, Hansen FT, Purup S, Nielsen AK, Bonefeld-Jorgensen EC, Giese H, Sorensen JL. Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast cancer cells in vitro. *Toxicol Lett.* 2011; 205: 116-121.
- Sreenivasa MY, Dass RS, Charith Raj AP, Janardhana GR. Molecular Detection of Fumonisin Producing *Fusarium* Species of Freshly Harvested Maize Kernels Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Taiwania.* 2006; 51(4): 251-257.
- Stepien L, Koczyk G, Waskiewicz A. *FUM* cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal biology.* 2011; 115: 112 - 123.
- Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int. J. Mol. Sci.* 2008; 9: 2062-2090.

CONCLUSIÓN GENERAL

En este estudio se lograron dos primeros reportes en México; el primero de *Monascus ruber* en ensilaje de maíz y de alfalfa en los estados de Aguascalientes y Jalisco, el segundo reporte fue *Monascus purpureus* en ensilajes de maíz, avena, triticale y alfalfa en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas.

Se aislaron e identificaron en ensilaje de maíz las especies de *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *F. chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *Geotrichum galactomyces* en el estado de Aguascalientes; *A. fumigatus* y *A. flavus* en Guanajuato; *A. fumigatus* y *G. galactomyces* en Zacatecas y *A. fumigatus* y *G. galactomyces* en Jalisco.

En este mismo estudio se permite confirmar la presencia de micotoxinas de los hongos del generos *Fusarium* como son: Fumonisinias (FUM1), Ácido Fusarico (FUB1) y Fusarinas (FUSA), en cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum* en el ensilaje de maíz de al menos dos de los cuatro estados que se muestrearon, los cuales fueron Aguascalientes y Guanajuato.