



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**TOXICIDAD DE *Acremonium zeae* (GAMS &
SUMMER) Y SU EFECTO EN POLLOS DE
ENGORDA EN INICIACIÓN**

ALMA SÁNCHEZ BAUTISTA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO.DE MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada: **TOXICIDAD DE *Acremonium zeae* (GAMS & SUMMER) Y SU EFECTO EN POLLOS DE ENGORDA EN INICIACIÓN** realizada por la alumna **ALMA SÁNCHEZ BAUTISTA**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR:



DR. JUAN MANUEL CUCA GARCÍA

ASESOR:



DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2011.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico a través de la beca de maestría, con número de becario 294360.

Al Colegio de Postgraduados por ser una institución formadora de profesionales.

Al Dr. Carlos De León, con todo respeto y admiración por la dirección, apoyo y entusiasmo que aportó a esta investigación. De igual modo agradezco la confianza que tuvo en mí para la realización de este proyecto.

Al Dr. Juan Manuel Cuca García por su apoyo y acertadas aportaciones las cuales enriquecieron la investigación.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano por su disponibilidad, orientación y sugerencias para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por su orientación y sugerencias al proyecto.

Al Dr. Daniel Nieto, Dr. Daniel Ochoa, Dr. Sergio Sandoval y Dra. María de Jesús Yañez, por el apoyo brindado en la fase de laboratorio de esta investigación.

A mis amigos y compañeros de postgrado Gabriela Pelayo, Ma. Guadalupe Hernández, Berenice Valencia, Jaime Urzua, Daniel García, Lauro Soto, Jennifer Martínez, Alma Solano, Andrés Quesada y Elvis García quienes me brindaron su apoyo durante mi estancia en la maestría y el desarrollo de mi investigación.

DEDICATORIA

A mis padres Martin y Gilda,
por el apoyo y motivación que me brinda en cada proyecto de mi vida.

A mis hermanos Abraham y Montserrat,
por sus muestras de cariño y apoyo que me motivan a alcanzar mi metas.

A mi esposo Salvador Flores,
quien me da la fortaleza para alcanzar mis metas, con su amor y comprensión.

A mi hija Victoria
con todo el amor del mundo, gracias pequeña por llegar a alegrar nuestras vidas y
ser mi nueva inspiración para lograr mis metas.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
TOXICIDAD DE <i>Acremonium zeae</i> (GAMS & SUMMER) Y SU EFECTO EN POLLOS DE ENGORDA EN INICIACIÓN	
RESUMEN GENERAL.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
Importancia del maíz.....	2
Usos del maíz.....	4
Principales enfermedades del cultivo del maíz.....	6
Hongos productores de toxinas.....	7
REFERENCIAS.....	12
CAPITULO I. PUDRICIÓN DE MAZORCA POR <i>Acremonium zeae</i> EN MAÍZ EN EL ESTADO DE VERACRUZ	
1.1. RESUMEN.....	14
1.2. ABSTRACT.....	15
1.3. INTRODUCCIÓN.....	16
1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1.4.1. Colecta de mazorcas infectadas con <i>A. zeae</i>	18
1.4.2. Aislamiento del hongo.....	18
1.4.3. Identificación taxonómica y molecular del hongo.....	19
1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
1.6. REFERENCIAS.....	22

CAPITULO II. EFECTO TÓXICO DE *Acremonium zeae* EN AVES DE ENGORDA

2.1.	RESUMEN.....	24
2.2.	ABSTRACT.....	25
2.3	INTRODUCCIÓN.....	26
	2.3.1. Cefalosporina, derivado del género <i>Acremonium</i> spp.....	27
	2.3.2. Compuestos tóxicos derivados de <i>Acremonium</i> spp.....	28
2.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
	2.4.1. Incremento del hongo.....	33
	2.4.2. Análisis de toxinas.....	34
	2.4.3. Elaboración de las dietas.....	34
	2.4.4. Establecimiento del ensayo.....	36
2.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
2.6.	CONCLUSIÓN.....	40
2.7.	REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	
Cuadro 1. Principales hongos toxicogénicos y micotoxinas más frecuentes.....	9
 CAPITULO II	
Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales durante la etapa de cero a tres semanas elaboradas con diferentes porcentajes de avena contaminada con <i>Acremonium zeae</i>	35
Cuadro 2. Evaluación de peso en pollos de cero a tres semanas alimentados con diferentes porcentajes de avena inoculada con <i>Acremonium zeae</i>	38
Cuadro 3. Consumo de alimento de pollos de cero a tres semanas alimentados con cinco diferentes porcentajes de avena inoculada con <i>Acremonium zeae</i>	39

ÍNDICE DE FÍGURAS

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	
Figura. 1 Estados de la Republica Mexicana donde se han realizado estudios con micotoxinas.....	8
 CAPITULO I	
Figura 1. A) Conidióforo con conidios agrupado en cabezuela, formando un ángulo de 90° entre el micelio y el conidióforo, B) Cepa de <i>Acremonium zeae</i> 15 días después de su siembra.....	21
 CAPITULO II	
Figura 1. Ciclo de vida de hongos endofiticos del género <i>Acremonium</i>	30

TOXICIDAD DE *Acremonium zeae* (GAMS & SUMMER) Y SU EFECTO EN POLLOS DE ENGORDA EN INICIACIÓN

RESUMEN GENERAL

El maíz tiene gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. Al igual que muchos otros cultivos, éste es afectado por enfermedades de origen fungosas, dentro de las cuales están destacan las pudriciones de mazorca asociadas a varias especies de hongos patogénicos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Stenocarpella* y *Cephalosporium*. Algunos de los hongos antes mencionados producen importantes micotoxinas como las aflatoxinas, los tricotecenos, la ocratoxina A, las fumonisinas y la zearalenona, las cuales constituyen un riesgo para la salud humana y animal, ya que al consumir alimentos contaminados se corre el riesgo de presentar un cuadro de micotoxicosis. Por lo anterior en la presente investigación se plantearon dos objetivos principales: I) Identificar el agente patogénico causante de la pudrición de granos de maíz colectados en la región de Los Tuxtlas, al sur del estado de Veracruz con síntomas de estriado en el pericarpio y II) Investigar la posibilidad de que el agente patogénico identificado produzca micotoxinas que afecten de manera negativa la ganancia de peso y consumo de alimento de pollos de engorda en iniciación. La identificación del hongo responsable de la pudrición de granos de maíz se realizó mediante claves taxonómicas y la técnica molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) llegando a identificarlo como *Acremonium zeae*. Una vez identificado se realizó el experimento con pollos recién nacidos los cuales fueron alimentados con cinco dietas a las cuales se adicionaron diferentes porcentajes de avena contaminada con *A. zeae*, los tratamientos fueron T1, 0 % avena contaminada: 100 % de maíz, (testigo); T2, 25 % avena contaminada: 75 % de maíz; T3, 50 % avena contaminada: 50 % de maíz; T4, 75 % avena contaminada: 25 % de maíz; y, T5, 100 % avena contaminada: 0% de maíz. Se registró el incremento de peso y consumo de alimento cada siete días durante tres semanas y mediante un análisis estadístico de los datos obtenidos se demostró que la presencia de *Acremonium zeae* en la dieta afecta la ganancia de peso y consumo de alimento.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), es uno de los cereales alimenticios más antiguos que se conocen. Este cereal pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, son comúnmente llamadas teosinte y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas silvestres parientes de *Zea mays* (FAO, 2010). Hoy día, el maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo. Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. El petróleo es el primer producto natural que mayor número de usos tiene seguido por el maíz; que a su vez constituye el recurso renovable más importante del mundo. La producción de este cereal a nivel mundial alcanzó un crecimiento de 75%, entre 1980 y 2006 con producción de 400 a 1100 millones de toneladas (Mton) en una superficie sembrada de 150 millones de hectáreas (Mha). A lo anterior, contribuyen cinco factores principales: 1) el aumento significativo en la población humana, 2) la producción de pollo; 3) la investigación de nuevos usos por parte de la industria; 4) la presión que ejerce China en cuanto al consumo de granos y 5) el sensible crecimiento de la producción de etanol y biodiesel en Estados Unidos de América, originando que la demanda del grano supere sus niveles de producción. A diferencia de otros cereales, el maíz se puede cultivar en casi todos los climas, altitudes y tipos de suelo, lo que ha permitido su difusión en todo el mundo. Existen dos tipos de mercado: a) como ingrediente, para alimento animal, ya que solamente seis países utilizan el 80% de la producción mundial y únicamente cinco encabezan el 95% de las exportaciones b) Residual,

porque únicamente 10 % de la producción mundial ingresa al mercado internacional (Salazar y Godínez, 2010).

México es el primer productor y consumidor de maíz blanco en el mundo y el cuarto productor de maíz amarillo. La producción de maíz representa casi el 12% del PIB del sector agropecuario del país, sin considerar el valor agregado que se genera a lo largo de la cadena productiva de dicho grano. Para dimensionar la importancia del maíz en la economía mexicana se anota que existen más de 3 millones de productores de maíz que junto con sus familias representan 55 % de la población rural del país y alrededor del 13 % de la población total. Asimismo, estos representan al 60 % de los productores agrícolas del país (Salazar y Godínez, 2010).

Para México, el maíz es el cultivo más importante desde el punto de vista alimenticio, industrial y social y ocupa el cuarto lugar como productor de grano a nivel mundial después de Estados Unidos, China y Brasil (FAO, 2010). Al cierre del ciclo 2008-2009, se estimó una superficie sembrada en nuestro país de 8 069 000 hectáreas con una tasa de crecimiento media anual de 2.6 %. La media de producción nacional se estima en 3.3 tha^{-1} , sin olvidar que la mayor parte de la producción de maíz se da en el ciclo de primavera-verano. La mayor superficie sembrada en este ciclo fue de 82% contra 18% de riego, con 43% del volumen de producción éste último. En México, 92% de la producción de maíz es de endospermo blanco, lo que permite cubrir la demanda de consumo humano nacional, en tanto que 7% corresponde a amarillo y 1% a otros tipos de color de endospermo. (SIAP, 2010). En 2008, la producción de maíz fue de 24.8 Mton, siendo

Sinaloa, Jalisco y México los principales estados productores; sin embargo, en el ciclo otoño-invierno la producción se concentró en Sinaloa, con 75% del total. De esta forma, el consumo nacional aparente de maíz en 2008 fue de 34 Mton por lo que la producción nacional logró cubrir 73% de la demanda nacional (SIAP, 2010).

Usos del maíz

El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. La mayor proporción de la producción mundial de maíz se usa en alimentación animal. En algunos países, el maíz se emplea como alimento para consumo humano en cantidades significativas. Además, este grano es una importante fuente de materia prima para producir almidón y derivados, como edulcorantes, aceite y alcohol, entre otros. Estos últimos, ya están siendo utilizados en cierta medida como materia prima en la industria química y, en algunos casos, como sustituto de productos derivados del petróleo. A diferencia de este, el maíz presenta varias ventajas ya que es un recurso renovable, los productos finales obtenidos son biodegradables y su degradación no altera el balance de CO₂ atmosférico (Robutti J.L., 2007).

Aproximadamente la mitad del maíz producido en los trópicos se consume directamente como alimento por los humanos, cerca del 40% se utiliza como alimento para animales y el resto está destinado a otros usos (FAO, 2010). Del maíz nada se desperdicia, todo se aprovecha: las hojas verdes o secas, los tallos, la espiga, el olote, el grano, incluso el agua residual del nixtamal se utiliza para la

elaboración de algunos antibióticos y fármacos. Esta planta es quizás la única con mayor diversidad de usos, aplicaciones, formas y condiciones de producción. El elote se come asado o cocido, rebanado en guisados, ya sea entero o molido, los granos de maíz se emplean para pinoles, galletas y para la elaboración de tortillas previamente nixtamalizados. De acuerdo con el sistema agroindustria de México, el proceso de fabricación de tortillas incluye tres tipos de industria cuya materia prima es el maíz: a) fabricación de tortilla, b) molienda de nixtamal y c) industria para la fabricación de harina de maíz nixtamalizado. En México el consumo diario de tortillas es de 300 g *per capita* (Salazar y Godínez, 2010). Otro uso que se da al maíz es como forraje para animales, ya que es un excelente alimento especialmente para las vacas lecheras. El maíz amarillo es el más adecuado para alimentar al ganado, al cual se le da grano quebrado, seco o cocido al vapor (Salazar y Godínez, 2010). La producción de alimentos balanceados es, desde el punto de vista cuantitativo, la más importante, siguiéndole la industria de la molienda húmeda y la de la molienda seca (Robutti J.L., 2007).

En la industria, el maíz amarillo se ha convertido en un ingrediente fundamental de productos industriales como almidones y derivados químicos, fibras y plásticos a partir de sustancias naturales, lo cual representa un enorme paso para la industria química que está dando la alternativa de sustituir productos derivados del petróleo y el gas, papel hecho a base de maíz que se elabora con almidón, dextrina, dextrosa y almíbar de maíz, jabones, geles, lociones y cosméticos, además de colorantes y cerca de 85 antibióticos que lo utilizan en sus fórmulas. La calidad requerida no se orienta hacia ningún tipo en particular. La exigencia de esta industria se refiere

principalmente a la homogeneidad de las partidas en cuanto a textura y a la no contaminación por micotoxinas (Robutti J.L., 2007).

Principales enfermedades del cultivo del maíz

El maíz en los ambientes tropicales es atacado por un gran número de patógenos que causan importantes daños económicos a su producción. Algunas enfermedades son universales y ocurren en casi todos los ambientes en que se cultiva el maíz; incluyendo los tizones, las royas y manchas de las hojas y tallo y las pudriciones de mazorca. Algunas enfermedades son de importancia regional pero que pueden causar importantes pérdidas económicas, incluyendo, los mildius en Asia que se han difundido a algunos países de África y de América, el virus estriado del maíz (Corn Streak Virus) en África subsahariana y el mosaico de la caña de azúcar en maíz en México, Centro y Suramérica. La maleza parásita conocida como *Striga* también causa serias pérdidas en la producción de maíz en África subsahariana (FAO, 2010). Los virus que causan importantes enfermedades en el maíz son Mosaico enanismo del maíz (Maize dwarf mosaic potyvirus, MDMV), Moteado clorótico del maíz (Maize chlorotic mottle machlomovirus, MCMV), Rayado fino del maíz (Maize rayado fino marafivirus, MRFV) y mosaico de la caña en maíz. Entre los nemátodos que se encuentran dañando este cultivo se encuentran *Meloidogyne incognita*, *M. chitwoodi*, *M. arenaria*, *M. javanica* y otras especies incluyendo *Pratylenchus hexincisus*, *P. penetrans*, *P. zaeae*, *P. minor* considerados los más importantes porque se encuentran asociados a raíces (Gijón, 2009). Las enfermedades bacterianas también se encuentran presentes y se consideran de importancia, dentro de las que se encuentran la pudrición bacteriana de tallo

causada por *Erwinia chrysanthemi*, la marchitez de Stewart por *Pantoea stewartii* y el rayado bacteriano foliar por *Pseudomonas rubrilineans*. Dentro de las principales enfermedades por hongos que afectan el cultivo del maíz están, tizones, mildius, pudriciones, manchas foliares, marchitez, carbones y royas (CIMMYT, 2004), siendo de gran importancia las pudriciones de tallo por *Fusarium* y *Botryodiplodia*, así como las pudriciones de mazorca causadas por varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Stenocarpella*, *Nigrospora* y *Cephalosporium*. Las enfermedades fungosas en maíz representan pérdidas económicas importantes para la producción agrícola, además de propiciar el deterioro en el valor nutritivo de los granos por la degradación de proteínas, grasas, carbohidratos y vitaminas (Carvajal y De León, 2010).

Hongos productores de toxinas

El maíz es el cereal de mayor importancia para nuestro país sobre todo porque forma parte de la dieta alimenticia en animales y humanos. Se estima que los mexicanos consumimos 500 g de maíz *per capita*, en cualquiera de sus presentaciones. Asimismo, gran porcentaje del maíz producido en México se destina para la alimentación de aves de corral, cerdos, bovinos y equinos, en rastrojos y desechos de un maíz ya procesado (Carvajal y De León, 2010). Dentro de las enfermedades causadas por hongos, los cuales desarrollan en materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos, se llegan a formar metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del hongo frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas y/o animales (Duarte y Villamil, 2006). Estos metabolitos que enferman o matan a los animales

que los consumen se conocen como micotoxinas, y la afección micotoxicosis. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados; y, micotoxicosis secundaria al comer carne o leche de animales que ingirieron alimentos con micotoxinas (UNSA, 2010). Se estima que el 25 % de la producción mundial de cereales se encuentra contaminada (Duarte y Villamil, 2006).

Existen especies de hongos que son productoras de micotoxinas de las cuales, muchas de ellas, producen graves enfermedades en humanos y animales. Estas especies producen diferentes grados de toxicidad en los productos agrícolas.

Actualmente la regulación mexicana solo establece límites para las aflatoxinas en cereales y oleaginosas, y subproductos de estos (Diario Oficial de la Federación, 2002). Sin embargo, no se establecen límites para el resto de micotoxinas. Los datos epidemiológicos, aunque son limitados, han demostrado que un importante número de muestras contienen micotoxinas por encima de los límites establecidos (Santos y Norma, 2006).



Figura. 2 Estados de la República Mexicana donde se han realizado estudios con micotoxinas (Santos y Norma, 2006).

En el país se han realizado varias estrategias para reducir la contaminación con micotoxinas, como el mayor control de plagas, el uso de productos naturales y la modificación en los procedimientos de extracción y nixtamalización. A pesar de las importantes investigaciones que se han llevado a cabo, todavía no se genera suficiente información para determinar la incidencia de las micotoxinas en los productos mexicanos (Santos y Norma, 2006).

Entre los principales hongos micotoxigénicos se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Stenocarpella*, *Penicillium* y *Fusarium*. Dentro de las familias más importantes de micotoxinas se tienen a: las aflatoxinas, diplodiol, los tricotecenos, la ocratoxina A, las fumonisinas y la zearalenona (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales hongos toxicogénicos y micotoxinas más frecuentes.

Género	Micotoxinas
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina, Ochratoxina, Sterigmatocytsina, Fumitremorgens, Fumitoxinas, Fumigaclavina, Acido cyclopiazonico, Gliotoxina.
<i>Fusarium</i>	Deoxynivalenol, Zearalenona, Toxina T-2, Fumonisina, Moniliformina, Nivalenol, Diacetoxyscirpenol, Butenolido, Neosolaniol, Acido fusárico, Fusarochromanona, Fusarina C, Fusaproliferina.
<i>Penicillium</i>	Ochratoxina, Toxina PR, Patulina, Acido penicillico, Citrinina, Penetrem, Ácido cyclopiazonico, Roquefortina, Isofumigaclavina A y B, Ácido micofenólico.
<i>Claviceps</i>	Ergoalcaloides en semillas/ cereales de granos pequeños, sorgo, pastos, maíz.
<i>Epichloe y Neotyphodium</i>	Ergoalcaloides en pasto <i>Festuca</i>
<i>Stachybotrys</i>	Stachybotryotoxina, tricotecenos

Whitlow y Hagler, 2005.

Los diferentes mecanismos de acción tóxica de estas micotoxinas representan un riesgo para la salud humana y animal constituyéndose en un problema de salud pública (CAST, 2003).

Desde el siglo VII A. C. se conocen los efectos de la colonización por hongos en los cultivos y se han relacionado brotes de enfermedades en humanos y animales con el consumo de los alimentos contaminados con micotoxinas (Periaca *et al.*, 1999). Los efectos tóxicos de las micotoxinas en la salud humana y animal son de curso crónico e incluyen carcinogenicidad, inmunosupresión y disrupciones endócrinas, siendo la vía oral la principal vía de exposición a través del consumo de alimentos contaminados, presentándose también casos de micotoxicosis por inhalación (Duarte y Villamil, 2006).

Los primeros casos de micotoxicosis conocidos se registraron en la Edad Media debidos al centeno contaminado con *Claviceps purpurea*. En Argentina, Quevedo describió la acción de metabolitos tóxicos de una especie de *Aspergillus* del maíz en varias especies animales. Pero en 1960, la intoxicación masiva de pavos ocurrida en Inglaterra llevó al estudio de las aflatoxinas, llamadas así pues son producidas por especies del grupo *Aspergillus flavus*. (UNSA, 2010). La presencia de las micotoxinas en las plantas puede deberse a: 1) la infección de la planta en campo por hongos patógenos o a la colonización de las hojas, 2) al crecimiento de hongos saprofitos o patógenos post-cosecha en frutos y granos almacenado y, 3) al desarrollo de hongos saprófitos durante el almacenamiento de materiales ya procesados.

La producción de micotoxinas indica que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y a veces morfológica. Se conocen alrededor de 300 micotoxinas las que a menudo llegan a ser específicas. Cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios más restringido es el número de especies de hongos productores de micotoxinas (UNSA, 2010).

Además de los hongo anteriormente mencionados, existen otras enfermedades que se encuentran atacando el cultivo del maíz pero que son consideradas de importancia secundaria como son: *Acremonium zeae* (*Cephalosporium acremonium*), *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora oryzae* y *Rhizoctonia spp.* Por ello en este proyecto se consideró el diagnosticar al hongo *Acremonium zeae*, causante de la pudrición en mazorca de maíz, y la posible producción de micotoxinas y su efecto en aves, del que hasta el momento no se tiene ningún reporte. Para lograr los objetivos, esta investigación se dividió en dos fases: I. Identificación del agente causal de la pudrición de mazorca en el estado de Veracruz y II. Evaluación de peso y consumo de alimento de pollos de engorda alimentados con avena contaminada con *Acremonium zeae*.

REFERENCIAS

- Carvajal, M. y De León, C. 2010. El cultivo de maíz, Temas Selectos. Toxinas importantes de los hongos *Aspergillus* (aflatoxinas), *Fusarium* (fumonisina) *Diplodia* (diplodiatoxina) y diplodiol en maíz. Edit. Mundi-Prensa. p36-47.
- CAST. Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. Council for Agric. Sci. and Technol. Ames, IO. USA.
- CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, El Batán, 4ª Edición. 118p
- DOF. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Salud. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-188- SSA1-2002, Productos y Servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias: 11 de Marzo de 1999.
- Duarte, V. S. y Villamil, J. L. 2006. Micotoxinas en la salud Pública. Rev. Salud Pública. Supl. 8: 129-135.
- FAO. Food and Agriculture Organization. 2010. FAOSTAT. Fuente: <http://faostat.fao.org>. Consultado el 8 de Septiembre 2010.
- Gijon, H. A. 2009. Etiología de tres enfermedades bacterianas de maíz (*Zea mays*) en Veracruz, México. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco.
- Periaca, M., Radić, B., Lucić, A., and Pavlović, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bull. World Health Org. 77: 754-766.

Robutti, J. L., 2007. Calidad y usos de maíz. Inst. Nal. de Tecnol. Agrop. Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Revista IDIA XXI: N°5, 100-105p.

Salazar, A. H. C. y Godínez, G. M. M., 2010. El maíz y sus usos estratégicos. En: El cultivo de maíz, Temas Selectos. Vol. II. Edit. Mundi-Prensa, p. 36-47.

Santos, G., and Norma, H. 2006, Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. Mycopathologia 162: 255–264.

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. Fuente: www.siap.gob.mx . Consultado el 9 de Septiembre de 2010.

UNSA. Univ. Nal. de Salta. 2010. Microbiología agrícola. Salta Argentina. p1-7
Fuente: <http://www.unsa.edu.ar/>.

Whitlow, W. L., and Hagler, M. W. 2005. Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, prevention and treatment. Proc. Southwest Nutr. Conf.: 124-138.

CAPITULO I.

PUDRICIÓN DE MAZORCA POR *Acremonium zeae* EN MAÍZ EN EL ESTADO DE VERACRUZ

Alma Sánchez-Bautista¹, Carlos De León-García de Alba¹, Juan Manuel Cuca-García², Ana María Hernández-Anguiano¹, Santos Gerardo Leyva-Mir³.

¹Postgrado de Fitosanidad, especialidad de Fitopatología, ²Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, especialidad de Ganadería, Colegio de Postgraduados,

³Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

1.1. RESUMEN

Las pudriciones de mazorca se consideran un serio problema fitosanitario en el cultivo de maíz, asociándose principalmente a varias especies de hongos patógenos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Stenocarpella* y *Cephalosporium*, algunos de los cuales producen micotoxinas de importancia y causan micotoxicosis en animales. Para determinar cuál de estos agentes patogénicos es el causante de la pudrición en granos de maíz colectados en el estado de Veracruz, semillas de maíz con síntomas de estriado en el pericarpio se colocaron en cámara húmeda para favorecer el crecimiento del patógeno y una vez que se desarrollaron signos se realizaron preparaciones temporales para observar en microscopio estereoscópico conidios agrupados en cabezuela en conidióforos a 90° de la hifa en un micelio blanco, con lo que se determinó que el posible agente causal era *Cephalosporium* (sin. *Acremonium*). Posteriormente, se realizaron aislamientos mediante cultivos monospóricos obteniendo colonias de coloración blanca a salmón. Finalmente, utilizando técnicas moleculares y haciendo la corroboración con el banco de genes (NCBI), el hongo se identificó como *Acremonium zeae* (*Cephalosporium maydis*).

Palabras clave: pudrición de mazorca, semilla con estriado, *Acremonium zeae*.

1.2. ABSTRACT

Ear rots are considered a serious problem in the maize crop, the disease being mainly associated mostly with several species in the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Stenocarpella* and *Cephalosporium*. Some of them produce mycotoxins known to cause significant animal mycotoxicosis. In order to determine which one of these pathogens is the cause of the rot in maize kernels collected in the state of Veracruz, infected maize kernels were placed in a moist chamber to promote growth of the pathogen. Once the signs of the fungus were produced, the mycelium was observed under a stereoscopic microscope, obtaining hyaline mycelium and conidia clustered in heads at the tip of conidiophores growing at 90° of the hyphae, which helped to determine that the possible causal agent of the rot was *Cephalosporium* sp. (synonym *Acremonium*). This was confirmed using a morphological characterization of the fungal mycelium by culturing monosporic isolates which resulted in the development, in a period of 10 days, of colonies with white to salmon color, These were used to confirm the molecular identification in the gene bank (NCBI), proving the correct identification of the fungus as *Acremonium zeae*.

Key words: maize ear rot, infected maize, *Acremonium zeae*.

1.3. INTRODUCCIÓN

En los estados de Chiapas y Veracruz, México, la pérdida anual de grano de maíz por pudrición de mazorca varía de 390 a 1 030 kg ha⁻¹. Los factores adversos que inciden en la baja productividad (1.9 t ha⁻¹) son: sequías en varios estadios de desarrollo, suelos pobres en nutrientes, erosionados, con pendiente pronunciada, presencia de malezas, plagas y enfermedades que en conjunto reducen la producción de maíz en un millón de toneladas (Betanzos, 2001).

La pudrición de la mazorca es común en tierras bajas y cálidas del trópico y el subtropical, es causada por hongos que provocan pérdidas de cosecha (INIFAP, 2002; Betanzos, 2001; Garrido *et al.*, 2001), afecta la comercialización del grano (5% de daño, máximo aceptable) y constituye un problema de salud pública por las micotoxinas que producen los hongos cuando la incidencia de los patógenos y el daño es alto (Betanzos *et al.*, 2009). El control de los agentes causales de la pudrición de la mazorca se efectúa mediante prácticas agronómicas y el uso de variedades resistentes; para que éstas tecnologías sean eficaces, deben alterar o interrumpir el ciclo biológico del patógeno.

En granos infectados con síntomas de estrías blancas (rayas o líneas claras) que aparecen en el pericarpio, los agentes patogénicos principalmente asociados son hongos de los géneros, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Stenocarpella*, *Hormodendrum* y *Cephalosporium*. Específicamente, el hongo del género *Acremonium* (sin. *Cephalosporium*) afecta las mazorcas y los tallos en maíz, y se transmite por semilla, con infección que por lo general ocurre a través de

lesiones en la corteza y tejidos del tallo. La infección ocurre cuando la mazorca está bien desarrollada y los granos están en estado pastoso a duros. En los tallos, los haces vasculares toman un color café oscuro que se extiende a través de varios entrenudos; las plantas presentan solo rudimentos de mazorcas con granos mal desarrollados. Los síntomas se manifiestan inicialmente como un marchitamiento descendente de la planta y al hacer un corte en el tallo se puede observar el taponamiento de los tejidos vasculares (FAO, 2010).

Las colonias de *Acremonium* en extracto de malta se observan similares a las de levadura después de 10 días, viscosas, que alcanzan de 8-15 mm de diámetro, apareciendo el micelio, de color amarillo cromo a amarillo pálido, sumergido en el medio. La esporulación es esparcida y los conidióforos indistinguibles de la forma vegetativa del micelio (Peberdy, 1987). La hifa también puede ser diferenciada en artrosporas (Lancini y Lorenzetti, 1993).

Microscópicamente, se pueden observar grupos de conidios hialinos agrupados en la parte terminal de un filamento constituido por un conidióforo creciendo en ángulo de 90° de la hifa generadora del conidióforo (Barnett y Hunter, 1998). En su monografía de hongos similares a *Cephalosporium*, Gams (1971) transfirió 18 especies de *Cephalosporium* a *Acremonium* y describió nuevas especies de *Acremonium*.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1. Colecta de mazorcas infectadas con *Acremonium zeae*

La colecta de granos de maíz con síntomas de estrías blancas se realizó en la región de Los Tuxtlas, al Sur del estado de Veracruz. Debido a su topografía accidentada, las altitudes de varias localidades donde se colectaron las muestras de maíz fueron variables, de 450 a 600 msnm. En esta región, el clima es cálido-húmedo con precipitación anual de 4 500 mm. En estos sitios, en el ciclo otoño-invierno de 2009 se colectaron mazorcas de maíz con granos que mostraban estrías blancas sintomatología relacionada a la pudrición de maíz por *Acremonium zeae* (sin. *Cephalosporium acremonium*).

1.4.2. Aislamiento del hongo

Granos de maíz con síntomas de pudrición por *A. zeae* se desinfestaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 3% por 2 min. y se enjuagaron por 2 min. en dos ocasiones en agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio, finalmente se colocaron en toallas de papel estériles para eliminar el exceso de humedad. En condiciones asépticas, 400 de estos granos se distribuyeron en 20 cajas Petri con papel secante húmedo en el fondo a manera de cámara húmeda. Las cajas se colocaron a temperatura ambiente por 72 h para favorecer el crecimiento micelial del hongo. Del micelio obtenido, se prepararon suspensiones conidiales de las cuales se tomaron 100 μL (25 conidios/ μL) para depositarse en cajas Petri con agua-agar. De los cultivos monospóricos desarrollados se tomaron fragmentos del

medio con micelio y se transfirieron a cajas Petri con papa-dextrosa-agar (PDA), para incrementar el crecimiento del hongo. Posteriormente se aumentó el hongo en avena entera estéril como sustrato (Tuite, 1969).

1.4.3. Identificación taxonómica y molecular del hongo

1.4.3.1 Identificación taxonómica

La identificación se realizó a nivel de género con las claves de Barnett y Hunter (1998). En aislamientos de 10 días de edad se realizaron preparaciones temporales de micelio con conidióforos y conidios y se registro la forma, color, posición de conidióforo y tamaño de conidios.

1.4.3.2. Identificación molecular

De los aislamientos monospóricos en PDA se obtuvo micelio para la extracción de ADN de acuerdo al protocolo de CTAB 3% con modificaciones (Sambrook *et al.*, 1989). El micelio se deposito en un tubo Eppendorf frío etiquetado, al que se agregó 600 µL de CTAB a 60°C. y se incubó a 60°C por 1 h. Se adicionaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10 000 rpm por 8 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo Eppendorf al que se adicionaron 600 µL de isopropanol frío, se incubo a -20°C por 1 h. Después de ese periodo se centrifugó a 8 500 rpm por 8 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla (hebras de ADN) se lavó dos veces con etanol al 70%. La suspensión se centrifugo nuevamente a 10 000 rpm por 8 min, eliminando el sobrenadante. Finalmente se recupero el ADN en

100 µL de agua destilada estéril, se evaluó la calidad por electroforesis en gel de agarosa (Agarose Ultra Pure, Invitrogen®) al 1% y se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin Elmer® (Lambda BIO 10®).

Para la amplificación de las regiones internas ITS4 y ITS5 se usaron los iniciadores universales ITS4 (5´- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3´) e ITS5 (5´- GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG - 3´) (Gomes *et al.*, 2002). La mezcla de la reacción fue: Buffer 1x (2.5 µL), MgCl₂ 35 mM (2.0 µL), dNTP´s 2.5 mM (1 µL), ITS4 a 10 pmol (2 µL), ITS5 a 10 pmol (2 µL), Taq polimerasa 1U (0.2 µL), DNA 80 ng (2 µL), agua libre de nucleasas (completar para 25 µL por reacción). La reacción se efectuó en un termociclador Perkin Elmer Geneamp (Modelo PCR System 2400) con el siguiente programas: predesnaturalización de 95°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización de 95°C por 1 min; alineamiento a 55°C por 30 seg; preextensión de 72°C por 2 min., y una extensión final de 72°C por 10 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinte con bromuro de etidio. Posteriormente las muestras se enviaron a secuenciar sin purificar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. La comparación de secuencias se realizó en GenBank alineando con *Acremonium zeae* con el número de acceso HQ402899.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1. Identificación del hongo causante de la pudrición en mazorca

De los granos de maíz con síntomas de pudrición, colectados en regiones productoras de maíz del estado de Veracruz, se obtuvieron colonias con un

crecimiento moderado y micelio algodonoso blanco el cual se torno de color salmón tenue después de cuatro días de crecimiento en PDA (Fig. 1 A). Las colonias no desarrollaron crecimiento micelial aéreo pero si abundante micelio hialino acompañado de conidios unicelulares agrupados en cabezuela sobre un conidióforo característico de las especies de *Acremonium* (sin. *Cephalosporium*) (Barnett y Hunter, 1998) (Fig.1 B).

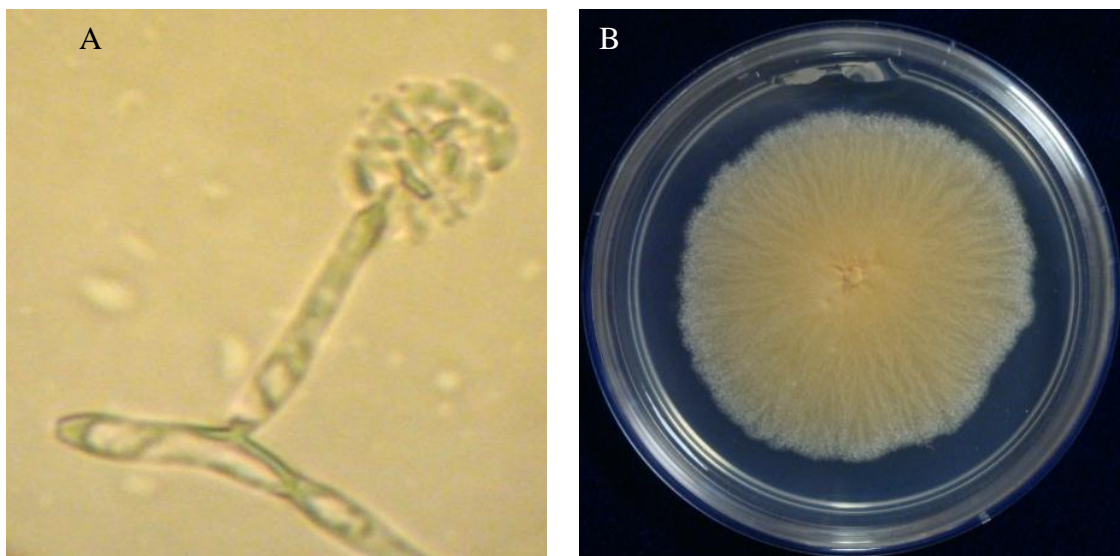


Figura 1. A) Conidióforo con conidios agrupado en cabezuela, formando un ángulo de 90° entre el micelio y el conidióforo, B) Cepa de *Acremonium zea* 15 días después de su siembra en medio papa-dextrosa-agar y mantenida a temperatura ambiente.

1.5.2. Identificación molecular

La secuencia del producto de PCR de los aislamientos monospóricos se alineó con la secuencias de *Acremonium zea* del Banco de Genes del NCBI. El índice de similaridad de nucleótidos entre la secuencia de los cultivos monospóricos, con número de acceso HQ402899 de este estudio, respecto al de la especie

alineada en el Banco de genes fue de 99%. Confirmando que el agente causal de la pudrición de granos de maíz en las regiones productoras de maíz muestreadas del estado de Veracruz es *Acremonium zeae*.

1.6. REFERENCIAS

Barnett, O., and Hunter, B. 1998 Illustrated genera of imperfect fungi. Burg. Publ. Co. Minneapolis, MN. USA. 218pp.

Betanzos, M. E. 2001. Variedades resistentes, una opción para reducir la pudrición de mazorca en Chiapas, México. Agric. Téc. Méx. 27:57-67.

Betanzos, M. E., Ramírez, F. A., Coutiño, E. B., Espinosa, P. N., Sierra, M. M., Zambada, M. A. y Grajales, S. M. 2009. Híbridos de maíz resistentes a pudrición de mazorca en Chiapas y Veracruz, México. Agric. Téc. Méx. 35: 391-400.

FAO. Food and Agriculture Organization. 2010. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>. Consultado el 8 de Septiembre

Gams, W. 1971. Cephalosporin-artige Schimmelpilze (Hiphomycetes). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Garrido, R. E., Espinosa, P. N. y Coutiño, E. B. 2001. Informe de los análisis de muestras de mazorcas de maíz colectadas en los DDR 01 y 04. p. CECECH, CIRPAS, INIFAP. Ocozocoautla, Chiapas. 10 pp. (Documento de Circulación Interna).
- Gomes, E. A., Kasuya, M. M. C., Barros, E. G., Borges, A., and Araujo, E. F. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Gen. Molec. Biol.* 25: 477-483.
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2002. Pudrición de grano de maíz en Chiapas. Diagnóstico y alternativas de solución. CECECH, CIRPAS, INIFAP. 16 pp. (Documento de Trabajo).
- Lancini, G., and Lorenzetti, R. 1993. Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. Plenum Press, New York.
- Peberdy, J. F. 1987. Genetics of *Acremonium*. In: *Penicillium and Acremonium - Biotechnology Handbooks*. Vol 1. Plenum Press, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E. U. A.
- Tuite, J. 1969. *Plant pathological methods*. Purdue Univ, IN. 239pp.

CAPITULO II.

EFFECTO TOXICO DE *Acremonium zeae* EN AVES DE ENGORDA

Alma Sánchez-Bautista¹, Carlos De León-García de Alba¹, Juan Manuel Cuca-García², Ana María Hernández-Anguiano¹, Santos Gerardo Leyva-Mir³.

¹Postgrado de Fitosanidad, especialidad de Fitopatología, ²Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, especialidad Ganadería, Colegio de Postgraduados,

³Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

2.1. RESUMEN

Las micotoxinas son compuestos químicos tóxicos producidos por hongos. En este estudio se investiga la posibilidad de que *Acremonium zeae* produzca micotoxinas que afecten de manera negativa la ganancia de peso y consumo de alimento de pollos de engorda en iniciación. Para probar esta hipótesis, se realizó un experimento con pollos recién nacidos bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco dietas (tratamientos) con cinco repeticiones, cada repetición constó de cinco pollos. Los animales fueron alimentados durante tres semanas con cada una de las dietas, incluyendo un testigo, en las que se adicionaron diferentes porcentajes de avena contaminada con *A. zeae* mezclada con maíz para cubrir los requerimientos nutricionales de los pollos en iniciación. Los tratamientos fueron: T1, 0 % avena contaminada: 100 % de maíz, (testigo); T2, 25 % avena contaminada: 75 % de maíz; T3, 50 % avena contaminada: 50 % de maíz; T4, 75 % avena contaminada: 25 % de maíz; y, T5, 100 % avena contaminada: 0% de maíz. Durante tres semanas cada siete días se registró el incremento en peso de los pollos y el consumo de alimento. El análisis estadístico de los resultados mostró que la presencia de *A. zeae* en las dietas tiene un efecto negativo en la ganancia de peso y consumo de alimento a partir de los 14 días, siendo éste más severo a los 21 días.

Palabras clave: *Acremonium zeae*, micotoxinas, pollos, ganancia de peso, consumo de alimento, avena contaminada.

2.2. ABSTRACT

The mycotoxins are toxic compounds produced by fungi. In this study, the possibility that *Acremonium zeae*, produce mycotoxins which negatively affect weight gains and consumption of food in chicken at the initiation stage, is analyzed. To prove this hypothesis, an experiment was established with newly born chicken, following a completely randomized design with five diets (treatments) each with five replications, including five chicken per replication. Chicks were fed during three weeks with each of the diets (treatments), including a control, using different percentages of contaminated whole oats with *A. zeae* mixed with maize to cover nutritional requirements of chickens at the initiation stage. The treatments were: T1= 0 % contaminated oat: 100 % of maize (control); T2= 25 % contaminated oat: 75 % of maize; T3= 50 % contaminated oat: 50 % of maize; T4= 75 % contaminated oat: 25 % of maize; and, T5= 100 % contaminated oat: 0 % of maize. During three weeks, at seven day intervals the chicken weights and feed consumption, were recorded. Statistical analysis of the results showed that there is a negative effect both, in weight gains when *A. zeae* is present in the diets and feed consumption after 14 days, the later being more severe after 21 days.

Key words: *Acremonium zeae*, mycotoxin, chickens, consumption of food, contaminated oats.

2.3. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas constituyen un problema en el ámbito mundial por su amplia distribución en los alimentos para humanos y animales. Las condiciones de colonización de los sustratos por hongos micotoxigénicos, así como su posterior contaminación con micotoxinas, juegan un papel fundamental en las estrategias de vigilancia y control.

Entre los principales hongos micotoxigénicos se encuentran los géneros *Aspergillus* spp., *Stenocarpella* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. Dentro de las micotoxinas más importantes se encuentran las aflatoxinas, los tricotecenos, la ocratoxina A, las fumonisinas y la zearalenona (CAST, 2003). Los diferentes mecanismos de acción tóxica de estas micotoxinas constituyen un riesgo para la salud humana y animal constituyéndose en una problemática de salud pública (Duarte y Villamil, 2006). La principal vía de adquisición de una micotoxicosis es través del consumo de alimentos contaminados, aunque se presentan casos de micotoxicosis por inhalación (Jakab *et al.*, 1994; Groopman *et al.*, 1996; Krysińska-Traczyk *et al.*, 2001).

Existe muchos otros hongos que se encuentran atacando plantas utilizadas como parte de la dieta alimenticia de humanos y animales, como es el caso de *Acremonium zeae* (*Cephalosporium*) que afecta principalmente los tallos y granos de maíz, los cuales son utilizados para la alimentación de animales, ya que en las áreas rurales de nuestro país aprovechan toda la planta. Los tallos son procesados como rastrojo para alimentar al ganado al igual que los granos de maíz que no presentan daños exteriores pero que en su interior tienen una cantidad considerable de tejido

de este hongo. Las especies de *Acremonium* son hongos filamentosos y cosmopolitas que se encuentran frecuentemente en restos de plantas y en el suelo. El género *Acremonium* está constituido por un grupo heterogéneo de hongos imperfectos sujeto a considerable disputa taxonómica.

2.3.1. Cefalosporina, derivado del género *Acremonium* spp.

La cefalosporina, es un antibiótico que pertenece a la misma familia en la que se encuentra la penicilina. En 1948, el científico italiano Giuseppe Brotzu, aisló al hongo *Cephalosporium acremonium*, primera fuente de cefalosporinas, de una muestra de agua de mar recogida cerca del desagüe de aguas negras en la costa mediterránea de Cerdeña (Cuadra, 2004). En los líquidos en los que se cultivaba el hongo se descubrió la cefalosporina P, cefalosporina N y cefalosporina C (Gutiérrez, 1994).

La cefalosporina C (CPC) es la precursora de todas las cefalosporinas comerciales, antibióticos β -lactámicos modernos de muy alto costo pero aun así ampliamente usados (Demain y Elander, 1999), ya que permite combatir infecciones de microorganismos Gram +, infecciones mixtas o infecciones por microorganismos anaeróbicos. Actualmente, implican aproximadamente el 41% de las ventas del mercado mundial de antibióticos (Cuadra, 2004). El género *Penicillium* es importante ya que de este se obtienen antibióticos del grupo de los betalactámicos empleados en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles. *Penicillium* sintetiza de forma natural penicilinas, incluyendo el primer tipo aislado, la penicilina G. Así, también como se obtiene la penicilina, un antibiótico tan importante en la medicina humana y veterinaria, de este mismo género se generan metabolitos

secundarios mejor conocidos como micotoxinas, específicamente la ocratoxina A, la cual se encuentra distribuída mundialmente contaminando cereales, café, vino, jugo de uva y cerveza. (Ratola *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2004) La inhibición de la síntesis de proteína se ha definido como el mecanismo de toxicidad primario para la ocratoxina, se da por la inhibición competitiva de fenilalanina-tARN^{Phe} sintetasa, que detiene la elongación del péptido (Assaf *et al.*, 2004). *Acremonium*, se considera la principal especie generadora de cefalosporinas, las cuales son modificadas químicamente para producir una serie de antibióticos de importancia (Bunnell *et al.*, 1986). Las cefalosporinas inhiben la síntesis del peptidoglucano de la pared de las bacterias de la misma forma como lo hacen las penicilinas. Las cefalosporinas son empleadas en muchas infecciones como fármaco de segunda elección (Petri, 2003). No se descarta que al igual que, *Penicillium*, de *Acremonium zeae* se generen metabolitos secundarios que puedan ser tóxicos para humanos y animales.

2.3.2. Compuestos tóxicos derivados de *Acremonium* spp.

La asociación gramíneas-endofíticos se ha estudiado desde hace más de una década debido a su importancia en la ganadería mundial, no solo desde la perspectiva de la producción animal, sino también algunos aspectos toxicológicos generados a partir de esta asociación (Galdames, 1996).

El termino endofítico (Griego; endos: dentro + fiton: planta) ha sido definido como aquel organismo que está contenido o creciendo enteramente dentro de la planta hospedera, ya sea parasítica o simbióticamente (Walker, 1957), como es el caso de *Acremonium*, que es un organismo endofítico asociado con problemas de

intoxicación animal pues se considera importante productor de toxinas en forrajes, ya que llega a producir alcaloides (Towers y Siegel, 1993).

Bacon *et al.* (1977) sugieren una estrecha asociación de un hongo endofítico presente en *Festuca* con problemas de intoxicación en bovinos y, posteriormente, Fletcher y Harvey (1981), señalan una asociación similar entre un endofítico, no identificado, presente en *Ballica perene* con desórdenes nerviosos en ovejas.

El endofítico de la *Festuca* fue inicialmente clasificado como *Sphacelia typhina* Sacc., la forma anamórfica o asexual de *Ephicloë typhina* (Pers.) Tul. Posteriormente, Morgan-Jones y Gams, renombran a *Sphacelia* como *Acremonium* y lo llama finalmente *Acremonium coenophialum* (Morgan-Jones y Gams, 1982). Siguiendo este mismo esquema, Latch *et al.* (1984), clasifican al endofítico del ballico como *Acremonium lolii*.

De acuerdo a la forma en que infectan la semilla, los hongos endofíticos del género *Acremonium* han sido clasificados como de transmisión directa, Bacon y De Battista, 1991).

A partir de una semilla portadora del hongo, la infección de la plántula ocurre a los pocos días de transcurrida la germinación. En la medida que la planta crece, el hongo infecta y puede dañar tallos y granos, lo que determina que la única forma de diseminación del hongo sea por semilla (Siegel *et al.*, 1985). Una vez cosechada la semilla, las condiciones ambientales durante el almacenaje tiene efectos directos sobre la viabilidad del hongo (Latch y Christensen, 1982; Siegel *et al.*, 1984).



Figura 1. Ciclo de vida de hongos endofíticos del género *Acremonium*

Fuente: Adaptada de Bacon y De Battista (1991).

Varios compuestos producidos por endofíticos del género *Acremonium* son principalmente alcaloides del tipo ergopeptinas, los cuales se encuentran en concentraciones variables y han sido determinados en las asociaciones de endofíticos con la *Ballica* y *Festuca*, así como en cultivos puros de algunos de los hongos, a los que se considera principales responsables de los problemas de toxicidad animal (Scott *et al.*, 1999).

El término alcaloide fue acuñado por el farmacéutico W. Meissner en 1819 y se aplica a metabolitos secundarios alcalinos que contienen nitrógeno (Gros *et al.*, 1985). La presencia de alcaloides en Poaceae se debe a simbioses fúngicas asociados parásitos (*Claviceps* y *Balansia*) y a endófitos fúngicos mutualistas (*Neotyphodium*) (Chapman, 1996). *Neotyphodium* llega a producir alcaloides del tipo de lolitrem B, ergovalina y peramina, entre otros (Spiering *et al.*, 2005).

El hongo deuteromiceto *Neotyphodium coenophialum* (sin. *Acremonium coenophialum*) (Glenn *et al.*, 1996; Morgan-Jones y Gams, 1982) infecta

sistémicamente plantas de *Festuca arundinacea*. El micelio invade el espacio intercelular en las plantas sin que éstas presenten ningún síntoma externo.

N. coenophialum es una especie asexual cercana al género ascomiceto *Epichloë* (Tsai *et al.*, 1994). Este último pertenece a la familia *Clavicipitaceae*, cuyas especies parásitas de plantas son conocidas por producir varios tipos de alcaloides tóxicos. Las plantas de *F. arundinacea* infectadas por *N. coenophialum* contienen alcaloides tóxicos (Lyons *et al.*, 1986).

Existen reportes de la región central de Argentina donde, dentro de las gramíneas nativas conocidas como tóxicas para el ganado, se ha aislado el endófito fúngico *Neotyphodium tembladeraae* Cabral & White (Cabral *et al.*, 1999) y se han determinado los alcaloides sintetizados por el simbionte, los que corresponderían a análogos de indol-diterpenos tremorgénicos (Miles *et al.*, 1998; Benavente *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Bacon *et al.* (1977), se demostró que una serie de trastornos del ganado vacuno, hasta entonces asociados al consumo de pastos de *F. arundinacea*, se presentaban cuando las plantas estaban infectadas por el hongo *N. coenophialum*. Los síntomas de la toxicosis son diversos y van desde elevación de la temperatura corporal, inapetencia, aspereza y pérdida del brillo del pelo, a un número elevado de abortos y gangrenas en extremidades, orejas y cola (Bacon *et al.*, 1986). Un síntoma más sutil, pero importante para la producción ganadera, es la reducción de la ganancia media diaria de peso en aproximadamente 50% (Paterson *et al.*, 1995).

Otra especie forrajera atacada por endofíticos del género *Acremonium* es el ballico perene (*Lolium perene*) ampliamente distribuido en el mundo. Este endofítico fue

identificado por Latch *et al.* (1984) como *Acremonium lolii*. Fletcher y Harvey (1981), señalan una asociación entre este endofítico y los desórdenes nerviosos en ovejas. A partir de cultivos puros de *A. lolii*, han sido aislados alcaloides como la peramina, por lo cual este puede ser sintetizado en ausencia de la planta. Asimismo, se han encontrado compuestos neurotóxicos que corresponden a toxinas tremogénicas conocidas comúnmente como lolitremos (Galdames y Rojas, 1996).

El lolitrem B es considerado el principal responsable del síndrome del temblor en ovejas (ryegrass staggers), ocasionando en los animales una reducción de su función neuromuscular, que provoca temblores que puede variar desde leves atrofias musculares hasta ataxia e incoordinación que puede llevar a la muerte (Fletcher y Harvey, 1981).

Dentro de los efectos identificados por la presencia de *A. lolii* destaca que existe una correlación significativa entre la disminución de ganancia de peso y los niveles de alcaloide del endofítico (Fletcher, 1993). En el ganado bovino el efecto del endofítico sobre la ganancia de peso ha sido más leve y está influenciado por la época del año (Cosgove *et al.*, 1996).

Específicamente, *Acremonium zeae* es considerado endófito del maíz (Wicklow y Poling, 2009), por lo cual no se descarta que esta especie pueda producir micotoxinas que puedan afectar la salud humana y animal. Esta investigación tuvo como propósito el diagnosticar si *Acremonium zeae* puede llegar a producir algún compuesto tóxico cuyos efectos se vean reflejados en pollos alimentados con

granos de avena inoculados con dicho hongo, suministrado en diferentes dietas (tratamientos) durante un periodo de tres semanas.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Incremento del hongo

Para incrementar el hongo *A. zea*, se utilizaron granos de avena con glumas como sustrato previamente esterilizados (Tuite, 1969). La avena entera se lavó tres veces en agua corriente para retirar impurezas, se sumergió en agua por 16 h y después de un lavado final con agua, se colocó en doble bolsa de polipapel 500 g de avena para esterilizarse por 2 h a 15 psi.

Después de dejarse enfriar la bolsa a temperatura ambiente, se colocó un fragmento de un centímetro de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial de *A. zea* sobre el sustrato de avena en condiciones estériles. Diariamente durante cinco semanas el contenido de la bolsa se agitó vigorosamente para mejorar la distribución y desarrollo micelial del hongo en el sustrato.

2.4.2. Análisis de toxinas

Debido a que no existen reportes de la producción de micotoxinas por el hongo *Acremonium zea*, la cepa I-070-A se analizó en el Laboratorio de Toxicología de la Univ. Nal. Autónoma de México donde se realizó un análisis de

sensibilidad a 5 ppb para aflatoxina B1, ocratoxina, zearalenona y toxina T2, con el objeto de determinar si existía alguna toxina previamente reportada.

2.4.3. Elaboración de las dietas

Una vez que la avena inoculada mostró buen desarrollo micelial del hongo, se elaboraron cinco dietas con las que se alimentó a los pollos de los diferentes tratamientos. Las dietas se probaron siguiendo un diseño experimental completamente al azar. Cada tratamiento se preparó con mezclas de grano entero de avena molida sana o contaminada con *A. zea* añadiendo otros componentes como maíz sano, pasta de soya, carbonato de calcio, fosfato, vitaminas y minerales. Los tratamientos fueron: T1, 0 % avena contaminada: 100 % de maíz, (testigo); T2, 25 % avena contaminada: 75 % de maíz; T3, 50 % avena contaminada: 50 % de maíz; T4, 75 % avena contaminada: 25 % de maíz; y, T5, 100 % avena contaminada: 0% de maíz (Cuadro 1).

Para la elaboración de las dietas, se realizaron análisis previos en el Laboratorio de Nutrición Animal del Departamento de Zootecnia, en la Universidad Autónoma Chapingo, para determinar la cantidad de proteína en maíz (7.76%), avena (10.36%) y pasta de soya (48%). Se elaboraron las dietas considerando los requerimientos de aminoácidos, energía y minerales para cubrir las necesidades de los pollos en iniciación (Cuca *et al.*, 2009). Una vez elaboradas las dietas, se preparó suficiente alimento a ser consumido por los pollos en un lapso de tres semanas.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales durante la etapa de cero a tres semanas elaboradas con diferentes porcentajes de avena contaminada con *Acremonium zeae*.

	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Ingredientes (%)	0/100	25/75	50/50	75/25	100/0
Maíz	54.00	40.5	26.77	13.00	0.00
Avena contaminada	0.00	13.00	26.77	40.05	54.00
Pasta de soya	39.00	38.40	38.00	37.00	36.00
Arena	1.60	1.50	1.60	1.30	0.60
Aceite crudo	1.70	2.90	3.70	5.10	5.80
DL-Metionina	0.16	0.15	0.15	0.15	0.16
CaCO ₃ (38%)	1.60	1.60	1.50	1.60	1.60
Fosfato dicálcico (18/21)*	1.35	1.30	1.30	1.20	1.20
Prem. Vitaminica**	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Prem. Mineral***	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Sal	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Análisis calculado					
EM (Kcal/kg)	2934.77	2922.82	2934.69	2927.66	2929.33
Proteína cruda (%)	22.27	22.42	22.25	22.25	22.22
Calcio (%)	0.96	0.94	0.97	0.97	0.97
Fósforo disponible (%)	0.44	0.45	0.44	0.45	0.44
Lisina (%)	1.38	1.38	1.38	1.38	1.36
Metionina+Cistina (%)	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
Triptófano (%)	0.36	0.35	0.34	0.36	0.33
Treonina (%)	0.94	0.96	0.97	0.92	0.99

*18%= fósforo y 21% = calcio

** Aporta por kilogramo de alimento: vitamina A, 9000 UI; vitamina D₃, 2500 UI; vitamina E, 20 UI; vitamina K, 3.0 mg; vitamina B₂, 8.0 mg; vitamina B₁₂, 0.015 mg; ácido pantoténico, 10 mg; niacina, 40 mg; ácido fólico, 0.5 mg; colina, 300 mg; biótina, 0.055 mg; tiamina, 2.0 mg.

***Aporta por kilogramo de alimento: hierro, 65.0 mg; zinc, 100 mg; manganeso, 100mg; cobre, 9.0 mg; selenio, 0.3 mg; yodo, 0.9 mg.

EM= energía metabolizable

2.4.4. Establecimiento del ensayo

Se adquirieron 125 pollitos recién nacidos en la empresa Reproductora Unión Tepexpan, del Edo. de México. Los animales se pesaron individualmente y se distribuyeron aleatoriamente en grupos de cinco a cada uno de los tratamientos (T). Durante el ensayo, los pollos se mantuvieron en jaulas eléctricas en batería con temperatura controlada, asimismo se midió la temperatura y humedad relativa del ambiente con ayuda de un data logger (HOBO®).

La ganancia de peso y consumo de alimento se registró cada siete días durante el experimento. Se cuantificó la cantidad de alimento suministrada semanalmente para calcular posteriormente el consumo de alimento/pollo/semana y obtener la conversión alimenticia. Al término del experimento los 125 animales se pesaron individualmente y los datos colectados se analizaron estadísticamente con el programa SAS® (Statistical Analysis System).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Aumento del hongo

El crecimiento de *Acremonium zeae* en el sustrato de avena entera tuvo un excelente crecimiento logrando así colonizar los 500 g contenidos en cada bolsa en un periodo de 4 a 5 semanas. En las bolsas con avena inoculada se observó un crecimiento de micelio de una coloración blanquecina.

2.5.2. Análisis de toxinas

Al realizar la prueba de sensibilidad a 5 ppb para aflatoxina B1, ocratoxina, zearalenona y toxina T2, el resultado fue negativo para todos los casos. Lo que descarta la presencia de alguna toxina previamente reportada para otros géneros de hongos.

2.5.3. Condiciones de temperatura y humedad del espacio experimental

Se registró una temperatura media de 22.8°C (con una máxima de 34.5°C y una mínima de 14.4°C) y humedad relativa promedio de 59.83% (con una máxima de 81.2% y una mínima de 25%) con un data logger (HOBO®) en intervalos de una hora en el área donde se estableció el experimento.

2.5.4. Evaluación del efecto de *Acremonium zeae* en el peso de pollos de engorda

Con los valores registrados del peso individual en los pollos durante las tres semanas, se obtuvo la diferencia mínima significativa (DMS, $\alpha = 0.05$), con la que se observó que, durante la primera semana, no hubo diferencia significativa entre pesos de los pollos de todos los tratamientos. Sin embargo, en la segunda semana se observaron los efectos de las diferentes cantidades de avena contaminada con *A. zeae* los cuales se reflejaron en el peso de los pollos. En esta evaluación, el tratamiento T2 (25:75) fue el único que no mostró diferencia con respecto al testigo T1 (0:100) mientras que el resto de los tratamientos se registró disminución en el peso, siendo los pollos alimentados con el tratamiento T5 los que registraron la mayor disminución de peso respecto al testigo. Para la tercera semana, se observó

el mismo efecto negativo en los pesos a partir del tratamiento T3, confirmando que la disminución de peso en los pollos comienza a mostrarse después de 14 días con el tratamiento con 50% de avena contaminada con *A. zeae* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Evaluación de peso en pollos de cero a tres semanas alimentados con diferentes porcentajes de avena inoculada con *Acremonium zeae*.

Tratamientos	7 días	14 días	21 días
T1	145.2 a	398.6 a	750.6 a
T2	148.4 a	392.2 a	691.0 a
T3	137.4 a	321.32 b	586.2 b
T4	142.8 a	309.80 b	560.8 b
T5	126.8 a	269.4 c	416.4 c

Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (DMS, $\alpha= 0.05$)

T1 (0% avena contaminada: 100% maíz), T2 (25% avena contaminada: 75% maíz), T3 (50% avena contaminada: 50% maíz), T4 (75% avena contaminada: 25% maíz) y T5 (100% avena contaminada: 0% maíz).

Los pollos que consumieron la dieta que no contenía ninguna porción de avena contaminada (testigo=T1) y con una dieta 25:50 (T2) no registraron disminución en su peso ni en el consumo de alimento. Los pollos sometidos a esta dieta presentaron un desarrollo normal.

2.5.5. Evaluación del efecto de *Acremonium zeae* en el consumo de alimento de pollos de engorda.

El análisis estadístico de los datos de consumo de alimento durante la primera semana no mostró diferencia significativa entre los tratamientos con y sin hongo. En el Cuadro 3 se observa que a partir de la segunda semana las diferencias de consumo de alimento contaminado son significativas, mostrando reducción del

consumo en T3, T4 y T5. Después de la tercera semana, la reducción en el consumo de alimento con los tratamientos T3, T4 y T5 fue de 60% respecto al testigo T1 y al tratamiento T2. En este periodo se observa que los pollos del tratamiento T5 (100:0), registraron el menor consumo de alimento. En contraste con el tratamiento T2 no se encontró diferencia significativa en el consumo de alimento respecto al tratamiento testigo T1.

Cuadro 3. Consumo de alimento de pollos de cero a tres semanas alimentados con cinco diferentes porcentajes de avena inoculada con *Acremonium zeae*.

Tratamientos	7 días	14 días	21 días
T1	765 a	1686 a	3589 a
T2	771 a	1761 a	3481 a
T3	829 a	1451 b	1345 b
T4	770 a	1338 b	1230 bc
T5	829 a	1254 b	1083 c

Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (DMS, $\alpha = 0.05$)

T1 (0% avena contaminada: 100% maíz), T2 (25% avena contaminada: 75% maíz), T3 (50% avena contaminada: 50% maíz), T4 (75% avena contaminada: 25% maíz) y T5 (100% avena contaminada: 0% maíz).

El coeficiente de correlación muestra que las variables peso y consumo de alimento tienen una correlación positiva, en la que, a altos valores de peso le corresponden altos valores de consumo de alimento. Con una probabilidad de error <0.0001 , se confirma que el coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0.8173$) es estadísticamente diferente a cero.

Los resultados anteriores confirman que la presencia de especies del hongo *Acremonium* en el alimento puede resultar en cuadros de intoxicación animal como lo

reportaron previamente Towers y Siegel (1993) y Galdames (1995). Hasta ahora no se ha demostrado que *Acremonium zeae* produzca algún metabolito que pueda actuar como micotoxina; sin embargo, ésta hipótesis no se descarta ya que en los parámetros analizados en la presente investigación, peso y consumo de alimento, mostraron efectos negativos en el crecimiento de pollos por la presencia de este hongo en una dieta balanceada para pollos de engorda de iniciación.

2.6. CONCLUSIÓN

La presencia de *Acremonium zeae* en la dieta afecta el incremento de peso y consumo de alimento en pollos de engorda, efecto que se hace más evidente a partir de la segunda semana de alimentación con una composición de dieta elaborada con un mínimo de 50% de avena contaminada con el hongo.

2.7. REFERENCIAS

- Assaf, H., Azouri, H., and Pallardy, M. 2004. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-x_L. *Toxicol. Sci.* 79:335-344.
- Bacon, C. W., and De Battista, J. 1991. Endophytic fungi of grasses. *Handbook of Appl. Mycol. Vol.1 Soil and Plants* 9:231-254.
- Bacon, C. W., Lyons, P. C., Porter, J. K., and Robbins, J. D. 1986. Ergot toxicity from endophyte-infected grasses: a review. *Agron. J.* 78, 106-116.
- Bacon, C. W., Porter, J. K., Robbins, J. D., and Luttrell, E. S. 1977. *Ephichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:576-581.
- Benavente, A. C., Kurina, S. M., and Lugo, A. M. 2008. Micofilas, endófitos fúngicos y alcaloides en poblaciones de *Melica stuckertii* (Poaceae) del Centro de Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 43 (3-4): 189 - 195.
- Bunnell, C. A., Luke, W. D., and Perry, F. M. 1986. Beta-lactam antibiotics for clinical use. p 255-283. In: Queener, S. F., Webber, J. A., and Queener, S. W. (Eds.). Marcel Dekker, (Publ.) New York.
- Cabral, D., Cafaro, M. J., Reddy, P. V., Lugo, M. A., and White, J. F. 1999. Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia* 91:315-325.

- Chapman, G. P. 1996. Grass diversity. p.14-35. In: The Biology of grasses. CAB Internatl. Oxon, UK.
- CAST. Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. Ames, IO. USA.
- Cosgove, G., Anderson, C., and Berquist, T. 1996. Fungal endophyte effects on intake, health and live weight gain of grazind cattle. Proc. New Zealand Grassland Assoc. 57: 43-48.
- Cuadra, Z. T. E. 2004. Producción de cefalosporina C por fermentación en medio sólido de *Acremonium chrysogenum* C10. Tesis Maestría en Biotecnología. Univ. Autónoma Metropolitana. México, D. F.
- Cuca, G. M., Ávila, G. E. y Pro, M. A. 2009. Alimentación de las aves. Univ. Autónoma Chapingo, Dpto. de Zootecnia. México. 276p.
- Demain, A. L. and Elander, R. P. 1999. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 5–19. Kluwer Acad. Publ.
- Duarte, V. S. y Villamil, J. L. 2006. Micotoxinas en la salud Pública. *Rev. Salud Pública. Supl.* 8: 129-135.

- Fletcher, L. 1993. Grazing ryegrass/endophyte associations and their effect on animal health and performance. Proc. 2nd Internatl. Symp. on *Acremonium*/grass interactions. Ed.Hume, Lech and Easton. Palmerston North, N.Z. 115-120 pp.
- Fletcher, L. R., and Harvey, I. C. 1981. An association of a *Lolium* endophyte with ryegrass staggers. New Zealand Vet. J. 29:185-186.
- Galdames, G. R. 1995. El hongo endofítico de la festuca, *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones & Gams, y su incidencia en el Sur de Chile. Agric. Téc. Chile 55 (1): 67-70.
- Galdames, G. R. y Rojas, G. C. 1996. Hongos endófitos en gramíneas forrajeras y su asociación con la producción animal en praderas de Chile. Inst. Invest. Agrop. Fuente: <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/libros/NR30980.pdf>
- Glenn, A. E., Bacon, C. W., Price, R., and Hanlin, R. T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. Mycologia 88:369-383.
- Groopman, J. D., Wang, J. S., and Scholl, P. 1996. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. Canadian J. of Physiol. and Pharmacol. 74: 203-209.

- Gros, E. G., Pomilio ,A. B., Seldes, A. M., and Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Sria. Gral. Organización de Estados Americanos, Washington DC.
- Gutiérrez, S. 1994. Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *A. chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de cefalosporina C. Mem. para optar al grado de Doctor en Biología. Univ. de León. España.
- Jakab, G. J., Hmieleski, R. R., Zarba, A., Hemenway, D. R., and Groopman, J. D. 1994. Respiratory aflatoxicosis: Suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125: 198-205.
- Krysińska-Traczyk, E., Kiecoma, I., Percowsky, J., and Dutkiewicz, J. 2001. Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected in farms in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 8: 268-274
- Latch, G. C. M., and Christensen, M. J. 1982. Ryegrass endophyte, incidence and control. *New Zealand J. Agric. Res.* 25:443-448.
- Latch, G. C. M., Christensen, M. J., and Samuels, G. J. 1984. Fice endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon.* 20(2): 535-550.
- Lyons, P. C., Plattner, R. D., and Bacon, C. W. 1986. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science* 232: 487-489.

- Miles, C. O., Di Menna, M. E., Jacobs, S. W., Garthwaite, I., Lane, G. A., Prestidge, R. A., Marshall, S. L., Wilkinson, H. H., Schardl, C. L., Ball, O. J. P., and Latch, G. C. M. 1998. Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 601-606.
- Morgan-Jones, G., and Gams, W. 1982. Notes on Hyphomycetes, XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two new sections of *Acremonium*. *Mycotaxon* 15:311-318.
- Paterson, J., Forcherio, C., Larson, B., Samford, M., and Kerley, M. 1995. The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. *J. Anim. Sci.* 73: 889-898.
- Petri, W. 2003. Penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos beta-lactámicos. p. 1207-1236. En: Bases Farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman. Ed. McGraw Hill.
- Ratola, N., Martins, L., and Alves, A. 2004. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with results. *Anal. Chim. Acta.* 513: 319-324.
- Scott, B. D., Young, C., and Mc Millan, L. 1999. Molecular biology of *Epichloë* endophyte toxin biosynthesis. Ryegrass endophyte: an essential New Zealand Symbiosis. *Grassland Res. Pract. Series* 7: 77-83.

- Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A., and Venanacio, A. 2004. Determination of ochratoxin in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Anal. Chim. Acta.* 513: 41-47
- Siegel, M. R., Johnson, M. C., Varney, D. R., Nesmith, W. C., Buckner, R. C., Bush, L. P., Burrus, P. B., Jones, T. A., and Boling, J. A. 1984. A fungal endophyte in tall fescue incidence and dissemination. *Phytopathology* 74(8): 932-937.
- Siegel, M. R., Latch, G. C., and Johnson, M. C. 1985. *Acremonium* fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: Significance and control. *Plant Dis.* 69(2): 179-183.
- Spiering, M. J., Lane, G. A., Christensen, M. J., and Schmid, J. 2005. Distribution of the fungal endophyte *Neotyphodium lolii* is not major determinant of the distribution of fungal alkaloids in *Lolium perenne* plants. *Phytochemistry* 66:195-202.
- Tsai, H. F., Liu, J. S., Staben, C., Christensen, M. J., Latch, G. C. M., Siegel, M. R., and Schardl, C. L. 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *USA* 91: 2542-2546.
- Towers, N. R., and Siegel, M. R. 1993. Coping with mycotoxins that constrain animal production. p. 548-554, In: Grasslands for our world. M.J. Baker (ed) SIR Publ. Wellington, N. Zealand.

Tuite, J. 1969. Plant pathological methods. Purdue Univ, IN. 239pp.

Walker, J. C. 1957. Plant Pathology. Second edition. 707p.

Wicklow, D. T., and Poling, S. M. 2009. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. *Phytopathology* 99:109-115.