

ANEXO I

Preparación de Medios de Cultivo

Agar Malta Sal (MSA). Para la preparación de un litro de este medio se requieren 20 g de extracto de malta, 15 ó 20 g de agar, y dependiendo de las especies de hongos que se desee aislar se le agrega de 40 a 150 g de cloruro de sodio. El medio de cultivo MSA al 4 ó 6% de sal, permite aislar prácticamente a la mayoría de hongos que invaden a los granos y semillas, tanto hongos de campo como hongos de almacén. La alta presión osmótica de los medios con alto contenido de sal (10 ó 15% de NaCl) inhibe el desarrollo de ciertos hongos (*Rhizopus* y *Mucor*) y limita el de otros, facilitando el desarrollo de los hongos de los grupos *A. glaucus* y *A. restrictus*. Las especies del grupo *A. glaucus* son las más comunes en los granos almacenados. Además el cloruro de sodio inhibe la germinación de los granos, facilitando las tareas de cuantificación de granos invadidos y la identificación de los hongos. Si se quiere aislar la mayoría de los hongos que normalmente se encuentran en los granos e ingredientes de los alimentos para animales, es necesario emplear diferentes medios de cultivo. Sin embargo, para aislar la microflora que comúnmente deteriora los productos almacenados y que presenta un riesgo potencial como toxígeno, el usar uno o dos medios, de acuerdo a la experiencia personal del micólogo, es suficiente.

En cuanto a la calidad de la sal se recomienda usar grado técnico. Uno de los problemas que frecuentemente se tienen para la cuantificación e identificación de los hongos en las cajas Petri, es que las colonias de éstos se juntan y

sobreponen. David Sauer del U. S. Grain Marketing and Research Laboratory de Manhattan, Kansas, recomendó la adición de 0.2 ml de tergitol NPX para limitar el crecimiento de las colonias del medio de cultivo, quedando éstas pegadas a los granos, sin cambiar las características morfológicas esenciales para su identificación (Moreno, 1988).

Agar Hoja de Clavel (CLA). Es un medio natural preparado asépticamente, en donde se prepara agar agua 2% (20 g de agar en 1 L de H₂O) y se colocan piezas de hojas de clavel estériles de 3 a 5 mm² en una caja Petri. Generalmente se añade una pieza de hoja de clavel por 2 ml de medio. En una caja Petri de 60 mm de diámetro se añaden de 5 a 6 piezas y en una caja de 100 mm de diámetro de 10 a 12 piezas.

Las piezas de hojas de clavel se preparan de hojas frescas libres de residuos de fungicidas o insecticidas. Inmediatamente después de la recolección, las hojas se cortan en pedazos de 5 a 8 mm² (se encogen después del secado) y se secan en una estufa de aire forzado (~ 70° C) durante 3 a 4 horas. Las hojas de clavel también pueden ser secadas en un horno microondas; el tiempo de secado varía dependiendo del horno. Las piezas secas se empacan en contenedores de aluminio o policarbonato y se esterilizan por radiación gama (2.5 megarads). Las piezas estériles secas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por más de 12 meses antes de utilizarse.

La mayoría de las especies de *Fusarium* forman esporas entre 6 a 10 días. Las especies que se desarrollan en CLA producen macroconidios que son más

uniformes en tamaño y forma, que aquellas especies que se desarrollan en medios ricos en carbohidratos como PDA o Czapek- Dox. Los macroconidios se desarrollan primeramente en esporodoquios, que normalmente se desarrollan en las hojas de clavel. Los macroconidios formados en esporodoquios se prefieren para cuestiones de identificación, ya que son más consistentes en forma y tamaño que los microconidios aislados de fiálides.

Es más común que los microconidios se desarrollen en las hifas sobre el agar, usualmente, lejos de las hojas de clavel. La formación de microconidios es monofiálides o polifiálides, la presencia de falsas cabezas o cadenas de microconidios y la presencia de clamidosporas puede ser determinado por la examinación directa utilizando un microscopio compuesto (100x), cuando las especies están creciendo en cajas Petri pequeñas de CLA (60 mm diámetro) (Leslie y col., 2006).

Agar Agua 3%. Consiste en 30g de agar en 1 L de agua destilada. Este medio es recomendado para la germinación de conidios de *Fusarium* que serán utilizados para iniciar un cultivo (Leslie y col., 2006).

Agar Papa Dextrosa (PDA). Este medio se puede preparar con papas naturales o con el producto comercial deshidratado manufacturado por diferentes firmas, entre ellas, Difco; en este último caso sólo hay que seguir las instrucciones del frasco.

Para preparar este medio a partir de papas naturales se procede de la siguiente manera: se lavan de 200 a 300 gramos de papas, no es necesario

pelarlas, rebánelas y hiérvalas hasta que estén suaves, y exprímalas a través de dos a tres capas de manta delgada (gasa). Reciba el filtrado en un matraz, añada 20g de dextrosa y 20g de agar, afore a un litro. Esterilice el medio 20 minutos a 15 libras de presión. Cuando el medio este casi frío ($\pm 40^{\circ}$ C) viértalo en las cajas de Petri. En este medio de cultivo ciertos hongos, como *Neurospora*, *Mucor* y *Rhizopus*, que frecuentemente son contaminantes en los laboratorios, crecen rápidamente y enmascaran el desarrollo de otros hongos más lentos; otros medios, como el malta sal agar, son menos favorables para estos hongos contaminantes de crecimiento rápido. Para eliminar bacterias se le añade al medio, justo antes de vaciarlo a las cajas Petri, 3 ml de HCl al 1% por litro de medio (Moreno, 1988).

Los conidios formados en PDA no son consistentes en tamaño y forma como los formados en agar hoja de clavel (CLA) o en agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), además de que son menos confiables para utilizarse con fines de identificación. Sin embargo, la morfología de la colonia, pigmentación del medio y rango de crecimiento de la mayoría de las especies de *Fusarium* en PDA son consistentes si el medio es preparado de una manera consistente, y si las cepas provienen de un inóculo estándar y han sido incubadas bajo condiciones estándar. Estas características son utilizadas por lo regular como un criterio secundario para identificación.

PDA es utilizado por varios investigadores para el aislamiento de especies de *Fusarium*. No se recomienda este medio para estos propósitos, ya que varios hongos saprófitos y bacterias también pueden crecer en el medio e interferir con la recuperación de hongos del género *Fusarium* presentes. Si se utiliza PDA para la

recuperación de los hongos provenientes de plantas, entonces se debe reducir la concentración de papa y dextrosa entre un 50 a 75% y añadir antibióticos de amplio espectro para inhibir el crecimiento de bacterias (Leslie y col., 2006).

Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA). Es un medio pobre en nutrientes usado para la identificación y mantenimiento de especies de *Fusarium* y *Cylindrocarpon*. Este medio se prepara agregando 1g de KH_2PO_4 , 1g de KNO_3 , 0.5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g de KCl, 0.2g de glucosa, 0.2g de sucrosa, 20g de agar en 1 L de agua destilada, y esterilizar en autoclave (Leslie y col., 2006).

La degeneración de los cultivos que ocurre comúnmente en medios sintéticos no ocurre en SNA. El medio promueve la esporulación y un buen desarrollo de las células conidiógenas. Sin embargo, la formación de esporodoquios es limitada, la morfología de los macroconidios no es tan uniforme y confiable como lo es en CLA. Los cultivos que se desarrollan en SNA se utilizan principalmente para la examinación de los microconidios. Muchas especies forman clamidosporas más fácilmente en SNA que en CLA (Leslie y col., 2006).

ANEXO II

Características Macroscópicas y Microscópicas de las cepas de *Fusarium* Aisladas

Muestra (clave)	Agar papa dextrosa (PDA)	Agar hoja de clavel (CLA)	Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)	Especie de <i>Fusarium</i>
31-2 (2)	Violeta claro / violeta.	Micro: ovals, y obovoides NO MACRO	Cadenas largas, monofálides largas	<i>verticillioides</i>
18-2	Durazno/durazno.	Micro: ovals. Macro: poco curvos y curvos; 1-4 septas. Basal: poca muesca. Apical: sin filo e hisopo Nota: 1 a 2 septas, muy chicos para ser macro y muy grandes para ser micro, posibles micro pasando a macro.	Cadenas cortas, polifálides.	<i>subglutinans</i>
87-4	Café oscuro/café oscuro.	Micro: oval, y obovoide, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas muy largas, monofálides largas.	<i>verticillioides</i>

119-1	Violeta claro/violeta oscuro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: rectos, poco curvos y curvos; 3 septas. Basal: forma de pie Apical: hisopo y sin filo.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-10	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. 0 a 1 septa. Macro: delgados y normales; 3, 5 septas; curvos, rectos. Apical: gancho, sin filo. Basal: forma de pie	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-4 (2)	Crecimiento anormal.	Micro: oval y obovoide. Macro: curvo, poco curvo y recto, 3 septas. Apical: sin filo y gancho. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas cortas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
31-1	Rosa/violeta claro.	Micro: oval y obovoide NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

31-2	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoide. 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-5 (2)	Rosa/violeta claro.	Micro: oval y obovoide. NO MACRO	Cadenas largas. Monofálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-4	Durazno claro/ café-violeta.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo y gancho. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-6 (2)	Rosa/ violeta.	Micro: ovales y obovoides. Macro: curvo, poco curvos y rectos, 3 a 4 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: forma de pie y poca muesca.	Cadenas largas. Monofálides y polifálides.	<i>proliferatum</i>
31-7 (2)	Rosa/ café-violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca	Cadenas largas. Monofálides largas.	<i>verticillioides</i>

			muesca y pie alargado.	
12-4	Rosa-gris/ violeta oscuro-gris.	Micro: ovales y obovoides Macro: recto, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
119-9	Rosa/ violeta-naranja.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: forma de pie y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides	<i>proliferatum</i>
119-2	Rosa- naranja/ violeta con rosa claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
31-3 (2)	Rosa/ violeta claro con beige.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Polifiálides y monofiálides.	<i>proliferatum</i>

31-1 (2)	Durazno/ naranja.	Micro: ovals y obovoides. NO MACRO	Cadenas cortas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>
31-9	Rosa/ violeta claro con rosa.	Micro: ovals y obovoides. Macro: curvo, poco curvo y recto, 3 septas. Apical: sin filo e hisopo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>
83-2	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovals y obovoides. Macro: poco curvo, recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofialides largas.	<i>verticillioides</i>
30-2	Durazno/ naranja-violeta-café.	Micro: ovals y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofialides largas.	<i>verticillioides</i>
36-4	Durazno/ beige-violeta.	Micro: ovals y obovoides. Macro: poco curvo, 3-4 septas. Apical: sin filo. Basal:	Cadenas largas. Monofialides largas.	<i>verticillioides</i>

		poca muesca.		
77-2	Durazno/naranja-beige.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septa. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
22-2	Durazno con café/ naranja claro.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas cortas. Monofiálides cortas.	<i>oxysporum</i>
30-1	Durazno/ violeta durazno.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
12-5	Rosa- violeta/ violeta oscuro.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septa. Macro: recto, poco curvo, cortos, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

113-1	Rosa/violeta.	Micro: ovales y obovoides. Macro: casi rectos, 3-4 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: muesca clara y forma de pie.	Cadenas largas. Monofálides y polifálides.	<i>proliferatum</i>
64-2	Rosa-morado/ morado fuerte.	Micro: ovales y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas cortas. Monofálides	<i>verticillioides</i>
63-1	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofálides y polifálides.	<i>proliferatum</i>
31-8	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: curvo, recto, 3 septas. Apical: gancho y sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofálides y polifálides.	<i>proliferatum</i>
54-1	Rosa/ violeta claro.	Micro: ovales y obovoides, 0-1 septas. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo y	Cadenas largas. Monofálides largas.	<i>verticillioides</i>

		gancho. Basal: forma de pie		
36-2	Durazno/ violeta claro-beige.	Micro: ovales y ovoides, 0-1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y forma de pie.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
30-5	Durazno/ violeta claro-beige.	Micro: ovales y ovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
13-3	Rosa con violeta al centro/ violeta claro.	Micro: ovales y ovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
87-1	Beige (muy claro)/beige con violeta (muy poco violeta).	Micro: ovales y ovoides, 0 a 1 septas. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
119-3	Rosa/ violeta - beige.	Micro: ovales y ovoides, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
119-10	Rosa con partes violetas/ negro- café.	Micro: ovales y ovoides, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

18-4	Rosa (con un color morado-verdoso al centro)/ violeta-beige a la orilla.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, grueso, 3 septas. Apical: gancho. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides largas	<i>verticillioides</i>
121-12	Durazno/violeta claro-beige.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>
96-3	Durazno/durazno.	Micro: ovales y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: gruesos y delgados, cortos, poco curvos, 3 septas. Apical: hisopo. Basal: muesca clara.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>
36-1	Durazno/violeta claro-beige (muy poco violeta).	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal:	Cadenas largas. Monofiálides largas.	<i>verticillioides</i>

			poca muesca.		
18-1	Durazno/ violeta-beige.	Micro: ovals y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofálides largas.	verticillioides	
18-3	Durazno con violeta al centro/ violeta claro-rosa.	Micro: ovals y obovoides. Macro: delgados, poco curvos, 3 septas. Apical: sin filo y gancho. Basal: poca muesca, forma de pie y muesca clara.	Cadenas largas. Monofálides largas.	verticillioides	
12-3	Durazno/violeta-beige (muy poco violeta).	Micro: ovals y obovoides, 0 a 1 septa. NO MACRO	Cadenas largas. Monofálides largas.	verticillioides	
36-3	Durazno/violeta-beige.	Micro: ovals y obovoides. Macro: largos y delgados, rectos, poco curvos, 3-4 septas. Apical: sin filo y gancho.	Cadenas largas. Monofálides largas.	verticillioides	

		Basal: poca muesca y muesca clara.		
96-1	Durazno/ durazno.	Micro: ovals y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: curvo, poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofialides largas.	<i>verticillioides</i>
96-2	Durazno/ durazno-violeta (oscuro-gris al centro).	Micro: ovals y obovoides. Macro: delgado, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Polifialides y monofialides.	<i>proliferatum</i>
2-4	Durazno/ violeta claro-durazno en la orilla.	Micro: ovals y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: gancho. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>
2-7	Durazno claro/ violeta claro-beige.	Micro: ovals. NO MACRO	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>

83-1	Rosa/ violeta.	Micro: ovals y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>verticillioides</i>
96-6	Rosa/ violeta con la orilla blanca.	Micro: ovals y obovoides, 0 a 1 septa. Macro: curvo, recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofialides y polifialides largas.	<i>proliferatum</i>
96-4	Durazno/ durazno.	Micro: ovals y obovoides NO MACRO	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>
2-6	Durazno/violeta claro.	Micro: ovals y obovoides. Macro: poco curvo, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca y muesca clara.	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>
2-5	Durazno/ violeta claro- beige.	Micro: ovals y obovoides. NO MACRO	Cadenas largas. Monofialides y polifialides.	<i>proliferatum</i>
2-8	Durazno/ violeta claro.	Micro: ovals y obovoides. Macro: poco curvo, 3	Cadenas largas. Polifialides y monofialides.	<i>proliferatum</i>

		septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.		
77-1	Durazno con el centro violeta/ durazno con un poco de violeta al centro.	Micro: ovales y obovoides. Macro: recto, 3 septas. Apical: sin filo. Basal: poca muesca.	Cadenas largas. Monofiálides y polifiálides.	<i>proliferatum</i>

Nota: el primer número de la clave pertenece al número de muestra, el segundo al número de caja de Petri y el tercero al número de colonia en la caja de Petri.

ANEXO III

Reporte de la Red Sinóptica de Superficie de Agosto a Diciembre de 2006

Mes	Temperatura °C						Precipitación (mm)		HR (%)	INS (h)	EVAP (mm)	Lluvia (días)	Helada (días)	GRA (días)
	Media	Normal	Anomalía	Máxima	Mínima	Total	Anomalía							
Agosto	33.0	31.5	1.5	43.0	23.5	106.0	31.8	69	203	333	6	0	0	
Septiembre	26.4	31.0	-4.6	41.5	20.0	152.0	23.4	69	185	276	7	0	0	
Octubre	22.8	ND	ND	41.5	14.0	55.0	11.2	62	180	288	2	0	0	
Noviembre	17.2	20.5	-3.3	29.2	13.6	0.0	-9.9	44	169	216	0	0	0	
Diciembre	14.1	16.9	-2.8	23.4	3.8	7.0	-27.9	50	178	66	1	0	0	

HR: Humedad Relativa

INS: Insolación

EVAP: Evaporación

GRA: Granizo

Fuente: Gerencia del Servicio Meteorológico Nacional, Subdirección General Técnica, CNA, 2006.