



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y POSGRADO DE ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

**Cambios Estructurales y Fisiológicos del Hongo *Fusarium*
verticillioides durante la Exposición Constante a una Fracción
Antifúngica de la Planta *Jacquinia macrocarpa***

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

I.B. Iliana Jacqueline Muñoz Ochoa

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Título de la tesis

**Cambios Estructurales y Fisiológicos del Hongo *Fusarium verticillioides*
Durante la Exposición Constante a una Fracción Antifúngica de la Planta
*Jacquinia macrocarpa***

Autor

I.B. Iliana Jacqueline Muñoz Ochoa

Dra. Ema Carina Rosas Burgos
Director de la tesis

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Secretario

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Vocal

Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño
Vocal

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

I.B. Iliana Jacqueline Muñoz Ochoa
Autor

Dr. Francisco Rodríguez Félix
Coordinador del Programa de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Hermes David Muñoz Castillo y Siria Guadalupe Ochoa Gaxiola por siempre anhelar lo mejor para mi vida y por su apoyo incondicional.

A Aida Maria Fenech Servin de la Mora por preocuparse, creer en mí y en mis expectativas.

Al Departamento de Investigación en Posgrado en Alimentos (DIPA) por la formación académica.

A la Dra. Ema Carina Rosas Burgos y al resto del comité de tesis por su coordinación y disposición durante el desarrollo de este proyecto.

RESUMEN

Estudios previos han demostrado que la planta *Jacquinia macrocarpa* es capaz de inhibir el desarrollo óptimo de *Fusarium verticillioides*, hongo patógeno que afecta la productividad del maíz y causa daños a la salud humana y animal. Los resultados obtenidos hasta ahora no impiden que se pierda de vista la capacidad de adaptación a los cambios ambientales que los hongos poseen y, por consiguiente, el posible desarrollo de resistencia adquirida a los antifúngicos. Es necesario estudiar con mayor profundidad los mecanismos de resistencia a los antifúngicos para el desarrollo de estrategias eficaces para su combate, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar la capacidad del hongo *F. verticillioides* para recuperar sus características estructurales y fisiológicas modificadas por la presencia de una fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, durante su exposición constante a esta fracción. Por lo cual, se determinó el crecimiento radial, germinación y el tamaño de las esporas, dimensiones de hifas apicales y el efecto sobre la actividad β -1,3-glucanasa, durante el desarrollo de los diferentes cultivos del hongo. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la actividad inhibitoria en el crecimiento radial, germinación de esporas y en la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa del hongo a través de las generaciones obtenidas, por lo cual, se concluye que *F. verticillioides* recupera, en cierta medida, la capacidad de desarrollarse cuando es expuesto constantemente a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, sin embargo, su recuperación no es total.

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| APROBACIÓN | i |
| DERECHOS DE AUTOR..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| RESUMEN | iv |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABLAS..... | x |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| REVISION BIBLIOGRAFICA..... | 3 |
| Maíz..... | 3 |
| Maíz en México | 3 |
| Enfermedades y Plagas del Maíz | 4 |
| Condiciones Ambientales..... | 5 |
| Insectos y Roedores | 6 |
| Hongos y Bacterias | 7 |
| Pudrición bacteriana del tallo..... | 7 |
| Pudrición de la raíz | 7 |
| Pudriciones del tallo..... | 7 |
| Hongos | 10 |
| Características Taxonómicas..... | 10 |
| Características Estructurales | 11 |
| Características Fisiológicas..... | 11 |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | 13 |
| Identificación | 14 |
| Daños a Maíz | 14 |
| Enfermedades Causadas por <i>F. verticillioides</i> | 17 |
| Control de Enfermedades y Plagas | 18 |
| Antifúngicos Sintéticos | 19 |
| Antifúngicos Naturales | 22 |
| Antifúngicos de Extractos de Plantas..... | 22 |
| Mecanismos de Acción de Antifúngicos | 24 |
| Polienos | 24 |
| Azoles | 25 |
| Alilaminas..... | 25 |
| Equinocandinas..... | 25 |

| | |
|--|----|
| Mecanismos de Adaptación a los Antifúngicos..... | 26 |
| Resistencia a Polienos..... | 28 |
| Resistencia a Azoles..... | 29 |
| Resistencia a Alilaminas..... | 29 |
| Resistencia a Equinocandinas..... | 29 |
| HIPÓTESIS..... | 31 |
| OBJETIVOS..... | 32 |
| Objetivo General..... | 32 |
| Objetivos Particulares..... | 32 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 33 |
| Fracción Antifúngica..... | 33 |
| Elaboración de Suspensión de Esporas Fúngicas..... | 34 |
| Obtención de Cultivos Fúngicos de Diferentes “Generaciones”..... | 34 |
| Determinación de la Cinética de Crecimiento Radial..... | 37 |
| Determinación de la Cinética de Germinación de Esporas..... | 38 |
| Determinación de Dimensiones de Esporas..... | 39 |
| Determinación de las Dimensiones de Hifas Apicales..... | 39 |
| Inhibición de Actividad β -1,3-glucanasa..... | 40 |
| Obtención de Extractos con Actividad β -1,3-glucanasa..... | 40 |
| Determinación de Proteína..... | 40 |
| Detección de la Actividad β -1,3-glucanasa..... | 40 |
| Análisis Estadístico..... | 41 |
| RESULTADOS Y DISCUSION..... | 42 |
| Crecimiento Radial..... | 42 |
| Germinación de Esporas..... | 47 |
| Dimensiones de Esporas..... | 51 |
| Dimensiones de Hifas..... | 51 |
| Actividad β -1,3-glucanasa..... | 56 |
| CONCLUSIONES..... | 60 |
| RECOMENDACIONES..... | 61 |
| REFERENCIAS..... | 62 |

| | |
|--------------|----|
| ANEXOS | 69 |
| ANEXO A..... | 70 |
| ANEXO B..... | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Incidencia de hongos con potencial micotoxigénico presentes en muestras de 14 puntos geográficos de la República Mexicana..... | 9 |
| 2 | Estructura de las hifas..... | 12 |
| 3 | (A) Pudrición de la mazorca causada por <i>Fusarium verticillioides</i> en granos individuales. (B) Pudrición de la mazorca causada por <i>Fusarium verticillioides</i> en ciertas áreas de la mazorca..... | 16 |
| 4 | Diagrama de flujo del procedimiento general seguido para llevar a cabo los análisis de CR (crecimiento radial), DH (dimensiones de hifas), GE (germinación de esporas), DE (dimensiones de esporas) y AG (actividad β -1,3 glucanasa) a <i>F. verticillioides</i> tratado con la fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> y un control (sin antifúngico)..... | 36 |
| 5 | Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> desarrollado en medio agar czapek (control) y en agar czapek conteniendo fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> , incubado durante 7 días..... | 44 |
| 6 | Porcentaje de germinación de esporas de <i>F. verticillioides</i> incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> a diferentes tiempos de incubación. | 48 |

| | | |
|---|---|----|
| 7 | Dimensiones del largo y ancho de esporas de <i>F. verticillioides</i> incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> , de las distintas “generaciones”. Los colores de las barras indican el tiempo de incubación (horas)..... | 52 |
| 8 | Esporas de <i>F. verticillioides</i> incubado en caldo czapek a las 21 horas, A: control, B-D: adicionado con la fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> | 54 |
| 9 | Actividad específica β -1,3-glucanasa determinada en extractos proteicos de <i>F. verticillioides</i> de diferentes generaciones expuestos o no (control) a una fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> | 58 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Límites máximos permisibles de residuos de fungicidas. | 21 |
| 2 | Porcentaje de inhibición y de recuperación del crecimiento radial a las 168 h de incubación de <i>F. verticillioides</i> expuesto a una fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> en diferentes generaciones. | 43 |
| 3 | Constante de velocidad (μm) del crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> incubado en agar czapek (control) y en agar czapek adicionado con la fracción antifúngica de <i>Jacquinia macrocarpa</i> en diferentes generaciones. | 46 |
| 4 | Constante de velocidad (k) de la germinación de esporas de <i>F. verticillioides</i> incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de <i>Jacquinia macrocarpa</i> en diferentes generaciones. | 50 |
| 5 | Dimensiones (μm) promedio de largo y ancho de esporas de <i>F. verticillioides</i> incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> a diferentes tiempos de incubación. | 53 |
| 6 | Dimensiones de hifas apicales de <i>F. verticillioides</i> determinadas a las 168 h de incubación expuesto a una fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> en diferentes generaciones. | 55 |
| 7 | Contenido proteico y actividad glucanasa específica de extracto proteico de <i>Fusarium verticillioides</i> de distintas generaciones expuestas a una fracción antifúngica de <i>J. macrocarpa</i> . | 57 |

INTRODUCCIÓN

El uso de fungicidas sintéticos es una práctica común para el combate de enfermedades y plagas en los cultivos, sin embargo, es bien conocido que sus efectos colaterales provocan grandes daños al ambiente y en consecuencia a los organismos dentro de esos hábitats, incluyendo a los seres humanos (UNEP, 2004), puesto que es tóxico para los usuarios (Whalen *et al.*, 2003). Además, ocasionan que las exportaciones sean retenidas por la detección de residuos en productos de consumo (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 2002), así como afectación de organismos benéficos (Anderson *et al.*, 2003) y resistencia de los microorganismos fitopatógenos a los compuestos activos de algunos fungicidas sintéticos (Cooke *et al.*, 2003; Leroux, 2003).

Una alternativa al uso de antifúngicos sintéticos son los compuestos de origen natural, los cuales también pueden inhibir el desarrollo de los hongos. Este tipo de compuestos pueden ser extraídos de plantas. Se asume que, en general, los extractos de plantas son más aceptables y menos peligrosos que los compuestos sintéticos, por lo que constituyen una alternativa potencial en el establecimiento de metodologías para el control de hongos fitopatógenos (Jobling, 2000).

Actualmente, un grupo de investigadores del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos ha logrado purificar y caracterizar parcialmente fracciones con capacidad antifúngica contra los hongos micotoxigénicos y fitopatógenos del maíz *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides*, así como contra los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, a partir de extractos metanólicos de plantas (Rosas-Burgos *et al.*, 2009; Valenzuela-Cota *et al.*, 2014). Entre las plantas evaluadas se encuentra *Jacquinia macrocarpa*, especie nativa del estado de Sonora que ha sido utilizada en la medicina tradicional. Se ha encontrado que la fracción antifúngica actúa sobre la pared celular y que tiene la capacidad de hidrolizar la quitina presente en la pared celular de los hongos, así como de inhibir competitivamente la actividad de enzimas β -1,3-glucanasa de los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides* (Buitimea-Cantúa *et al.*, 2013), enzima indispensable para la correcta formación de la pared celular. En otro estudio realizado por ese grupo de

investigadores, se encontró que la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* es capaz de promover la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en *F. verticillioides*, así como de inhibir la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (Valenzuela-Cota *et al.*, 2016).

Los prometedores resultados obtenidos hasta ahora no impiden que se pierda de vista la gran capacidad de adaptación a los cambios ambientales que los hongos poseen y, por consiguiente, el posible desarrollo de resistencia adquirida a los antifúngicos. El conocimiento de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos es esencial para el desarrollo de estrategias eficaces para su combate (Pontón y Quindós, 2006).

En el presente trabajo de investigación se pretende determinar la capacidad del hongo *F. verticillioides* expuesto a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* para desarrollar mecanismos para contrarrestar el efecto fungicida y conocer los cambios que ocurren durante su exposición.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Maíz

El maíz (*Zea mays*), perteneciente a la familia de las gramíneas (ILSI Argentina, 2006), es el cereal más ampliamente distribuido a nivel mundial, el cual ocupa la tercera posición en producción, seguido por el trigo y el arroz (SIACON, 2007). El consumo mundial de maíz continúa creciendo ya que constituye una parte sustancial de la dieta humana debido a su alto valor energético y nutricional.

El grano de maíz tradicional está compuesto por un 70 a 75 % de almidón, 8 a 10 % de proteína y 4 a 5 % de aceite, contenidos en tres estructuras: el germen (embrión), el endospermo y el pericarpio. El germen contiene el 83% de los lípidos y el 26% de la proteína del grano. El endospermo contiene el 98 % del almidón y el 74 % de las proteínas del grano. El pericarpio incluye todos los tejidos de cobertura exterior, con un 100 % de fibras vegetales (ILSI Argentina, 2006).

Maíz en México

Debido a su cultivo en casi todas las partes del mundo, es posible encontrar plantas de este cereal con algunas características diferentes. En México se han reconocido 25 razas, las cuales incluyen gran número de formas que se caracterizan por el color, tamaño, volumen, etc. (INEGI, 1997). México es el sexto productor de maíz en el mundo, pero también es un importante consumidor del mismo, se produce un promedio anual de 17.5 millones de toneladas de maíz en una superficie de 7 millones de hectáreas. Durante el año agrícola 2015, diez estados mexicanos concentraron aproximadamente el 80 % de la producción nacional de grano de maíz. El estado de Sinaloa se ubica como el principal productor de este grano en el país, con una participación de 21.8 %, en segundo lugar, se encuentra Jalisco con 13.5 % de participación y el tercer lugar lo ocupa el Estado de México con una participación de 8. % del total y un volumen de 2 millones de toneladas (FIRA, 2016).

La producción de maíz en México se distribuye en todos los meses del año: en Sinaloa se cosecha el 95.8 % de su producción entre mayo y julio; en Jalisco, el 91.8 % entre

noviembre y febrero; y en el Estado de México, el 94 % de su producción se cosecha entre noviembre y enero. La producción de Sinaloa proviene básicamente del ciclo otoño-invierno. El precio medio rural de maíz grano ponderado en México, para el ciclo agrícola fue de 3,423 pesos por tonelada (FIRA, 2016).

El maíz es sin duda el grano forrajero por excelencia a nivel mundial. La utilización de maíz en la alimentación de rumiantes ofrece ciertas características distintivas a la carne, diferentes a las obtenidas con los sistemas puramente pastoriles, atribuye mejores características organolépticas (color, terneza) debido al mayor engrasamiento y mayor crecimiento de los animales (ILSI Argentina, 2006). Las diferencias en las características organolépticas a veces pueden ser pequeñas o no existir, ya que dependen del nivel de participación del grano en la dieta, como así también al manejo *post mortem* de la carne.

Las proteínas del grano de maíz pueden constituir entre el 20 al 50 % del consumo proteico en las diferentes etapas de producción de cerdos, con lo cual su calidad nutritiva representa un gran objetivo para los especialistas en producción porcina. En valores absolutos, el grano de maíz puede aportar el 27 o 46% del tenor de proteína de la dieta para cerdos de 40 o 90 kg de peso vivo, respectivamente (ILSI Argentina, 2006).

Enfermedades y Plagas del Maíz

El maíz es un cereal considerado muy completo, con muchos aportes nutritivos, tanto para el ser humano, como para los animales. Sin embargo, es susceptible a varias enfermedades y plagas, que en alguna forma afectan el desarrollo normal de las plantas. El gusano cogollero, barrenador del tallo, frailecillo, manchas foliares o tizón, roya común, pudrición de la raíz, pudriciones del tallo y pudrición rosada son las más comunes que se presentan en el cultivo de maíz (CESAVEG, 2011) causando pérdidas significativas a los agricultores y amenazando la seguridad alimentaria. Los principales factores que influyen en la aparición de enfermedades y plagas durante el desarrollo

de los cultivos son las condiciones ambientales, insectos, roedores, hongos y bacterias, entre otros. Es importante el control de estos factores para evitar daños a futuro.

Condiciones Ambientales

El clima húmedo y cálido es sin duda favorable al crecimiento y a la difusión de los patógenos causantes de las enfermedades. Sin embargo, el maíz se cultiva en una gran diversidad de ambientes en las zonas tropicales. Para la siembra del maíz es necesaria una temperatura media del suelo de 10°C, y que ella vaya en aumento. Para que la floración se desarrolle normalmente conviene que la temperatura sea de 18 ° C como mínimo. En la fase de crecimiento, la temperatura ideal se encuentra comprendida entre 24 y 30 ° C. El maíz crece o se cultiva en diferentes suelos, preferentemente con pH comprendido entre 6 y 7, pero se adapta a condiciones de pH más bajo y más elevado, e incluso se da en terrenos calizos, siempre que el exceso de cal no implique el bloqueo de microelementos (Varon-Agudelo y Sarria-Villa, 2007).

Las fuertes necesidades de agua del maíz condicionan también el área del cultivo, altas temperatura y alta humedad favorecen el crecimiento de bacterias y hongos. La humedad relativa del ambiente es importante, este factor extrínseco afecta el crecimiento microbiano y puede ser influenciado por la temperatura (Food quality, 2010). Cada especie de microorganismo tiene un intervalo mínimo y óptimo de temperatura y humedad relativa para su crecimiento, en el caso de hongos, estos pueden germinar y desarrollarse desde el 75 % de humedad relativa (CNSP, 2008).

La humedad relativa influye directamente en la actividad de agua (A_w) del alimento. Si un alimento con baja actividad de agua se guarda en una atmósfera con humedad relativa alta, la actividad de agua de este alimento aumentará permitiendo el deterioro debido a los microorganismos (Meruane y Garreaud, 2015).

Los hongos filamentosos pueden invadir los granos desde el campo debido a que pueden desarrollarse a una humedad más alta, desde 0.8 de actividad de agua (Gock *et al.*, 2003). Para control postcosecha, el maíz en grano entero, listo para ser utilizado

como alimento humano, debe tener un contenido de humedad máximo de 15.5 % (FAO, 2013).

Insectos y Roedores

En los cultivos y huertas siempre hay todo tipo de insectos y organismos, con más beneficio o daño para la plantación, según los casos. El problema surge cuando hay desequilibrios y desajustes en el ecosistema, y estos agentes se reproducen de una forma descontrolada.

Los agentes vectores, en este caso, insectos y roedores; son capaces de adquirir algún virus de plantas enfermas, retenerlo y transmitirlo a plantas sanas. Son varias las especies que transmiten los virus que afectan el maíz, solo necesitan segundos para adquirir y transmitir el virus. Una plaga común es el insecto *Rhopalosiphum maidis*, el cual puede establecerse en muchas especies de plantas gramíneas transmitiendo virus a la planta hospedera. Tan pronto germina el maíz, los áfidos alados buscan alimento y sitio para establecer sus colonias. En la búsqueda de alimento ellos prueban varias plantas antes de detenerse en una específica, transmitiendo y diseminando de esta manera la enfermedad (Varon-Agudelo y Sarria-Villa, 2007).

Los roedores son plagas que muchas veces pasan inadvertidas, sin darle la debida importancia. Las ratas y los ratones representan un problema muy grave en el proceso de manejo y conservación de granos y productos alimenticios. Los roedores representan un peligro muy serio para la salud del hombre y de los animales domésticos, pues además de alimentarse de los granos almacenados, son transmisores de enfermedades como la leptopirosis. Desde el punto de vista del manejo, del almacenamiento y de la conservación de granos y alimentos, la rata noruega (*Rattus norvegicus*) es uno de los roedores de gran importancia económica, busca el grano de los campos de cultivo en forma muy activa y hace edificaciones donde se tiene el grano almacenado (Deras-Flores, 2010).

Hongos y Bacterias

Las principales enfermedades que afectan el cultivo del maíz son causadas por hongos y bacterias, su aparición está sujeta a las condiciones ambientales que favorezcan la infección y multiplicación del patógeno.

Pudrición bacteriana del tallo

Es una enfermedad causada por bacterias (*Erwinia carotovora*), muy común en climas con altas temperaturas y alta humedad. Se propaga rápidamente en la planta hospedante y la destruye. Las plantas infectadas adquieren un color oscuro, tienen aspecto acuoso en la base del tallo y mueren poco después de la floración. La descomposición bacteriana produce un olor característico desagradable (Varon-Agudelo y Sarria-Villa, 2007).

Pudrición de la raíz

Es una enfermedad causada por hongos (*Pythium aphanidermatum*, *Diplodia maydis*, *Fusarium spp*). La infección ocurre desde la fase de semilla, durante la germinación y el desarrollo del cultivo. La pudrición postemergente se caracteriza por contener el inóculo en la raíz de la plántula, presentando un color amarillento, falta de vigor y estrangulamiento a nivel de la base del tallo, ocasionando la muerte prematura de la misma. Las condiciones que favorecen la presencia de estos hongos son suelos pobremente drenados, con excesiva compactación y una temperatura base de 10 a 13 °C (CESAVEG, 2011).

Pudriciones del tallo

Es una enfermedad causada por hongos (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium spp*, *Diplodia maydis*, *Pythium aphanidermatum*). Después de la polinización y al aproximarse la madurez de las plantas, el micelio del hongo se activa e invade sus nudos bajos. Condiciones secas al inicio de la estación y temperaturas de 28-30 °C, seguidas de tiempo húmedo, 2-3 semanas después del llenado de grano, favorece la pudrición. Condiciones como alto contenido de nitrógeno y bajo de potasio, además de una densidad excesiva de plantas, son favorables al hongo. Al mismo tiempo, el

daño por insectos puede facilitar su penetración. Con el uso cada vez más extenso de siembra de semillas híbridas en nuestro país se ha incrementado este problema (CESAVEG, 2011).

En un estudio realizado por Vega-Ortiz, en el 2012, se identificó la presencia de hongos potencialmente micotoxigenicos en muestras de maíz provenientes de 14 puntos geográficos de la república mexicana (Figura 1), donde se obtuvo mayor incidencia de *Fusarium* en un 76.99 % y menor incidencia de *A. niger* con un 0.38 % (Vega-Ortiz, 2012).

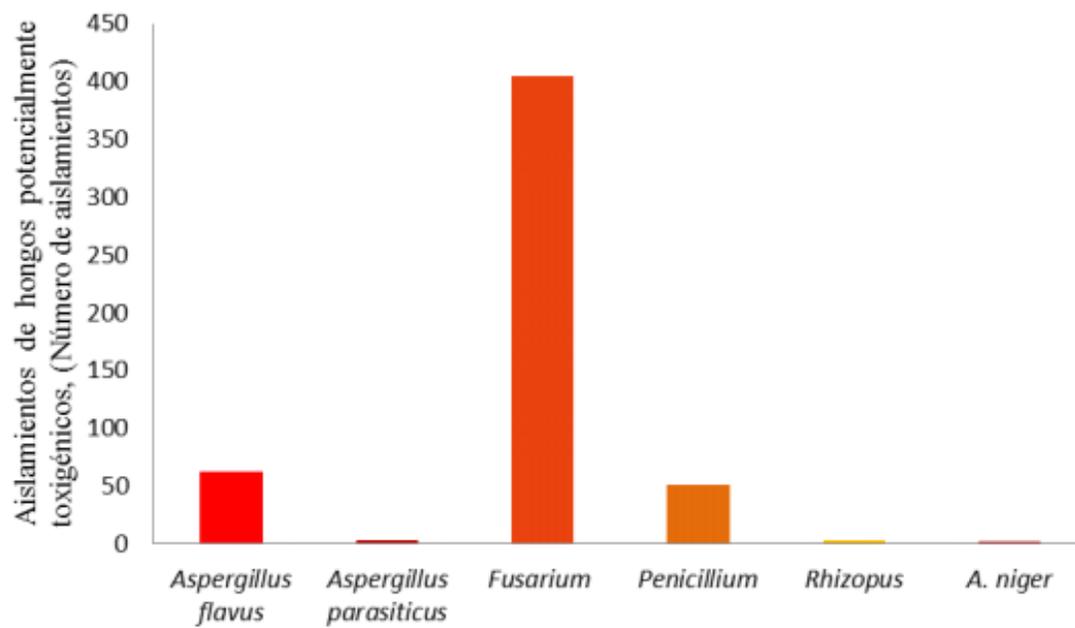


Figura 1. Incidencia de hongos con potencial micotoxigénico presentes en muestras de 14 puntos geográficos de la República Mexicana.

Fuente: Vega-Ortiz (2012).

Hongos

El ser humano, a lo largo del tiempo, se ha visto beneficiado por la utilización de hongos ya sea en la industria alimentaria (quesos, fermentadores de vinos y otras bebidas, setas comestibles, etc.), en el reciclaje (los hongos son capaces de descomponer la materia orgánica para posteriormente reciclar los nutrientes en los ecosistemas), establecer relaciones simbióticas con organismos hospedantes (beneficiando los cultivos) y en el área de farmacéutica como producción de antibióticos (*Penicillium*). Pero, así como el hombre se ha visto beneficiado también ha sufrido las consecuencias por hongos infecciosos (Maestre, *et al.*, 2001).

Características Taxonómicas

La taxonomía en hongos mantiene categorías, niveles o jerarquías, las cuales agrupan a los especímenes desde grupos que comparten características desde muy generales a nivel de Reino, hasta aquellos que comparten características muy específicas, las cuales suben hasta el nivel de género, especie, variedad, etc.

En este reino se incluyen individuos como son las levaduras, los mohos y las setas. Todos los individuos de este grupo se caracterizan por estar formados por células eucariotas, que son aquellas que tienen el núcleo diferenciado. Todos estos seres tienen nutrición heterótrofa, es decir que forman materia orgánica a partir de otra materia orgánica. No pueden realizar la fotosíntesis (Ruiz-Herrera, 2001). Dependiendo de dónde adquieran la materia orgánica, se habla de hongos parásitos, si el alimento lo extraen de un ser vivo al que causan un perjuicio, o saprófitos, si es materia orgánica que no pertenece a un ser vivo. Los hongos se dividen en cuatro clases, una de ellas son los ascomicetos los cuales son de gran utilidad en la industria y la medicina. Los ascomicetos se encuentran repartidos en diversos medios: en el agua, en el suelo, en vegetales y animales en descomposición, en sustancias azucaradas, en los que llevan una vida parasitaria causando serias enfermedades a plantas cultivadas (Herrera y Ulloa, 2013).

Características Estructurales

Los hongos están constituidos por tubos filamentosos llamados hifas. En muchas especies las paredes perforadas, o septos, dividen las hifas en células que contienen uno o dos núcleos (Figura 2). Los flujos protoplasmáticos a través de las aberturas de los septos proporcionan nutrientes a las células, que se almacenan en las paredes de las hifas en forma de glucógeno. Las hifas crecen por alargamiento de las puntas. La masa completa de hifas se llama micelio (Herrera y Ulloa, 2013).

Características Fisiológicas

En la mayor parte de los hongos las paredes de las hifas están compuestas principalmente por quitina, glucanos y glicoproteínas. La celulosa, que está presente sólo en unos pocos grupos de hongos, es característica de los oomicetos. La proporción de agua de los hongos mucilaginosos generalmente es de más del 90 %. Las esporas pueden tener menos del 50 % de agua; otras estructuras de resistencia, tales como los esclerocios, contienen aún menos (Méndez, 2015). Los hongos crecen mejor cuando hay una fuente rica de materia orgánica. La mayoría de los hongos crecen en un pH ácido de aproximadamente 5.0, aunque algunas especies crecen a niveles de pH más bajos o más altos. El crecimiento puede verse profundamente afectado por una serie de factores físicos como la temperatura, la luz y la aireación (Anjisha, *et al.*, 2012).

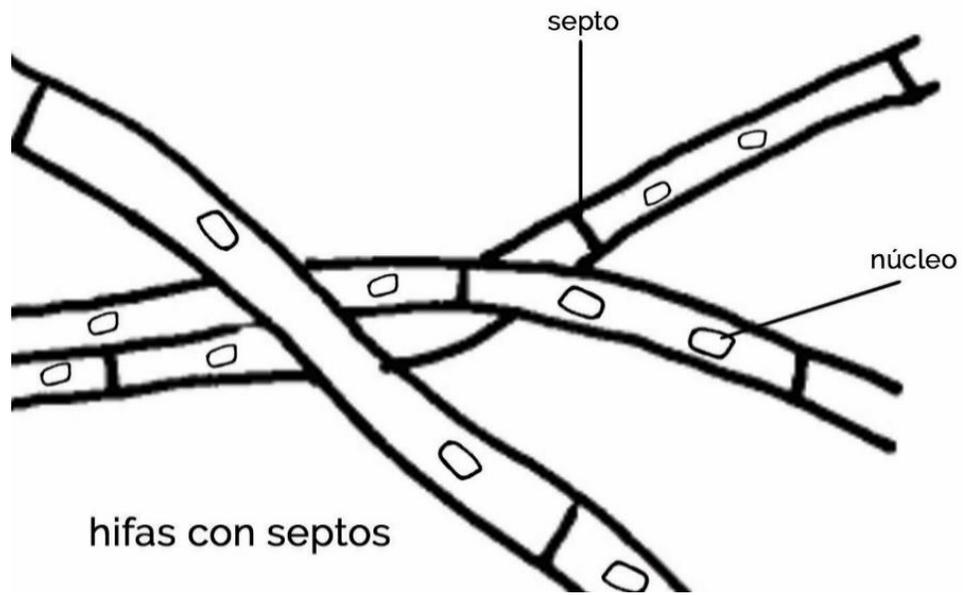


Figura 2. Estructura de las hifas.

Fuente: Carrillo (2003).

Fusarium verticillioides

Existen hongos que se desarrollan de forma parásita, causando enfermedades infecciosas. Las infecciones causadas por hongos se les denominan micosis. Uno de los hongos que actualmente ha causado problemas es *Fusarium verticillioides* ocasionando enfermedades en seres humanos, animales y en cultivos agrícolas importantes como en los cereales. Este hongo es potencialmente productor de fumonisinas B1, B2 y B3, de las cuales las B1 son reconocidas posibles carcinógenos humanos.

Si la actividad del agua lo permite, *F. verticillioides* crecerá en los productos almacenados causando alteraciones y a veces produciendo toxinas. Estos hongos crecen en ambientes templados, en un rango de 2 °C a 37 °C y una actividad del agua mínima de 0.87; requieren una humedad relativa de 65 a 90 % y un alto contenido de humedad en el grano (24-25 %). Puede crecer en pH de 3 a 9.5 y utiliza como sustrato el maíz. No compiten bien con las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Lacey, 1989; Backhouse, 2001).

F. verticillioides es un ascomiceto perteneciente a la subdivisión Deuteromycota, que agrupa a aquellos hongos en los que no hay descrita una fase sexual o, bien, ésta es muy poco frecuente. *F. verticillioides* entra en esta subdivisión, porque presenta una fase sexual llamada teleomorfo, o forma perfecta, muy difícil de encontrar en la naturaleza y se requieren condiciones especiales para observarla *in vitro*. La forma teleomórfica recibe otro nombre de género y especie: para *F. verticillioides* es *Gibberella moniliformis*, cuya reproducción sexual es heterotálica, ya que el apareamiento ocurre entre colonias de distintos grupos. En el estado anamorfo, o de reproducción asexual, hay abundante producción de microconidias; éstas son células ovaladas con la base aplanada y agrupadas en cadenas. Algunas cepas también generan macroconidias con apariencia larga y delgada, y con cinco o seis septos. Muestran dos células: una apical, que es curva, y otra basal, en forma de pie. Este tipo de conidias se producen con estructuras que aparentan racimos denominados

esporodoquios. La especie no produce clamidoconidias, pero con frecuencia las células contenidas en una hifa engrosada son confundidas como tales. Las características y la morfología de la colonia de esta especie varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en agar papa-dextrosa el micelio es blanco, al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta. En cambio, en algunos cultivos ya envejecidos, la hifa del hongo produce melanina para conformar estructuras llamadas esclerocios (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Identificación

La taxonomía de *Fusarium* es sumamente compleja. De ahí que haya sido tema de debate durante muchos años, porque el concepto de especies ha cambiado dentro de un género, dependiendo de los grupos de investigadores. La característica más importante para distinguir entre especies es la forma de los macroconidios, la única diferencia entre *F. verticillioides* y *Fusarium proliferatum* es que en esta última las cadenas de microconidios son más cortas que en la primera (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Daños a Maíz

F. verticillioides tiene un amplio rango de hospedantes, entre ellos muchos cereales (trigo, cebada, avena, maíz, etc.) y otras gramíneas. Entre las especies cultivadas destaca la especial sensibilidad de los trigos duros (Ministerio de Agricultura de España, 2015).

Este hongo es capaz de invadir y producir infecciones en el campo e incluso mantenerse durante el período de almacenamiento. Se manifiesta primero en granos o semillas muertas o con poca vitalidad, o bien en granos o semillas vivas que tengan rota la cubierta. Produce enzimas que descomponen a los carbohidratos, grasas y proteínas del grano o semilla y deterioran su calidad. La acidez de los granos en estas condiciones se incrementa y la capacidad germinativa decrece lenta o rápidamente hasta desaparecer (Deras-Flores, 2010).

F. verticillioides afecta principalmente la productividad del maíz, con alta frecuencia es aislado prácticamente de cualquier órgano de la planta ya que penetra por distintas rutas e infecta raíces, tallo y mazorca. Produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo que disminuye su calidad nutritiva y comercial ocasionando pérdidas cuantiosas que varían año con año. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, posteriormente, sobrevivir como saprófito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección, el hongo adquiere una fase biotrofa (sin producir muerte del tejido), al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, así como las condiciones ambientales (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

La pudrición de mazorca causada por *F. verticillioides* se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas de la mazorca (Figura 3). Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso o rayas blancas en el pericarpio y germinan estando aún en el olote. Por lo general, las mazorcas invadidas por barrenadores del tallo son infectadas por *F. verticillioides*. El hongo produce micotoxinas conocidas como fumonisinas, que son tóxicas para algunas especies animales y para todos los seres humanos (CIMMYT, 2004).

La pudrición de tallo causada por *F. verticillioides* se manifiesta apareciendo lesiones pequeñas de color café oscuro en los entrenudos inferiores. Al partir la planta verticalmente, se observa que el floema de los tallos infectados es café oscuro y que hay un oscurecimiento de los tejidos. En las etapas finales de la infección, la médula es destruida y los tejidos adyacentes pierden su color (CIMMYT, 2004).



Figura 3. (A) Pudrición de la mazorca causada por *Fusarium verticillioides* en granos individuales. (B) Pudrición de la mazorca causada por *Fusarium verticillioides* en ciertas áreas de la mazorca.

Fuente: CIMMYT (2004).

Enfermedades Causadas por *F. verticillioides*

Las infecciones por el género *Fusarium* se atribuye a su capacidad para crecer en gran número de substratos y a su eficaz mecanismo de dispersión; el viento y la lluvia juegan un importante papel en su diseminación. Se han descrito muchos casos de infecciones, especialmente en pacientes con alteraciones de la respuesta inmune, diabéticos, quemados, con heridas abiertas y contaminadas con tierra, con trastornos inmunológicos o con tratamiento inmunosupresor. Es probable que la infección se produzca por inhalación de las esporas, que se encuentran de forma habitual en el aire, se ha demostrado que el aire puede llevar las esporas hasta 400 km de distancia (Monzón y Rodríguez-Tudela, 2000).

Las fumonisinas son una familia de micotoxinas que contaminan al maíz y están catalogadas por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) como posibles carcinógenos humanos. Son producidas principalmente por los hongos *F. verticillioides* y *F. proliferatum* durante el cultivo y almacenamiento del grano. Existen 15 tipos de fumonisinas, agrupadas en cuatro categorías; las más conocidas son la FB1, FB2 y FB3, de las cuales la FB1 es la más tóxica y representa aproximadamente 70 % de la fumonisina total (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010).

En un estudio con cepas aisladas de distintas regiones geográficas, se estimó un rango de producción de fumonisinas de 10-5810 mg/g en semillas de maíz originarias de México (Torre-Hernández *et al.*, 2014). El Nivel máximo permisible en maíz (destinados a elaboración posterior) es de 2,000 ug/kg (Codex alimentarius, 2015). Se debe definir que en las zonas donde el maíz es un alimento básico importante, el consumo diario puede exceder de 100 g/día, mientras que la ingestión ocasional de maíz y productos de maíz suele dar lugar a una tasa diaria de consumo de 10 g/día (Codex alimentarius, 2000).

Estudios realizados principalmente en Sudáfrica y China, en los que compararon la concentración de fumonisinas presente en el maíz entre zonas de alta y baja incidencia

de cáncer esofágico e hígado, sugieren que estos podrían ser uno de los daños a la salud relacionados con la exposición constante a las fumonisinas (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010). De forma aguda, al estar en constante contacto con estas micotoxinas, provoca vómitos, diarrea, dolor abdominal y malestar general (ELIKA, 2013).

En animales, dependiendo de la especie, la exposición a las fumonisinas se asocia con diversos daños. Por ejemplo, en caballos, la exposición a las fumonisinas produce leucoencefalomalacia, una enfermedad caracterizada por necrosis y licuefacción de la materia blanca del cerebro. Otros daños observados principalmente en roedores son la toxicidad hepática y renal. En ratas hembras, el daño hepático es mucho más evidente que en los machos y se caracteriza por necrosis del hepatocito y disminución del peso del hígado. En cerdos alimentados con maíz contaminado con fumonisinas FB1 la manifestación es un cuadro de edema pulmonar atribuido a la acción tóxica de la fumonisina sobre la célula pulmonar (Torres-Sánchez y López-Carrillo, 2010) causando una notable pérdida de peso en cerdos.

Control de Enfermedades y Plagas

En la agricultura, se han ido desarrollando y aplicando diferentes controles para enfrentar las plagas y las enfermedades que atacan a los cultivos, tratando de reducir el daño económico causado por ellas. Es fundamental comenzar con la prevención, es decir, analizar el suelo, riego, estación del año, etc. Además, se requiere observación diaria para saber el estado del cultivo y cuando la planta ha sido infectada, se necesita intervenir.

Existen métodos de controles físicos y mecánicos. Método de control físico es el que busca destruir la plaga usando medios como el calor y el agua. Un ejemplo es el riego de machaco utilizado para ahogar larvas o pupas en el suelo. Método de control mecánico consiste en retirar insectos en estado de huevo, larvas o adultos. Asimismo, en retirar del campo de cultivo a las plantas enfermas o las partes de algunas de ellas

que estén afectadas por la plaga o enfermedad. Por ejemplo, en el caso del algodón se busca retirar las masas de huevos del arrebiatado, *Dysdercus peruvianus*. Sin embargo, siguen existiendo pérdidas económicas. Los productos químicos tienen efecto inmediato y pueden tratar enfermedades o eliminar insectos plagas con seguridad y sin mucha mano de obra (Yutaka, 2007). Por ejemplo, controlar la pudrición de la raíz del maíz se efectúa con fungicidas sintéticos protegiendo la planta 20 días después de la aplicación (CESAVEG, 2011).

Antifúngicos Sintéticos

Las plantas que se afectan con enfermedades nunca se recuperan, por el contrario, el carácter sistémico de la enfermedad le confiere la capacidad de mantenerse durante todo el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas y, a medida que crecen, los síntomas son más evidentes y severos (Varon-Agudelo y Sarria-Villa, 2007).

Para combatir este problema, se ha usado y abusado de los fungicidas sintéticos, los cuales provocan daños al ambiente y a los seres humanos (UNEP, 2004) puesto que son tóxicos para los usuarios (Whalen *et al.*, 2003). Además, ocasionan que las exportaciones sean retenidas por la detección de residuos en productos de consumo (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 2002), así como afectación de organismos benéficos (Anderson *et al.*, 2003) y resistencia de los microorganismos fitopatógenos a los compuestos activos de algunos fungicidas sintéticos (Cooke *et al.*, 2003; Leroux, 2003).

Los fungicidas comúnmente utilizados en el maíz: Azoxistrobina, ciproconazol, propiconazol, tebuconazol y trifloxistrobina (SENASA, 2007); son contaminantes que no se remueven fácilmente y pueden permanecer en el medioambiente durante un tiempo prolongado. Pueden contener metales pesados y químicos irritantes como plomo, cromo y cloruro de bencilo (cancerígeno) que pueden ser tóxicos para los usuarios (Ferrer, 2003). En los países altamente industrializados, las tasas de envenenamiento agudo con fungicidas en trabajadores agrícolas pueden ser

superiores a 18 casos por año por cada 100,000 trabajadores de tiempo completo (Weinberg, 2006).

La intensificación de la producción de alimentos conduce a menudo a un abuso de fungicidas, causando que las exportaciones sean retenidas por la detección de residuos en productos de consumo. En la tabla 1 se muestra el límite permisible de los fungicidas utilizados en maíz para el punto de entrada en un país.

El incremento en el uso de fungicidas causó también que las enfermedades objetivo comenzaron a desarrollar resistencia. Esto condujo a que, con frecuencia, los agricultores usaran dosis aún más altas para controlarlas. A menudo los fungicidas mataban no sólo al objetivo, sino también especies benéficas. Se produjo así un nuevo fenómeno llamado brote secundario: comenzaron a aparecer, en cantidades epidémicas, insectos o ácaros que antes habían estado controlados por especies benéficas y que con frecuencia pasaban inadvertidos. Se introdujeron entonces nuevos fungicidas para controlar el brote secundarias, con lo que la cantidad total de fungicidas en uso siguió aumentando (Weinberg, 2006).

El manejo de la resistencia a fungicidas es de importancia crítica para ampliar el período de tiempo en que un fungicida en riesgo es efectivo. El objetivo del manejo de la resistencia a fungicidas es minimizar el uso de los fungicidas en riesgo sin tener que sacrificar el control de la enfermedad. Lo anterior se alcanza con medidas de control que no involucren químicos (Santamaria y Ureta, 2004).

Tabla 1. Límites máximos permisibles de residuos de fungicidas.

| Fungicida | Límites máximos de residuos (mg/Kg) |
|-----------------|-------------------------------------|
| Azoxistrobin | 0.02 |
| Propiconazol | 0.05 |
| Ciproconazol | 0.01 |
| Trifloxistrobin | 0.02 |
| Tebuconazol | 0.06 |

Fuente: (FAO, 2018)

Antifúngicos Naturales

Una alternativa al uso de antifúngicos sintéticos son los compuestos de origen natural, los cuales también pueden inhibir el desarrollo de los hongos. Existen antifúngicos naturales obtenidos a partir de microorganismos, organismos marinos y plantas medicinales, entre otros, con menores efectos secundarios y menor costo que los antifúngicos sintéticos.

Los microorganismos pueden ser benéficos para los cultivos: los protegen de enfermedades causadas por hongos, incluso contribuyen a que se adapten mejor a su ambiente. Apoyan a las plantas en ciertas funciones que no pueden hacer por sí solas, como la toma de nitrógeno de la atmósfera. Para control de pudriciones del tallo de maíz, la inoculación en la semilla y el suelo con hongos *Trichoderma spp* y bacterias *Bacillus spp*, funciona como un manejo preventivo para que no se exprese la enfermedad de manera drástica durante el ciclo de cultivo (CESAVEG, 2011). También, en los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de compuestos bioactivos en organismos marinos. Se ha demostrado que esponjas del género *Oceanapia* cuentan con actividad antifúngica contra *Candida glabrata* (Mesa-Arango *et al.*, 2004). Asimismo, especies de algas marinas (*Acanthophora sp.*, *Bryothamnion triquetrum*, *Caulerpa mexicana*) mostraron actividad antibacteriana inhibiendo especies como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, sin embargo, no presentaron actividad antimicótica (Ríos *et al.*, 2009).

Antifúngicos de Extractos de Plantas

Las plantas medicinales han sido fuente de una amplia variedad de compuestos biológicamente activos por muchos siglos y se han utilizado como material crudo (extractos, infusiones, tinturas, entre otras) o como compuestos puros para el tratamiento de enfermedades (Arif *et al.*, 2009; Domingo y López-Brea, 2003).

La actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular contra diversos hongos, los cuales causan infecciones frecuentes en humanos, ha sido ampliamente estudiada. Numerosos investigadores han encaminado sus trabajos

hacia la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos que exhiban efectos secundarios mínimos, debido a diferentes factores: a los efectos adversos de algunos antifúngicos utilizados actualmente, a que son poco efectivos e inducen frecuentemente resistencia, y a los elevados costos de los tratamientos antimicóticos (Davicino *et al.*, 2007).

A través de los años se han investigado diversas plantas tradicionales y conocidas utilizadas por los nativos del noroeste de México (Moreno-Salazar *et al.*, 2008) como *Baccharis glutinosa* y *Ambrosia confertiflora*, las cuales se ha demostrado que producen un efecto fungicida contra hongos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *F. verticillioides* o retraso en la tasa de germinación de las esporas de los hongos mencionados anteriormente, por lo cual existe un potencial de aplicación práctica en el tratamiento de los hongos comúnmente asociado con el maíz y otros granos de cereales (Rosas-Burgos *et al.*, 2009).

También se han utilizado fracciones extraídas de la planta *Jacquinia macrocarpa* para evaluar su efecto antifúngico contra los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. verticillioides*. Demostrándose que el extracto de *J. macrocarpa* muestra inhibición del crecimiento radial en contra de los tres hongos. Esto quiere decir que esta planta también contiene componentes antifúngicos que se puede utilizar para controlar fitopatógenos en cereales, especialmente *F. verticillioides* (Valenzuela-Cota *et al.*, 2014).

J. macrocarpa es una especie que pertenece a la familia *Primulaceae*, en Sonora y Sinaloa se le conoce como San Juanico (CONABIO, 2018). Es utilizada en la medicina tradicional por los nativos de México y puede ser recolectada en comunidades rurales de Sonora, México (Buitimea-Cantúa *et al.*, 2013).

Mecanismos de Acción de Antifúngicos

Las plantas, para protegerse de plagas y enfermedades, recurren a la producción de diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc. (Davicino *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción es variable, por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Andrade-Bustamante *et al.*, 2016).

La membrana plasmática desempeña una importante función en la división celular y el metabolismo. Las partículas lipídicas llamadas esteroides constituyen aproximadamente el 25 % de la membrana celular pero el contenido difiere entre la célula fúngica y la de los mamíferos. En las células fúngicas predomina el ergosterol. Polienos, azoles y alilaminas inhiben la síntesis de ergosterol o se fijan al mismo modificando la permeabilidad de la membrana plasmática (Allevato *et al.*, 2007).

Polienos

Los antifúngicos poliénicos comprenden la anfotericina B y la nistatina. Su mecanismo de acción implica la unión al ergosterol, el esteroide principal de la membrana fúngica, y la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática (Ponton *et al.*, 2006). La alteración de la permeabilidad de la membrana permite la pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular. Puede comportarse como fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la

concentración en el lugar de la infección. Últimamente, se han reportado algunos casos de desarrollo de resistencia en algunas cepas de *Fusarium* (Allevato *et al.*, 2007).

Azoles

Los azoles tienen un anillo con átomos de nitrógeno libres unidos mediante enlace carbono-nitrógeno a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad etc. Tienen actividad fungistática por inhibición de la dimetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450, ello lleva a la acumulación de metilesteroles y a la reducción de la concentración de ergosterol. *In vitro*, se ha demostrado que voriconazol presenta actividad contra *Fusarium spp* (Allevato *et al.*, 2007).

Alilaminas

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Allevato *et al.*, 2007).

Equinocandinas

La pared fúngica está constituida por diferentes sustancias destacando glucanos, quitina y manoproteínas. Los glucanos son polímeros de carbohidratos constituidos por unidades de glucosa ligados por uniones β -1,3 (linear) y β -1,6 (ramificadas). La β -(1,3)-glucano sintetasa es una enzima esencial para la integridad de la pared celular del hongo. Toda mutación que impide la síntesis de β -(1,3)-glucano es letal. Se han estudiado tres familias de compuestos inhibidores de la síntesis de glucanos: las papulacandinas, las equinocandinas y los triterpenos glicosilados (Thompson, 2002). Las equinocandinas son lipopéptidos que inicialmente recibieron el nombre de neumocandinas, por su actividad frente a *Pneumocystis carinii* y *Candida*. Su mecanismo de acción radica en la inhibición de la β -1,3 glucanosintetasa. La inhibición de esta enzima, presente en la mayoría de los hongos y ausente en las células de

origen humano, lleva consigo una disminución de la síntesis del glucano, permitiendo que la célula fúngica entre en fase de inestabilidad osmótica y posterior muerte (Borrel-Sole, 2002).

Algunos azoles como el fluconazol, el itraconazol y equinocandinas como caspofungina, carecen de efecto fungicida frente a *Fusarium* (Allevato *et al.*, 2007).

Mecanismos de Adaptación a los Antifúngicos

El desarrollo de resistencias a los antifúngicos es un hecho inevitable, dada la gran capacidad de adaptación a los cambios ambientales que presentan los hongos. El conocimiento de la resistencia a los antifúngicos es esencial para el desarrollo de estrategias eficaces que eviten los problemas que están apareciendo en la actualidad con las micosis por hongos resistentes. En la resistencia del hongo al antifúngico desempeñan un papel muy importante factores del hongo como: La resistencia innata o primaria (presente antes de la exposición al antifúngico) y la adquirida (desarrollada tras el contacto con el antifúngico), la especie fúngica, el tamaño de la población fúngica, el cambio fenotípico y la capacidad para formar biopelículas (Ponton *et al.*, 2006).

Los fungicidas que son activos contra patógenos que ya han infectado a la planta, tienden a presentar un mayor riesgo a que los patógenos desarrollen resistencia a este tipo de fungicidas. Un patógeno resistente es menos sensible a la acción del fungicida, haciendo que éste sea menos efectivo o más aún, inefectivo. Estos fungicidas son capaces de penetrar la planta y eliminar selectivamente los hongos invasores, ellos están diseñados para identificar proteínas o enzimas específicas producidas por estos hongos. Ya que el modo de acción de estos fungicidas es tan específico, cualquier pequeño cambio en la genética de los hongos, pueden superar la eficacia de estos fungicidas y las poblaciones del patógeno pueden tornarse resistentes en aplicaciones futuras. Las estrategias de manejo de enfermedades que se basen primordialmente en aplicaciones curativas de fungicidas, conducirán a más problemas de resistencia

debido a que el tamaño de la población de la cual individuos resistentes son seleccionados es más grande, es difícil erradicar a todos los hongos dentro de una planta y frecuentemente algunos patógenos escapan a la acción del fungicida (Tuttle McGrath, 2004).

Algunos productos de desarrollo reciente son únicos ya que no afectan directamente al patógeno. Muchos de ellos obtienen una respuesta de la planta huésped conocida como “resistencia sistémica adquirida”. Estos inductores de resistencia sistémica adquirida, básicamente imitan señales químicas en las plantas que activan los mecanismos de defensa de la planta como lo son la producción de paredes celulares más gruesas y proteínas antifungosas. Sin embargo, la utilidad de los inductores ha sido limitada debido a que muchos patógenos son capaces de vencer dichas defensas (Tuttle McGrath, 2004).

La resistencia a fungicidas es un carácter heredable y estable que da como resultado una reducción en la sensibilidad al fungicida por parte de un hongo en particular. Esta capacidad se obtiene a través de un proceso evolutivo. Los fungicidas con un solo sitio de acción presentan un alto riesgo para el desarrollo de resistencia si se les compara con los fungicidas de múltiples sitios de acción. La mayoría de los fungicidas que se desarrollan hoy en día tienen un solo modo de acción porque este tipo de acción se asocia con un potencial bajo de impacto negativo al ambiente, incluido aquellos organismos para los cuales no está dirigido la acción del fungicida.

Cuando la resistencia al fungicida es el resultado de la modificación de un gen dominante, las subpoblaciones del patógeno son muy sensibles o altamente resistentes al pesticida. La resistencia, en este caso, se entiende como una pérdida completa del control de la enfermedad que no puede ser superada, aún si se utilizan dosis más altas o aplicaciones de fungicidas más frecuentes. Este tipo de resistencia es referida comúnmente como “resistencia cualitativa”.

Cuando la resistencia al fungicida es el resultado de la modificación de varios genes que interactúan, los aislamientos del patógeno muestran un rango de sensibilidad al fungicida, que depende de la cantidad de cambios que ocurren en los genes. La variación en la sensibilidad dentro de la población es continua. La resistencia en este caso se interpreta como el deterioro del control de la enfermedad que puede ser superada utilizando dosis más altas y aplicaciones de fungicidas más frecuentes. La selección a largo plazo por resistencia en el patógeno mediante la aplicación repetida del fungicida, puede eventualmente dar como resultado la utilización de las dosis más altas indicadas en las etiquetas y/o la reducción de los intervalos de aplicación, los cuales no controlarán adecuadamente la enfermedad. Este tipo de resistencia al fungicida se le denomina comúnmente como “resistencia cuantitativa”.

Los aislamientos de hongos que son resistentes a un fungicida a menudo son también resistentes a otros fungicidas relacionados, aun cuando no han sido expuestos a estos fungicidas, ya que todos ellos poseen el mismo modo de acción. A esto se le llama resistencia cruzada. Ocasionalmente ocurre una resistencia cruzada negativa entre fungicidas no relacionados debido a que el cambio genético que le confiere resistencia a un fungicida hace que el aislamiento resistente sea más sensible a otro fungicida (Tuttle McGrath, 2004).

Resistencia a Polienos

La resistencia a los polienos ha aumentado las enfermedades fúngicas causadas por hongos emergentes como *Trichosporon asahii*, *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* y *Scedosporium*. Muchos de estos hongos presentan una resistencia primaria a la anfotericina B y pueden causar infecciones (Ponton *et al.*, 2006).

La emergencia de hongos resistentes a los polienos se debe a la producción de cambios cualitativos y cuantitativos en los esteroides de la membrana (Ponton *et al.*, 2006), es decir, el hongo es capaz de disminuir y sustituir el ergosterol por otros

esteroles. También se ha descrito un aumento en la actividad catalasa que produce una disminución de la sensibilidad al daño oxidativo.

Resistencia a Azoles

La resistencia a los azoles puede ocurrir por una variedad de mecanismos que incluyen mutaciones que modifican la diana, sobreexpresión del gen ERG11, sobreexpresión de bombas de eflujo de la membrana que sacan el antifúngico del interior de la célula fúngica, interferencia con la acción sobre la 14-alfa-demetilasa, alteraciones en otras enzimas de la biosíntesis del ergosterol y la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco. La resistencia suele ir apareciendo gradualmente debido a la presión continua que el antifúngico ejerce sobre el hongo (Ponton *et al.*, 2006).

Resistencia a Alilaminas

La resistencia a la terbinafina, una alilamina, no es muy frecuente y se ha relacionado recientemente con una mutación en el gen ERG1 (escualeno epoxidasa, diana) y sobreexpresión de CDR1 y CDR2 (genes que codifican las bombas de eflujo) (Ponton *et al.*, 2006).

Resistencia a Equinocandinas

Se produce por mutaciones en el gen FSK131 (β -1,3 glucano sintasa, diana). No se han observado resistencias cruzadas con polienos y azoles (Ponton *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, se han realizado estudios sobre la actividad antifúngica de la planta *J. macrocarpa*, en donde se ha logrado purificar y caracterizar parcialmente una fracción con capacidad antifúngica contra los hongos micotoxigénicos y fitopatógenos del maíz *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides* (Valenzuela-Cota *et al.*, 2016; Medina-López *et al.*, 2016), así como contra los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*. También se ha encontrado que esta fracción actúa sobre la pared celular y que tienen la capacidad de hidrolizar la quitina presente en la pared celular de los hongos, así como de inhibir

competitivamente la actividad de enzimas β -1,3-glucanasa de los hongos *A. flavus* y *F. verticillioides* (Buitimea-Cantúa *et al.*, 2013), enzima indispensable para la correcta formación de la pared celular. En otro estudio realizado se encontró que la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* es capaz de promover la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno en *F. verticillioides*, así como de inhibir la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (Valenzuela-Cota *et al.*, 2016). Sin embargo, aún se desconoce si la aplicación de esa fracción antifúngica puede afectar de la misma forma a *F. verticillioides* cuando se le expone por tiempo prolongado.

Con la presente investigación se pretende determinar los cambios estructurales y fisiológicos que ocurren en *F. verticillioides* cuando es sometido a la exposición constante de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* que eventualmente le permitan al hongo recuperar su capacidad de desarrollarse.

HIPÓTESIS

Cuando el hongo *F. verticillioides* se encuentra en constante exposición a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, este activa mecanismos de acción que lo hace resistente a ella, manifestándose en la recuperación de las estructuras y funciones celulares alteradas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la capacidad del hongo *F. verticillioides* para recuperar sus características estructurales y fisiológicas modificadas por la presencia de una fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, durante su exposición constante a esta fracción.

Objetivos Particulares

- Determinar el efecto de la exposición constante a la fracción antifúngicas de *J. macrocarpa* sobre la germinación y el tamaño de las esporas, así como del de hifas apicales, durante el desarrollo de los diferentes cultivos del hongo en estudio.
- Determinar el efecto de la exposición constante de la fracción antifúngica sobre la actividad β -1,3-glucanasa, durante el desarrollo de los diferentes cultivos del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fracción Antifúngica

La fracción antifúngica utilizada en este estudio se obtuvo de la planta *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico), mediante el siguiente procedimiento: Las partes aéreas de la planta seca se molieron a un tamaño de partícula homogéneo y se utilizaron para obtener un extracto crudo agregando al 6 % (p/v) a una solución de metanol:agua (70:30), la cual se agitó a una velocidad constante durante una hora y después se mantuvo en almacenamiento durante 72 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se filtró con papel filtro Whatman No. 1 y después mediante un filtro de fibra de vidrio. Para eliminar el solvente del extracto se utilizó un rotaevaporador de la marca Yamato (RE300A, Yamato, USA) a 40 °C, obteniendo de esta forma los sólidos del extracto crudo.

A partir del extracto crudo se obtuvieron las fracciones diferenciales, los sólidos del extracto crudo se mezclaron con agua y posteriormente se partitionaron secuencialmente en diferentes solventes inmiscibles en agua, con diferentes polaridades los cuales fueron hexano, acetato de etilo y n-butanol. Las mezclas se agitaron durante 6 h y después se dejaron separar en un embudo de separación para obtener las distintas fracciones diferenciales. A las fracciones diferenciales se les eliminó el solvente mediante un rotaevaporador a 40 °C para obtener el sólido. Las fracciones diferenciales fueron seleccionadas de acuerdo con la actividad antifúngica que fue reportada en estudios previos (Buitimea-Cantúa *et al.*, 2013) y corroborada en la presente investigación. Este sólido fue utilizado para incorporarse en las diferentes determinaciones, como se menciona más adelante.

Elaboración de Suspensión de Esporas Fúngicas

El hongo filamentoso, fitopatógeno del maíz, *Fusarium moniliforme* (sinónimo *Fusarium verticillioides*) ATCC® 52539™, fue el utilizado en el presente estudio. Se cultivó en agar Czapek (Difco Laboratories; Dittroit, MI, USA) durante 7 días a una temperatura de 25 °C. Después del crecimiento colonial, se preparó una suspensión de esporas en una solución de tween 80 al 0.1% (v/v) de acuerdo con el procedimiento descrito por Davet y Roxuel (2000) y se calculó su concentración mediante el método de la cámara de Neubauer. Esta suspensión fue utilizada para iniciar los cultivos del hongo para obtener la primera semana.

Obtención de Cultivos Fúngicos de Diferentes “Generaciones”

De la suspensión de esporas obtenida se tomó un volumen necesario para obtener una concentración de esporas de 1×10^5 esporas/mL que fueron inoculados en 3 placas Petri y en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo agar Czapek y la CMI₅₀ de la fracción antifúngica. Todas las placas Petri se incubaron durante 7 días y se utilizaron para llevar a cabo las determinaciones de inhibición de crecimiento radial y de dimensiones de hifas como se describe más adelante. Los resultados de las determinaciones realizadas a estos cultivos fueron considerados como los resultados para la semana 1 (denominada “generación 1”). Por otro lado, el matraz inoculado fue también incubado durante 7 días a la temperatura óptima de crecimiento. Con el micelio desarrollado en el matraz se realizó una suspensión de esporas en solución tween 80 al 0.1 % (como fue descrito anteriormente) y esta suspensión correspondió a las esporas de la generación “1”, las cuales se utilizaron para, por una parte, inocular otras 3 placas de Petri y un matraz conteniendo agar Czapek y la CMI₅₀ de la fracción antifúngica. Con estas placas se llevaron a cabo las determinaciones de inhibición de crecimiento radial y de dimensiones de hifas, cuyos resultados correspondieron a la generación “2” y el matraz se incubó para obtener una suspensión de esporas que correspondiente a la generación “2”. Por otra parte, las esporas de la generación “1” fueron también utilizadas para realizar las determinaciones de germinación y de

dimensiones de esporas de la generación "1" (metodología descrita más adelante). Este mismo procedimiento se repitió durante 7 semanas (Figura 4).

El análisis de crecimiento radial se determinó a todas las generaciones obtenidas. En tanto que sólo a las generaciones 1, 3 y 7 se les determinó, además, germinación y dimensiones de esporas, dimensiones de hifas apicales, así como actividad β -1,3 glucanasa.

Para determinar el efecto de la exposición constante de *F. verticillioides* a la fracción antifúngica, sobre diversas expresiones fenotípicas, los siguientes análisis se llevaron a cabo en esporas o micelio obtenidos de las semanas de exposición 1, 3 y 7.

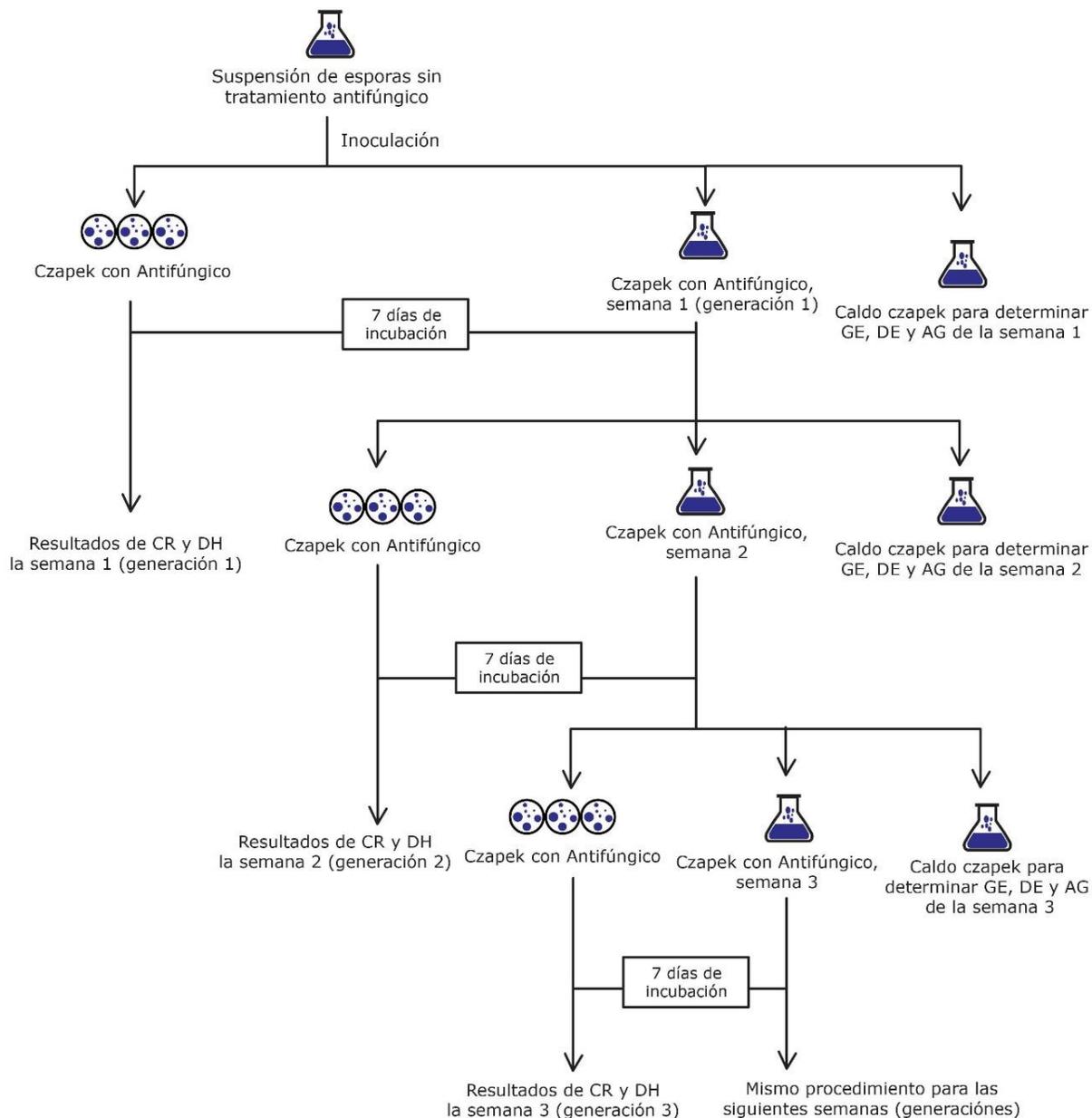


Figura 4. Diagrama de flujo del procedimiento general seguido para llevar a cabo los análisis de CR (crecimiento radial), DH (dimensiones de hifas), GE (germinación de esporas), DE (dimensiones de esporas) y AG (actividad β -1,3 glucanasa) a *F. verticillioides* tratado con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* y un control (sin antifúngico).

Determinación de la Cinética de Crecimiento Radial

Este análisis fue utilizado para determinar la actividad inhibitoria de la fracción antifúngica a cada una de las generaciones (semanas) del hongo. Se prepararon placas Petri conteniendo medio de cultivo agar Czapek y adicionadas con la concentración mínima que inhibe el 50 % del crecimiento radial del hongo (CMI₅₀), previamente determinados, esto es 5 mg/mL de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*. Posteriormente se inocularon con una suspensión de 1×10^5 esporas/mL de *F. verticillioides*, al centro de la placa en un pozo de 0.5 mm de diámetro, realizado en el medio de cultivo. Se utilizó un control conteniendo sólo medio agar Czapek. Las placas Petri inoculadas se incubaron en la oscuridad a 25 °C. Cada 24 h el diámetro de las colonias fue medido (Rosas-Burgos *et al.*, 2011).

Para determinar la velocidad de crecimiento radial (μ_m) del hongo *F. verticillioides* expuestas a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* de los diferentes cultivos, los datos de crecimiento radial fueron analizados por el programa Statistica versión 9 (TIBCO® Software, Inc.) mediante el procedimiento de modelos no lineales. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Gompertz modificada:

$$y = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

Donde:

Y es el tiempo, A es el crecimiento máximo del hongo, λ es la fase lag del hongo (la duración de la fase de adaptación) y μ_m es la velocidad máxima de crecimiento.

Determinación de la Cinética de Germinación de Esporas

Este análisis se llevó a cabo a esporas obtenidas del hongo de las generaciones 1, 3 y 7 expuestas a la fracción antifúngica. En placas de 12 pocillos de fondo plano de 1.9 cm² de área (Corning, NY, USA), conteniendo caldo Czapek (Difco Laboratories; Dittroit, MI, USA) y la CMI₅₀ de la fracción antifúngica, así como el control antes mencionados, se depositó una suspensión con 1x10⁶ esporas/mL y se incubó a 25 °C. Los pocillos de estas placas contenían láminas de vidrio en el fondo con la finalidad de que en ellos se depositen las esporas para poderlas retirar y de esa forma observar en un microscopio óptico. Los vidrios conteniendo las esporas se retiraron de su incubación cada 3 h durante 24 h. En cada tiempo de muestreo se tomaron fotografías de diferentes campos hasta contar con la imagen de aproximadamente 100 esporas para determinar el número de esporas germinadas. Las imágenes obtenidas fueron utilizadas para observar el número de esporas germinadas utilizando el programa para procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.). Una espora se consideró germinada cuando la longitud del túbulo germinal era igual o mayor al diámetro total de la espora. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación mediante la ecuación:

$$\%I = [(\%Sc - \%St)/(\%Sc)]100$$

Donde:

% Sc es el porcentaje de esporas germinadas en el control y % St es el porcentaje de esporas germinadas en el tratamiento.

Para determinar la velocidad de germinación (*k*) de las esporas de *F. verticillioides* expuestas a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* de los diferentes cultivos, los datos de porcentaje de germinación fueron analizados por el programa Statistica versión 9 (TIBCO® Software, Inc.) mediante el procedimiento de modelos no lineales. Las curvas de germinación de esporas fueron obtenidas utilizando la ecuación logística:

$$S = S_{max}/1 + [(S_{max} - S_0)/S_0]e^{-kt}$$

Donde:

S es el porcentaje de esporas germinadas después del tiempo t , S_0 es el porcentaje inicial de germinación, S_{max} es el porcentaje de germinación más alto ($t \rightarrow \infty$), y k es la velocidad de germinación de las esporas.

Determinación de Dimensiones de Esporas

Esta determinación se llevó a cabo a esporas obtenidas de los hongos de las generaciones 1, 3 y 7. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron las mismas imágenes obtenidas durante el análisis de germinación de esporas. Las fotografías obtenidas se utilizaron para realizar mediciones del diámetro de 100 esporas utilizando el programa para procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3. Las mediciones de las esporas se realizaron a lo largo y a lo ancho de la espora, cada 3 h de incubación, hasta la germinación de la espora.

Determinación de las Dimensiones de Hifas Apicales

Las dimensiones fueron tomadas a las hifas apicales del hongo expuesto a la fracción antifúngica de cada una de las generaciones desarrolladas. Después de un periodo de 7 días de incubación de los hongos en placas Petri conteniendo medio czapek y la CMI_{50} de la fracción antifúngica para el hongo, se les realizaron 100 mediciones de longitud y diámetro a las hifas del micelio apical como lo propuso Larralde *et al.* (1997). Las mediciones se llevaron a cabo en fotografías tomadas a las observaciones realizadas en un microscopio de luz y empleando el programa para procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.). También se realizaron 100 mediciones del micelio desarrollado en placas con cada uno de los controles.

Inhibición de Actividad β -1,3-glucanasa

Para evaluar la susceptibilidad de la enzima β -1,3-glucanasa del hongo a que su actividad sea inhibida por las fracciones antifúngicas, se utilizaron glucanasas comerciales (Sigma-Aldrich, 49101) y extracto con actividad β -1,3-glucanasa obtenido de *F. verticillioides*, haciendo uso de la metodología que a continuación se describe.

Obtención de extractos con actividad β -1,3-glucanasa

Para la obtención del extracto proteico se empleó *F. verticillioides* pertenecientes a las determinadas generaciones, cultivados en Caldo czapek por 96 h a 25 °C. El hongo se separó del caldo de cultivo por centrifugación a 2,500 \times g durante 15 min a 4 °C. Al sobrenadante se le adiciono 10 mL del buffer de extracción Tris/HCl 20 mM (pH 7.5) y alícuotas de 1 mL se transfirieron a tubos Eppendorf para someterse a sonicación (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500) a 40 Hz por 3 min y 4 °C, seguido de 2 min de incubación en hielo. La solución obtenida se centrifugo a 1,650 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante final se colecto y utilizó como extracto con actividad β -1,3-glucanasa.

Determinación de Proteína

A los extractos con actividad β -1,3-glucanasa se les determinó el contenido de proteína utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, 2018) (Anexo A).

Detección de la actividad β -1,3-glucanasa

El ensayo se inició agregando 125 μ L de sustrato (laminarina de *Laminaria digitata* Sigma; número de catálogo L9634; St. Louis, MO), 12 μ L (3 μ mol de glucosa min^{-1}) de enzima comercial β -1,3-glucanasa (Sigma-Aldrich; número de catálogo 49101; St. Luis MO) o extracto con actividad β -1,3-glucanasa obtenido del hongo, 362 μ L del buffer acetato de sodio 100 mM (pH 5). Este ensayo se realizó en presencia y ausencia de 12 μ L de la fracción antifúngica a una concentración de 5 mg mL^{-1} . La mezcla se incubo a 37 °C durante 25 min y los azúcares reductores liberados en la reacción de hidrólisis se determinó mediante el método de Somogy y Nelson (anexo B) (Li *et al.*,

2003). Los resultados se compararon con un estándar de glucosa, donde una unidad (U) de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de azúcares reductores a partir de equivalentes de laminarina para producir 1 μmol de glucosa min^{-1} , bajo las condiciones del ensayo (Vargas-Arispuro *et al.*, 2009).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de datos mediante un ANDEVA usando un diseño completamente al azar en donde la fuente de variación corresponde al número de “generaciones” (semanas de exposición). Las variables respuesta fueron: inhibición de crecimiento radial (%), germinación de esporas (%), dimensiones de esporas (μm), dimensiones de hifas (μm) e inhibición de actividad β -1,3-glucanasa (%). La diferencia significativa entre subconjuntos homogéneos se determinó mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se empleó el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2005). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

El hongo *F. verticillioides* fue expuesto a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* durante 7 semanas consecutivas. En los resultados que se muestran a continuación, se le denominó a cada semana de incubación como la correspondiente “generación”, es decir, a la semana 1 se le denominó “generación 1, a la semana 2, “generación 2” y así sucesivamente.

Crecimiento Radial

Como se puede observar en la Tabla 2, la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* mostró la capacidad de inhibir hasta un 85.8 % el crecimiento radial de *F. verticillioides*, hasta el final de cada periodo de incubación (168 h). Este valor se obtuvo con la primera generación de esporas expuestas al antifúngico. Estos valores de inhibición son similares a los porcentajes reportados previamente (Valenzuela-Cota *et al.*, 2014). También se observa que, a partir de la tercera generación, el hongo es menos inhibido que durante las primeras generaciones, es decir, recupera un 38.7 % de su crecimiento radial. La recuperación obtenida por el hongo fluctúa entre el 3.3 y 44.5 % en las siguientes generaciones y, de acuerdo con el análisis estadístico, los porcentajes de recuperación de la tercera a la séptima generación no muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Estos resultados sugieren que, *F. verticillioides* tiene la capacidad de recuperar su desarrollo hasta un determinado punto (44.5 ± 5.3 %), cuando es expuesto constantemente a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, sin embargo, el crecimiento del hongo continúa siendo inhibido considerablemente.

En la figura 5 se muestran las cinéticas de crecimiento radial de *F. verticillioides* en un medio control y expuesto a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* en las diferentes generaciones. El crecimiento de los hongos en los tratamientos con *J. macrocarpa*, de las generaciones 4 a la 7, tienen comportamiento similar, es decir, de manera general, el crecimiento inicia antes de las 24 h de incubación siguiendo un crecimiento lineal

Tabla 2. Porcentaje de inhibición y de recuperación del crecimiento radial a las 168 h de incubación de *F. verticillioides* expuesto a una fracción antifúngica de *J. macrocarpa* en diferentes generaciones.

| Generación (días) | Inhibición (%) | Recuperación (%) |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | | |
| 1 | 85.8 ± 1.4 ^a | -- |
| 2 | 82.5 ± 6.6 ^a | 3.3 ± 6.6 ^b |
| 3 | 47.1 ± 3.9 ^b | 38.7 ± 3.9 ^a |
| 4 | 54.3 ± 11.4 ^b | 31.5 ± 11.4 ^a |
| 5 | 53.1 ± 5.8 ^b | 32.7 ± 5.8 ^a |
| 6 | 41.3 ± 5.3 ^b | 44.5 ± 5.3 ^a |
| 7 | 42.9 ± 0.0 ^b | 42.9 ± 0.0 ^a |

Los valores con letras en superíndice iguales en cada columna indican que no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

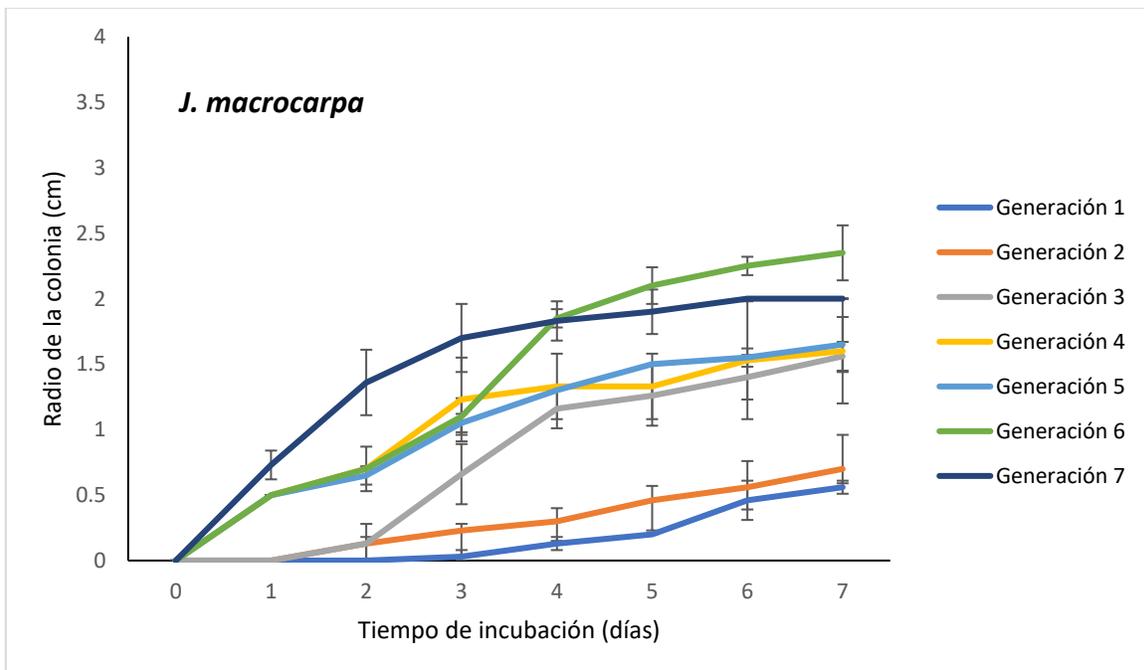
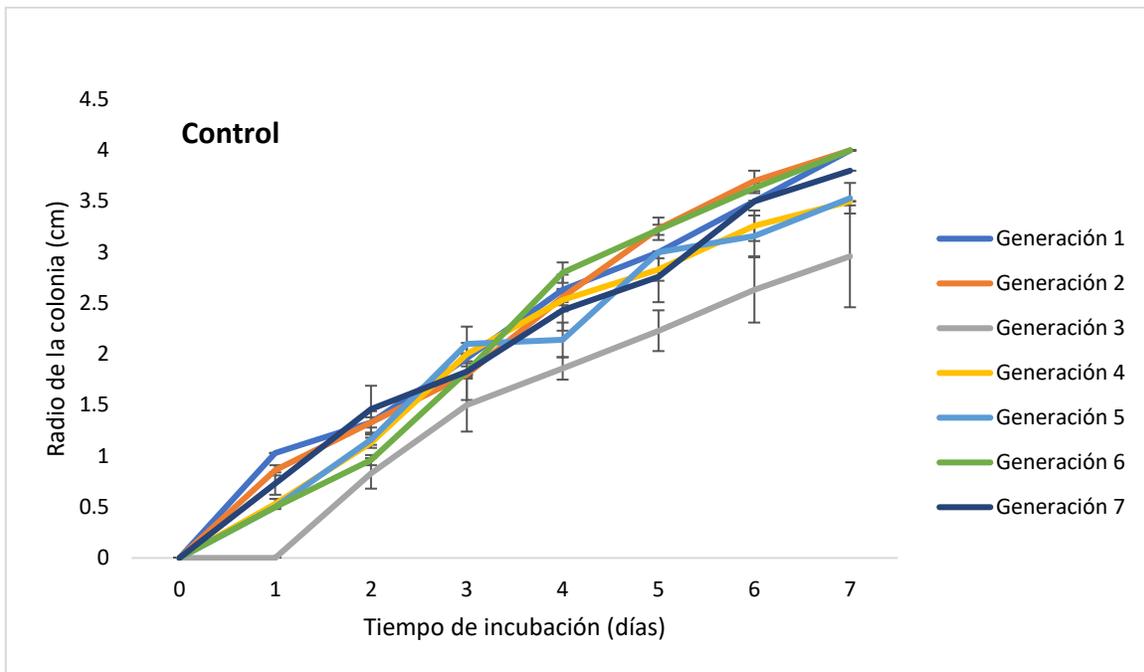


Figura 5. Crecimiento radial de *F. verticillioides* desarrollado en medio agar czapek (control) y en agar czapek conteniendo fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, incubado durante 7 días.

hasta un punto de inflexión entre los días 3 a 5 y posteriormente la curva se torna con menor pendiente. En tanto que la generación 1, 2 y 3 inician su crecimiento después de la 24 h de incubación. En el caso de la generación 3, el comportamiento posterior es similar al de las generaciones posteriores, sin embargo, la generación 1 tiene un desarrollo lineal durante todo el experimento y muestra los radios menores en todos los puntos de la cinética, comparado con el resto de las generaciones. Al comparar las cinéticas de crecimiento de los hongos tratados con la fracción de *J. macrocarpa* y el control, es evidente que las pendientes de todas las generaciones en los controles son mucho más pronunciadas que en los hongos con tratamiento antifúngico y los valores de radio de la colonia de los controles son mayores a los de los hongos con tratamiento antifúngico, durante todo el periodo de incubación, así como al final del experimento.

En la tabla 3 se puede observar que el crecimiento radial de *F. verticillioides* sin tratamiento antifúngico (control) de la generación 1 (semana 1) obtuvo una μm de 0.3, es decir, se observa una velocidad de 0.3 cm/día. Sin embargo, el extracto antifúngico de *J. macrocarpa* afectó considerablemente en la velocidad de crecimiento radial obteniendo una μm de 0.007, existiendo una diferencia entre ambas velocidades de 0.023. En la generación 2, la μm en el control y la del tratamiento son menores que las obtenidas en la generación 1 (0.02 y 0.005, respectivamente), sin embargo, la diferencia es menor (0.015). En la generación 3 (semana 3) la diferencia entre la μm del control y la del tratamiento es 0. Es decir, el extracto antifúngico no afectó, en esta generación, la velocidad del crecimiento radial. En las generaciones 4, 5 y 6 las diferencias obtenidas entre el control y el tratamiento fluctúan entre 0.02 y 0.01, mayores que la obtenida en la generación 3. Sin embargo, durante la generación 7, la diferencia fue de 0. Es decir, el valor μm de las generaciones 3 y 7 no fue afectada por *J. macrocarpa*.

Tabla 3. Constante de velocidad (μm) del crecimiento radial de *F. verticillioides* incubado en agar czapek (control) y en agar czapek adicionado con la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* en diferentes generaciones.

| Tratamiento | μm | $\mu\text{m}_c - \mu\text{m}_{Jm}$ | R |
|----------------------|---------------|------------------------------------|------|
| Generación 1 | | | |
| Control | 0.03 | | 0.99 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.007 | 0.023 | 0.95 |
| Generación 2 | | | |
| Control | 0.02 | | 0.99 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.005 | 0.015 | 0.88 |
| Generación 3 | | | |
| Control | 0.02 | | 0.96 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.02 | 0 | 0.96 |
| Generación 4 | | | |
| Control | 0.03 | | 0.99 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.01 | 0.02 | 0.82 |
| Generación 5 | | | |
| Control | 0.03 | | 0.98 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.01 | 0.02 | 0.98 |
| Generación 6 | | | |
| Control | 0.03 | | 0.99 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.02 | 0.01 | 0.97 |
| Generación 7 | | | |
| Control | 0.02 | | 0.97 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.02 | 0 | 0.94 |

μm_c = Constante de velocidad del crecimiento radial en medio control.

μm_{Jm} = Constante de velocidad del crecimiento radial en medio tratadas con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

Germinación de Esporas

Como se puede observar en la figura 6, las esporas de *F. verticillioides* de la generación 1, inoculadas en el medio control alcanzaron el 100 % de germinación a las 24 h de incubación, tiempo en el que únicamente el 27 % de las esporas expuestas a la fracción antifúngica pudieron germinar. Después de un periodo de incubación de 42 h, estas últimas esporas alcanzaron el 100 % de la germinación. Es decir, se aprecia un efecto de retraso en la germinación de las esporas expuestas a *J. macrocarpa*. Valenzuela-Cota *et al.* (2014), reportaron un 11.8 % de inhibición de la germinación de esporas de *F. verticillioides* expuesta a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* después de un periodo de incubación de 48 h, sin embargo, durante las primeras 24 h de incubación sólo germinaron aproximadamente el 50 % de las esporas.

En la figura 6 se puede observar que en las generaciones 3 y 7, aunque existe un leve retraso en el inicio de la germinación en comparación con sus respectivos controles (3 horas posteriores al control para generación 7), ese retraso no es tan evidente como el sucedido con la generación 1 (9 h posteriores al control). Se observa también que mientras las esporas de la generación 1 alcanzan el 100 % de su germinación hasta las 42 h (18 h posteriores al control), las generaciones 3 y 7 lo hacen desde las 27 h (3 h posteriores a los controles).

Estos resultados coinciden con los obtenidos de crecimiento radial, es decir, la generación 1 tratada con la fracción de *J. macrocarpa* es la generación con mayor inhibición del crecimiento radial y la que presenta un mayor retraso en la germinación de sus esporas. En tanto que en las generaciones 3 y 7 la inhibición del crecimiento radial es menor, así como menor es el retraso en la germinación de las esporas.

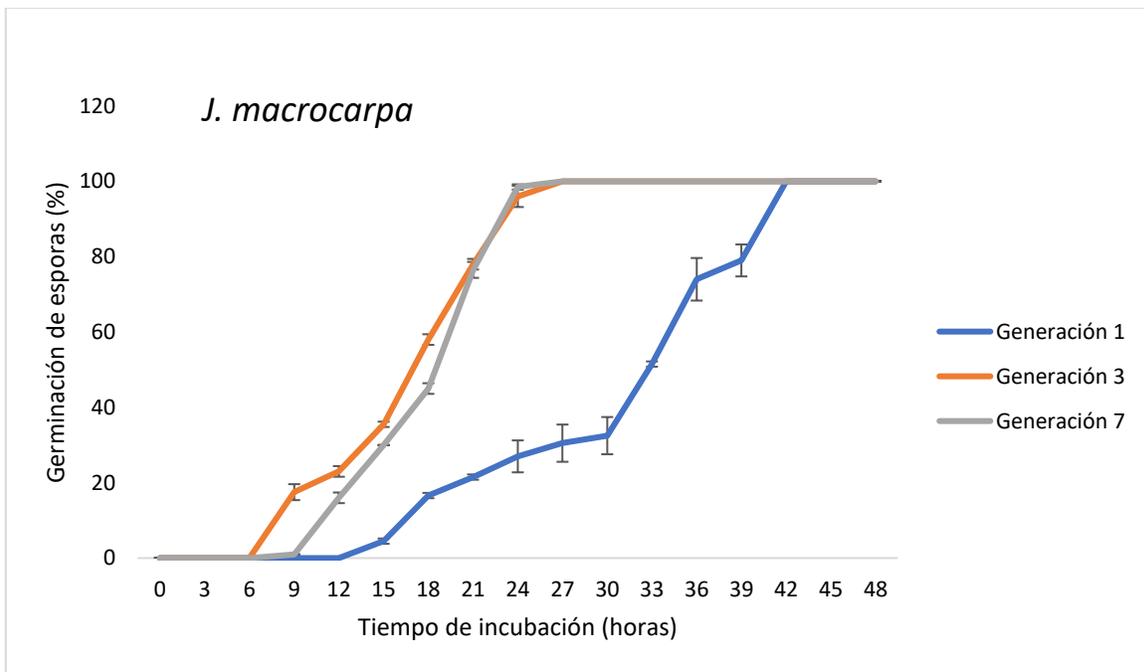
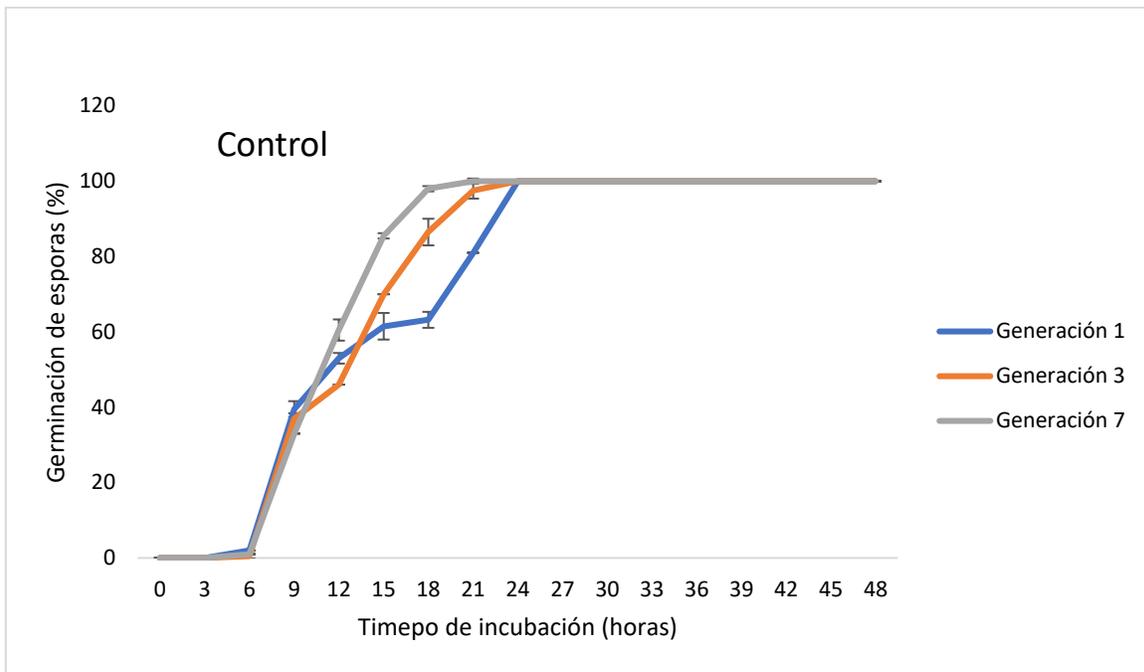


Figura 6. Porcentaje de germinación de esporas de *F. verticillioides* incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* a diferentes tiempos de incubación.

A los datos obtenidos de porcentaje de germinación de las esporas de *F. verticillioides* se les realizó un análisis aplicando un modelo logístico para estimar la velocidad de germinación de las esporas de las diferentes generaciones y sus respectivos controles (Tabla 4). El proceso de crecimiento puede expresarse por la constante de velocidad de crecimiento (k). Equivale al número de generaciones por unidad de tiempo, expresado a menudo como generaciones por hora (Prescott *et al.*, 2002).

En la tabla 4 se puede observar que las esporas de *F. verticillioides* sin tratamiento antifúngico (control) de la generación 1 (semana 1) obtuvo una k de 0.23, es decir, germinaron el 0.23 % de esporas por hora. Sin embargo, el extracto antifúngico de *J. macrocarpa* afectó considerablemente en la velocidad de germinación las esporas obteniendo una k de 0.15, existiendo una diferencia entre ambas velocidades de 0.08. En la generación 3 (semana 3) la diferencia entre la k del control y la del tratamiento (0.33 y 0.29, respectivamente) es menor, 0.04. Es decir, hubo una menor afectación del tratamiento con la fracción antifúngica en esta generación comparado con el efecto causado durante la generación 1, lo cual concuerda con los resultados de los análisis de crecimiento radial, en donde se observa una recuperación del crecimiento radial durante la generación 3. Sin embargo, durante la generación 7, en donde se esperaría una diferencia del valor k , entre el control y el tratamiento con la fracción antifúngica, igual o menor a la generación 3, la diferencia fue de 0.11, mayor que en las generaciones 1 y 3. Es decir, el valor k de esta generación de esporas fue más afectada por *J. macrocarpa* que las generaciones anteriores.

Otros autores han evaluado el efecto de diferentes tipos de compuestos bioactivos sobre el valor k para la germinación de esporas fúngicas y algunos de esos compuestos han mostrado un efecto de retraso en la tasa de germinación de las esporas (López-Meneses *et al.*, 2015, Rosas-Burgos *et al.*, 2011).

Tabla 4. Constante de velocidad (k) de la germinación de esporas de *F. verticillioides* incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* en diferentes generaciones.

| Tratamiento | k | $k_c - k_{Jm}$ | R |
|----------------------|---------|----------------|--------|
| Generación 1 | | | |
| Control | 0.23047 | 0.0793 | 0.9795 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.15117 | | 0.9898 |
| Generación 3 | | | |
| Control | 0.33836 | 0.04519 | 0.9925 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.29317 | | 0.9966 |
| Generación 7 | | | |
| Control | 0.48304 | 0.11681 | 0.9980 |
| <i>J. macrocarpa</i> | 0.36623 | | 0.9967 |

k_c = Constante de velocidad de la germinación de esporas en medio control.

k_{Jm} = Constante de velocidad de la germinación de esporas tratadas con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

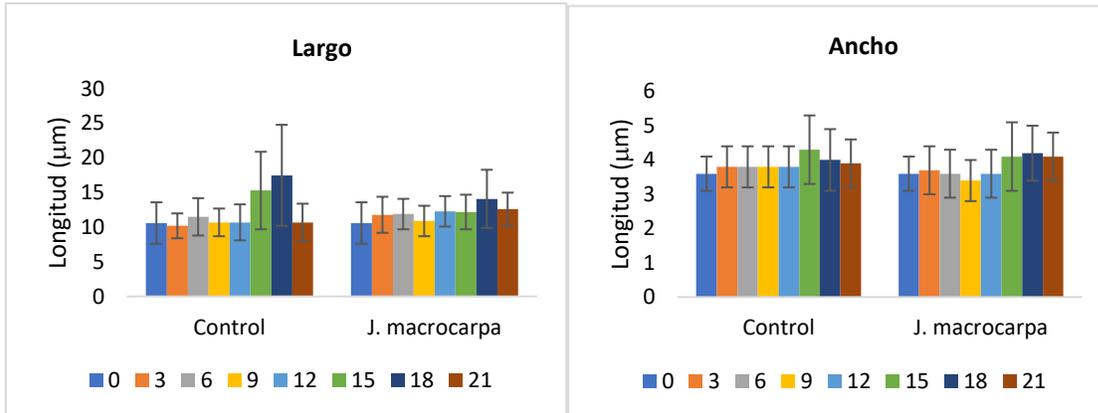
Dimensiones de Esporas

En la figura 7 se puede observar las dimensiones del largo y ancho de esporas de las distintas generaciones de *F. verticillioides* sin tratamiento antifúngico y tratado con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, a diferentes tiempos de incubación. De acuerdo con el análisis estadístico de los datos llevado a cabo, no se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el promedio de todos los valores del control y el tratamiento con *J. macrocarpa*, tanto para lo largo como para lo ancho, de las esporas de las diferentes generaciones (Tabla 5). Valenzuela-Cota *et al.* (2014) reportaron que tanto el largo como el ancho las esporas de *F. verticillides* no se vio afectado al ser expuestas a *J. macrocarpa*. Estos autores también estudiaron el mismo efecto sobre esporas de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* en donde el antifúngico causó una reducción del tamaño. En general, Los valores del tamaño de esporas del hongo expuesto a la fracción antifúngica observadas en el presente estudio fueron más altos que el informado por el estudio mencionado anteriormente. Durante las observaciones microscópicas se pudieron apreciar algunas esporas hinchadas y deformes (Figura 8).

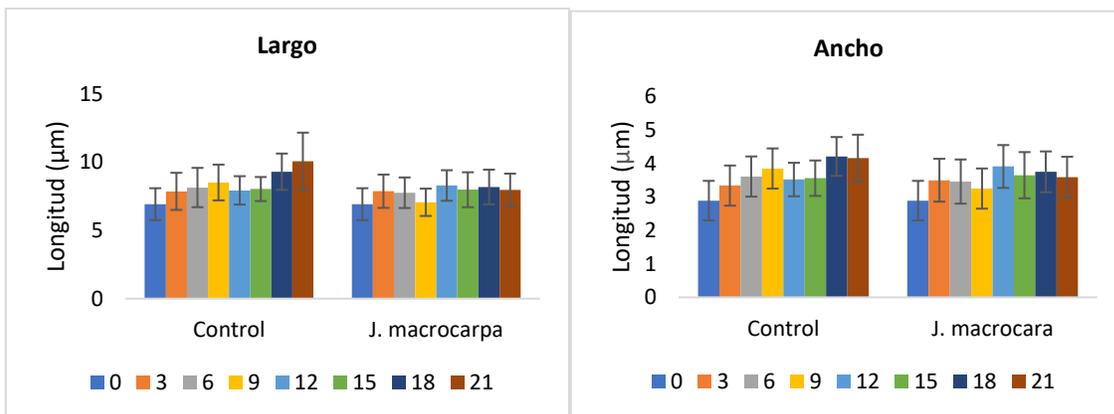
Dimensiones de Hifas

En la tabla 6 se pueden observar las dimensiones de largo y ancho de las hifas apicales de varias generaciones de *F. verticillioides* desarrolladas después de 7 días de incubación en medio Czapek conteniendo la CMI₅₀ de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*. Las hifas apicales mostraron una reducción en longitud en la primera, tercera y séptima generación del 10 %, 51 % y 27 %, respectivamente, así como una reducción del ancho del 2.4 %, 31.3 % y 20.1 %, respectivamente. La longitud y el ancho de las hifas apicales del hongo tratados con *J. macrocarpa* no mostraron diferencias significativas al comparar la generación 1 con la generación 3, sin embargo, tanto la longitud como el ancho de las hifas se observaron de mayor tamaño en la generación 7. Los resultados de este análisis sugieren un incremento del efecto sobre la longitud de las hifas apicales de la generación 1 a la 3, pero una recuperación del crecimiento en la generación 7.

Generación 1



Generación 3



Generación 7

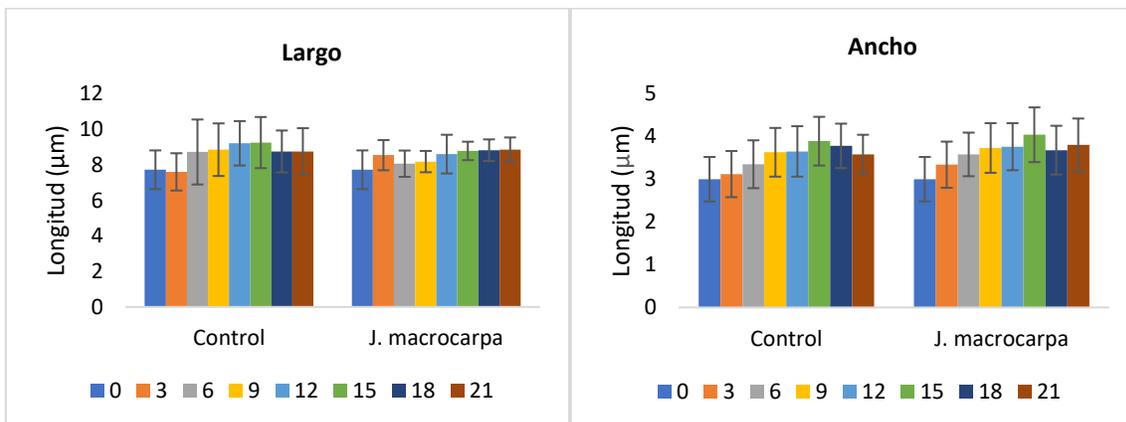


Figura 7. Dimensiones del largo y ancho de esporas de *F. verticillioides* incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, de las distintas “generaciones”. Los colores de las barras indican el tiempo de incubación (horas).

Tabla 5. Dimensiones (μm) promedio de largo y ancho de esporas de *F. verticillioides* incubado en caldo czapek (control) y en caldo czapek adicionado con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* a diferentes tiempos de incubación.

| Tratamiento | Ancho (μm) | Largo (μm) |
|----------------------|---|---|
| Generación 1 | | |
| Control | 3.87 \pm 0.22 ^a | 12.14 \pm 2.70 ^a |
| <i>J. macrocarpa</i> | 3.78 \pm 0.31 ^a | 12.26 \pm 0.91 ^a |
| Generación 3 | | |
| Control | 3.64 \pm 0.43 ^a | 8.34 \pm 0.95 ^a |
| <i>J. macrocarpa</i> | 3.53 \pm 0.24 ^a | 7.77 \pm 0.46 ^a |
| Generación 7 | | |
| Control | 3.50 \pm 0.31 ^a | 8.60 \pm 0.62 ^a |
| <i>J. macrocarpa</i> | 3.68 \pm 0.21 ^a | 8.51 \pm 0.30 ^a |

Los valores con letras en superíndice iguales, entre una misma generación y en cada columna, indican que los valores no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

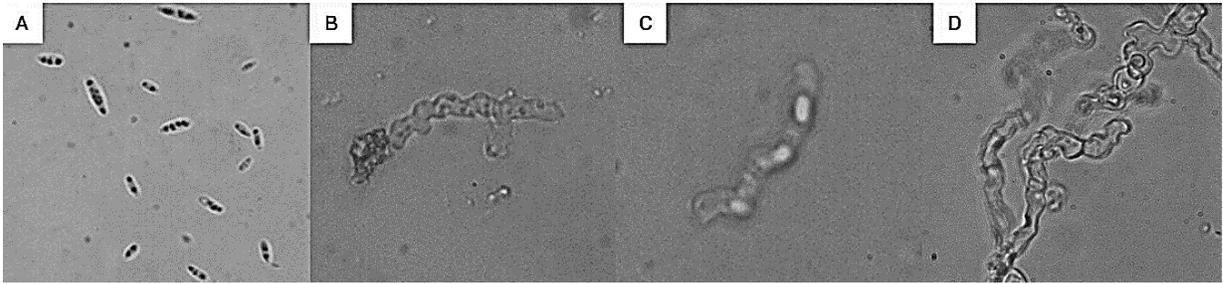


Figura 8. Esporas de *F. verticillioides* incubado en caldo czapek a las 21 horas, A: control, B-D: adicionado con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

Tabla 6. Dimensiones de hifas apicales de *F. verticillioides* determinadas a las 168 h de incubación expuesto a una fracción antifúngica de *J. macrocarpa* en diferentes generaciones.

| Generación | Dimensiones (μm) | | | | Reducción (%) | |
|------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------|-------|
| | Control | | <i>J. macrocarpa</i> | | Longitud | Ancho |
| | Longitud | Ancho | Longitud | Ancho | | |
| 1 | 11.7 \pm 1.2 ^c | 1.6 \pm 0.1 ^b | 10.5 \pm 2.5 ^b | 1.6 \pm 0.3 ^b | 10.4 | 2.3 |
| 3 | 24.1 \pm 7.6 ^b | 2.3 \pm 0.8 ^a | 11.6 \pm 1.7 ^b | 1.6 \pm 0.1 ^b | 51.9 | 31.3 |
| 7 | 25.3 \pm 8.3 ^a | 2.6 \pm 0.4 ^a | 18.5 \pm 1.3 ^a | 2.1 \pm 0.0 ^a | 27.2 | 20.2 |

Los valores con letras en superíndice iguales en cada columna indican que no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Es posible que la reducción de la longitud de las hifas y las claras deformaciones en las esporas del hongo utilizado en este estudio hayan sido debidas a la pérdida de integridad de la pared celular. Por consiguiente, la permeabilidad de la membrana plasmática podría verse afectada, lo que podría explicar los cambios en la morfología y el tamaño de las esporas e hifas.

Actividad β -1,3-glucanasa

En la tabla 7 se puede observar el contenido proteico y la actividad glucanasa específica de los extractos proteicos obtenidos de *F. verticillioides* tratados con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* de las distintas generaciones. De acuerdo al análisis estadístico, los valores de actividad glucanasa específica de las generaciones 1 y 3 son iguales, mientras que los valores de la generación 7 son mayores. La inhibición de la actividad glucanasa (%) se calculó comparando la actividad glucanasa de un extracto proteico de *F. verticillioides* sin tratamiento antifúngico con la actividad glucanasa de los extractos proteicos obtenidos de los hongos de las diferentes generaciones expuestos a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

Como se puede observar, durante la primera generación de hongos, la actividad glucanasa es más inhibida ($P < 0.05$), mientras que en las generaciones posteriores la fracción antifúngica produce una menor inhibición de la actividad glucanasa, siendo durante la última generación en donde se observa el menor efecto inhibitorio, es decir, la mayor actividad glucanasa. Es también evidente que la fracción antifúngica posee la capacidad de inhibir la actividad de un enzima comercial β -1,3-glucanasa (Figura 9).

Buitimea-Cantúa *et al.* (2013) reportaron una reducción del 17.6 % de la actividad glucanasa de extractos proteicos de *F. verticillioides* tratados con una fracción antifúngica de *J. macrocarpa*. Estos investigadores también evaluaron el efecto sobre la actividad glucanasa de *F. verticillioides* tratados con una fracción antifúngica de *Baccharis glutinosa*, obteniendo una inhibición del 23.4 %. Por otra parte, Vargas-Arispuro *et al.* (2009) reportaron alta inhibición de la actividad glucanasa fúngica con

Tabla 7. Contenido proteico y actividad glucanasa específica de extracto proteico de *Fusarium verticillioides* de distintas generaciones expuestas a una fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

| Generación | Contenido proteico (mg/mL) | Actividad glucanasa (U/mg proteína) | Inhibición de la actividad glucanasa (%) |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| 1 | 1.31±0.10 ^a | 0.07±0.00 ^b | 36.4 |
| 3 | 1.34±0.20 ^a | 0.08±0.01 ^b | 20.0 |
| 7 | 1.42±0.19 ^a | 0.11±0.02 ^a | 3.5 |
| β-1,3- glucanasa comercial* | | 0.07±0.01 ^b | 34.6 |

Los valores son medias de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, donde valores con diferente letra indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) ± desviación estándar.

*β-1,3-glucanasa comercial tratada con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

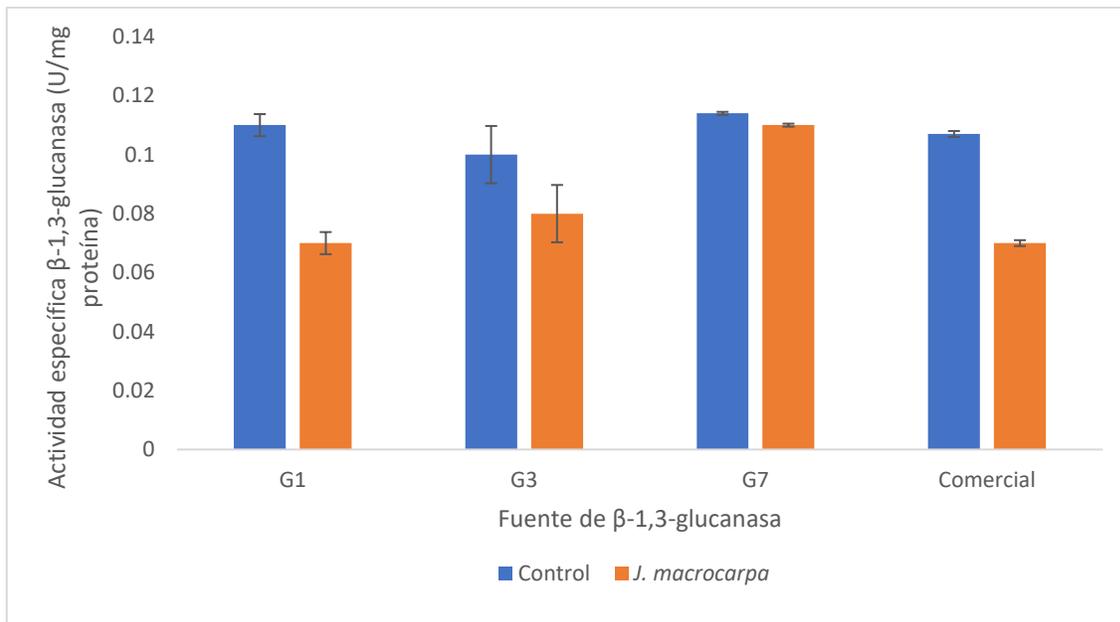


Figura 9. Actividad específica β -1,3-glucanasa determinada en extractos proteicos de *F. verticillioides* de diferentes generaciones expuestos o no (control) a una fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

extractos antifúngicos de las plantas *Larrea tridentata*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ambrosia ambrosioides*, *Melia azederach* y *Encelia farinosa*.

Estos resultados coinciden con los obtenidos tanto en la determinación de la inhibición del crecimiento radial como en la inhibición de la germinación de esporas, es decir, la generación 1 tratada con la fracción de *J. macrocarpa* es la generación con mayor inhibición del crecimiento radial, la que presenta un mayor retraso en la germinación de sus esporas y también la que su actividad glucanasa fue más inhibida. En tanto que en las generaciones 3 y 7 la inhibición del crecimiento radial es menor, así como menor es el retraso en la germinación de las esporas y la inhibición de la actividad glucanasa.

Los resultados obtenidos sugieren que el efecto que la fracción antifúngica ocasiona en el hongo, lo cual inhibe su crecimiento, se ve disminuido a través del tiempo cuando el hongo es expuesto constantemente a dicha fracción, sin embargo, aunque en menor medida, los efectos permanecen. Aparentemente, el hongo implementa algún mecanismo por el cual recupera, en cierta medida, su capacidad de desarrollarse en presencia del antifúngico evaluado.

CONCLUSIONES

Algunas características de desarrollo y estructurales de *F. verticillioides* (crecimiento radial y germinación de esporas, así como el tamaño de hifas apicales) decrecieron cuando el hongo fue expuesto a una fracción antifúngica de la planta *J. macrocarpa*. Sin embargo, cuando la exposición a la fracción antifúngica fue constante, el hongo mostró la capacidad de recuperar esas características en determinado grado. No obstante, el crecimiento del hongo continuó siendo inhibido considerablemente.

De igual forma, una característica fisiológica del hongo como es la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa, la cual fue afectada en presencia de la fracción antifúngica *J. macrocarpa*, se recuperó en cierta medida cuando la exposición del hongo al antifúngico se prolongó durante varios periodos. Dado que la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa es indispensable para la correcta formación de la pared celular de los hongos, al ser inhibida pudo ocasionar la formación de una pared celular débil, causando la inhibición del micelio del hongo. No obstante, es posible que la pared celular de *F. verticillioides*, afectada, se haya recuperado hasta un determinado punto y, en consecuencia, se haya desarrollado de nuevo el hongo.

Es posible que *F. verticillioides* active mecanismos de resistencia en el cual los metabolitos producidos por el extracto antifúngico de *J. macrocarpa*, sean suprimidos o evadidos, facilitando, de nuevo, el desarrollo del hongo.

RECOMENDACIONES

Confirmando estudios anteriores, el extracto de *J. macrocarpa* constituye un método viable para el control de *F. verticillioides*, lo cual representa una alternativa natural al empleo de agentes químicos sintéticos. A pesar de ello, los resultados de este estudio sugieren su uso potencial hasta cierto punto, ya que el hongo podría adquirir resistencia al estar en constante contacto con el extracto.

Es importante determinar que otros sitios de la pared celular, así como que otros componentes de la célula (membrana y núcleo) de *F. verticillioides* están siendo afectados por las fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa*, para evidenciar los mecanismos de resistencia de los hongos a los compuestos antifúngicos obtenidos de plantas.

REFERENCIAS

- Allevato, M., Negroni, R., Galimberti, R. (2007). *Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. Act Terap Dermatol* 2007; 30: 8. Buenos Aires, Argentina.
- Anderson B.S., Hunt J.W., Phillips B.M., Nicely P.A., Vlaming V., de Connor V., Richard N., Tjeerdema R.S. 2003. *Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). Environmental Pollution*, 124: 523-532.
- Andrade-Bustamante, G. García-López, A.M. Cervantes-Díaz, L. Aíl-Catzim, C.E. Borboa-Flores, J. Rueda-Puente, E.O. 2016. *Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: control de fitopatógenos. Plantas autóctonas del desierto vs. Fitopatógenos. Rev. FCA UNCUYO*. 2017. 49(1): 127-142. ISSN impreso 0370-4661.
- Anjisha, R.M. Vrinda, S.T. 2012. *Growth and Development of Plant Pathogenic Fungi in Define Media. European Journal of Experimental Biology*, 2012, 2 (1):44-54.
- Arif, T. Bhosale, J.D. Kumar, N. Mandar, T.K. Bendre, R.S. Lavekar, G.S. Dabur, R. 2009. *Natural products--antifungal agents derived from plants. J Asian Nat Prod Res*. 2009 Jul;11(7):621-38. doi: 10.1080/10286020902942350.
- Backhouse, D., L. W. Burgess, and B. A. Summerell. 2001. *Biogeography of Fusarium. In: Summerel, B. A. (ed). Fusarium. APS Press. St. Paul Minn. USA. pp: 122-123.*
- Borrel-Sole, N. (2002). *NUEVOS ANTIFÚNGICOS: EQUINOCANDINAS. Control Calidad SEIMC.*
- Bradford, M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Buitimea-Cantúa G.V., Rosas-Burgos E.C., Cinco-Moroyoqui F.J., Burgos-Hernández A., Plascencia-Jatomea M., Cortez-Rocha M., Ruiz-Gálvez J.C. 2013. *In vitro effect of antifungal fractions from the plants Baccharis glutinosa and Jacquinia macrocarpa on chitin and β -1,3-glucan hydrolysis of maize phytopathogenic fungi and on the fungal β -1,3-glucanase and chitinase activities. Journal of Food Safety*, 33(4): 526-534.

- CESAVEG. 2011. *Manual de Plagas y Enfermedades en Maíz. Guanajuato.*
- CIMMYT. 2004. *Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Mexico: Cuarta edición.*
- Clark T., Anderson J.B. 2004. *Dikaryons of the basidiomycetes fungus Schizophyllum commune: evolution in long-term culture. Genetics, 167: 1663-1675.*
- Codex alimentarius. 2000. *COMITÉ DEL CODEX SOBRE ADITIVOS ALIMENTARIOS Y CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS.*
- Codex alimentarius. 2015. *NORMA GENERAL PARA LOS CONTAMINANTES Y LAS TOXINAS.*
- Comite Nacional Sistema Producto - Oleaginosas. (2008). *Alternativas para el Desarrollo.*
- CONABIO. (29 de octubre de 2018). CONABIO. Obtenido de ENCICLO VIDA: <http://enciclovida.mx/especies/198797-jacquinia-macrocarpa>.
- Cooke D.E.L., Young V., Birch P.R.J., Toth R., Gourelay F., Day J.P., Carnegie S.F., Duncan J.M. 2003. *Phenotypic and geotypic diversity of Phytophthora infestans populations in Scotland (1995-97). Plant Pathology, 52: 181-192.*
- Davet P., Rouxel F. 2000. *Detection and isolation of soil fungi. U.S.A.: Science Publisher Inc.*
- Davicino, R., Aída, M., Casali, A., Correa, S., Pettenati, E., Micalazzi, B. (2007). *Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Herbario, Universidad Nacional de San Luis, Ejército de los Andes 950, 5700 San Luis, Argentina.*
- Deras-Flores, H. 2010. *Guía Técnica El cultivo del maíz. El Salvador.*
- Domingo, D. Lopez-Brea, M. 2003. *Plantas con acción antimicrobiana. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid.*
- ELIKA. 2013. *Fumonisin. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria.*

FAO. 2013. Norma para el maíz. CODEX STAN 153-1985.

FAO. 2018. Codex alimentarius. Obtenido de Índice de plaguicidas: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/es/>

Ferrer, A. 2003. Intoxicación por metales. Anales Sis San Navarra vol.26 supl.1 Pamplona.

FIRA. 2016. Panorama Agroalimentario.

Food quality. 2010. Microorganismos y alimentos. Education and Culture.

Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Poulos, P.G. 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. International Journal of Food Microbiology.

Harris S.D. 1999. Morphogenesis is coordinates with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. Microbiology, 145: 2747–2756.

Herrera, T., Ulloa, M. (2013). El Reino De Los Hongos. Micología Básica Y Aplicada (Ciencia y Tecnología). Fondo de Cultura Económica; Edición: 2.

ILSI Argentina. 2006. Maíz y Nutrición. Argentina: Serie de Informes Especiales.

INEGI. 1997. El maíz en el estado de México. Aguascalientes.

Jobling J. 2000. Essential Oils: a new idea for postharvest disease control. Good Fruit Vegetables Magazine, 11: 50.

Lacey, L. 1989. Pre and post harvest ecology of fungi causing spoiling of foods and other stored products. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. pp: 11-25.

Larralde C.C., López L.F. Viniegra G.G. 1997. Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. Biotechnology and Bioengineering, 56: 287-294.

Leonor, C. 2003. Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-16-5.

- Leroux P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 9-21.
- Li Y.Z., Zheng X.H., Tang H.L., Zhu J.W., Yang J.M. 2003. Increase of β -1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae*. *Acta Bot. Sin.* 45: 802-808.
- López-Meneses, A.K. Plascencia-Jatomea, M. Lizardi-Mendoza, J. Rosas-Burgos, E.C. Luque-Alcaraz, A.G. Cortez-Roche, M.O. 2015. *Food Sci. Technol, Campinas*, 35(4): 664-671.
- Maestre, J.R., Alou, L. 2001. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Revista Española de Quimioterapia*. Septiembre; Vol. 14, No.3. Recuperado el 19 de septiembre del 2016 de: http://seq.es/seq/html/revista_seq/0301/rev1.html
- Medina-Lopez, C. F., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Yepiz-Gomez, M. S., Cortez-Rocha, M. O., & Rosas-Burgos, E. C. (2016). Potentiation of antifungal effect of a mixture of two antifungal fractions obtained from *Baccharis glutinosa* and *Jacquinia macrocarpa* plants. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*.
- Mendez, L. (2015). *Aspergilosis*. Departamento de microbiología y parasitología. UNAM.
- Meruane, C., y Garreaud, R. 2015. *Determinación de Humedad en la Atmósfera*. Universidad de Chile.
- Mesa-Arango, A., Bueno-Sanchez, J., y Betancur-Galvis, L. (2004). *Productos naturales con actividad antimicótica*. Colombia: Rev Esp Quimioterap.
- Ministerio de Agricultura de España. (2015). *Productos y tratamientos recomendados para el tratamiento de las enfermedades del cereal*. Madrid: Navarra Agraria 180.
- Momany M., Taylor I. 2000. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology*, 146 (12): 3279-84.

Monzon, A., y Rodriguez Tudela, J. (2000). *INFECCIONES CAUSADAS POR EL GÉNERO Fusarium. Control Calidad SEIMC.*

Moreno-Salazar SF, Robles-Zepeda RE, Johnson DE (2008) Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia* Volume 79, Issue 2, February 2008, Pages 132-141.

Pontón J., Qundós G. 2006. *Mecanismos de Resistencia a la terapéutica antifúngica. Medicina Clínica, 126 (supl 1): 56-60.*

Ponton, J., Quindos, G. (2006). *Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco. Bilbao. Vizcaya. España.*

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2002. *Microbial nutrition, growth, and control. Microbiology. Boston: McGraw-Hill.*

Ramírez-Legarreta M.R., Jacobo-Cuéllar J.L. 2002. *Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 20: 168-173.*

Ríos, N., Medina, G., Jimenez, J., Yanez, C., Garcia, M., Di-Bernardo, M., y Gualtieri, M. 2009. *Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas. Rev. peru. biol.*

Rosas-Burgos E.C., Cortez-Rocha M.O., Cinco-Moroyoqui F.J., Robles-Zepeda R.E., López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Lares-Villa F. 2009. *Antifungal activity in vitro of Baccharis glutinosa and Ambrosia confertiflora extracts on Aspegillus flavus, Aspergillus parasiticus and Fusarium verticillioides. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(12): 2257-2261.*

Rosas-Burgos E.C., Cortez-Rocha M.O., Plascencia-Jatomea M., Cinco-Moroyoqui F.J., Robles-Zepeda R.E., López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Lares-Villa, F. 2011. *The effect of Baccharis glutinosa extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(5): 1025-1033.*

Ruiz-Herrera, J. 2001. *El asombroso reino de los hongos. Avance y Perspectiva vol. 20.*

Santamaria, L., & Ureta, J. C. 2004. ¿Qué son los fungicidas? *The Plant Health Instructor*.

SENASA. 2007. Concentración de residuo de un plaguicida legalmente permitido, en productos y subproductos de la agricultura.

Suárez-Jiménez G.M., Cortez-Rocha M.O., Rosas-Burgos E.C., Burgos-Hernández A., Plascencia-Jatomea M. Cinco-Moroyoqui, F.J. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb, and fumonisin B₁ production. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 25: 134-142.

Thompson, L. (2002). Antifúngicos. *Rev. chil. infectol.*

Torre-Hernandez, M. E., Plascencia de la Parra, J., Galeana-Sanchez, E., y Sanchez-Rangel, D. 2014. Fumonisin –síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*.

Torres-Sanchez, L., y Lopez-Carrillo, L. 2010. Consumo de fumonisin y daños a la salud humana. *Salud pública Méx.*

Tuttle McGrath, M. (2004). ¿Qué son los fungicidas? *Cornell University*.

UNEP. 2004. *Childhood pesticide poisoning. Information for Advocacy and Action. United Nations Environment Program. Châtelaine, Suiza. 36 pp.*

Valenzuela-Cota, D.F., Buitimea-Cantúa, G.V, Rosas-Burgos, E.C., Cinco-Moroyoqui, F.J., Yépiz-Gómez, M.S., Cortez-Rocha, M.O., Plascencia-Jatomea, M., Burgos-Hernández, A. 2014. The antifungal effect of *Jacquinia macrocarpa* plant on the growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *Revista Mexicana de Micología*, 39:1-11.

Vandeputte P., Ferrari S., Coste A.T. 2011. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012: 1-26.

Vargas-Arispuro I., Contreras-Valenzuela A., Martínez-Téllez. 2009. Lignans from *Larrea tridentata* (creosote bush) as fungal β -1,3-glucanase inhibitors. *Pestic. Biochem. Physiol*, 94: 60-63.

Varon de Agudelo, F., y Sarria-Villa, G. 2007. *Enfermedades del maíz y su manejo. Colombia: produmedios.*

Vega-Ortiz, V. 2012. Hongos Micotoxigénicos y Aflatoxinas en Granos de Maíz de Diferentes Origenes Geograficos de la República Mexicana.

Weinberg, J. 2006. Guía para las ONG sobre los plaguicidas peligrosos y el SAICM.

Whalen M.M., Wilson S., Gleghorn C., Loganathan B.G. 2003. Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. Environmental Research, 92: 213-220.

Yutaka, K. 2007. Guía del Manejo Integrado de Plagas (MIP) para técnicos y productores. Ecuador: JICA.

ANEXOS

ANEXO A

Determinación de proteína mediante el kit BCA de Thermo Scientific™ Pierce™

El ensayo de proteínas BCA de Thermo Scientific™ Pierce™ es una formulación a base de ácido bicinquinico (BCA) para la detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales. Este método combina la conocida reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en un medio alcalino (la reacción de biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{+1}) que utiliza un reactivo único que contiene ácido bicinquinico. El producto de reacción de color púrpura de este ensayo es formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. Este complejo soluble en agua exhibe una absorbancia a 562 nm que es casi lineal con concentraciones crecientes de proteínas en un amplio rango de trabajo (20-2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

Preparación de reactivo de trabajo

1. Preparar el reactivo de trabajo mezclando 50 partes de BCA Reactivo A con 1 parte de B
2. Pipetear 25 μL de cada muestra en un pocillo de microplaca
3. Agregar 200 μL de reactivo de trabajo a cada pocillo y mezclar bien la placa en un agitador de placas durante 30 segundos.
4. Cubrir la placa e incubar a 37 ° C durante 30 minutos.
5. Enfriar la placa a temperatura ambiente.
6. Medir la absorbancia en o cerca de 562nm en un lector de placas.
7. Comparar con curva estándar

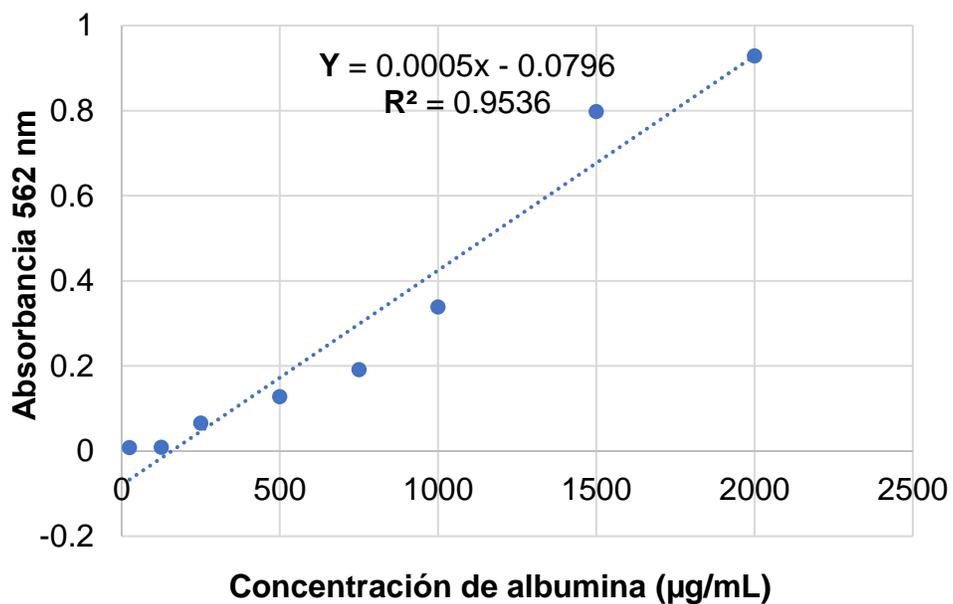


Figura 1. Curva estándar realizada de albúmina de suero bovino

ANEXO B

Determinación de Azúcares Reductores por el Reactivo de Somogyi y Nelson

En un tubo de ensayo aforado colocar 0.5 mL de reactivo de Somogyi y 0.5 mL de la solución estudiar (solución de glucosa entre 20 y 180µg/mL). Incubar esta mezcla durante 40 minutos en un baño de agua en ebullición. Enfriar la solución y añadir 0.5 mL de reactivo del Nelson agitando suavemente y completar con agua hasta 5 mL. Medir la absorbancia en una celda de 1 cm de ancho a la longitud de onda de 610 nm usando agua destilada como blanco (González y Castellanos, 2003).

Preparación de reactivos

Reactivo de Somogyi

Preparación reciente, colocar 4 mL de la solución B en un matraz aforado de 100 mL, y completar con la solución A y mezclar. Solución A: Disolver 50 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3 anh.), 50 g de sal Rochelle, 40 g de bicarbonato de sodio y 400 g de sulfato de sodio anhidro en 1600 mL de agua destilada, y diluir a 2000 mL. Mezclar y filtrar la solución si no queda clara. Almacenar a temperatura ambiente. Y si se forman sedimentos a los pocos días, filtrar nuevamente. Solución B: Disolver 150 g de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y diluir a 1000 mL. Adicionar 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y mezclar.

Reactivo de Nelson

Mezclar 25 g de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) en 450 mL de agua destilada, 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 0.6 g de arsenato monoácido de sodio ($\text{H}_2\text{Na}_3\text{AsO}_6$) en 25 mL de agua destilada. Llevar a volumen de 500 mL e incubar a 37°C por 24-48 horas. Almacenar en recipiente ámbar.

Es esencial el correcto manejo de las sustancias químicas que se manipulan para evitar accidentes ya que el contacto continuo puede irritar la piel, ser nocivos en caso de ingestión y algunas sustancias pueden ser altamente inflamables y tóxicos.

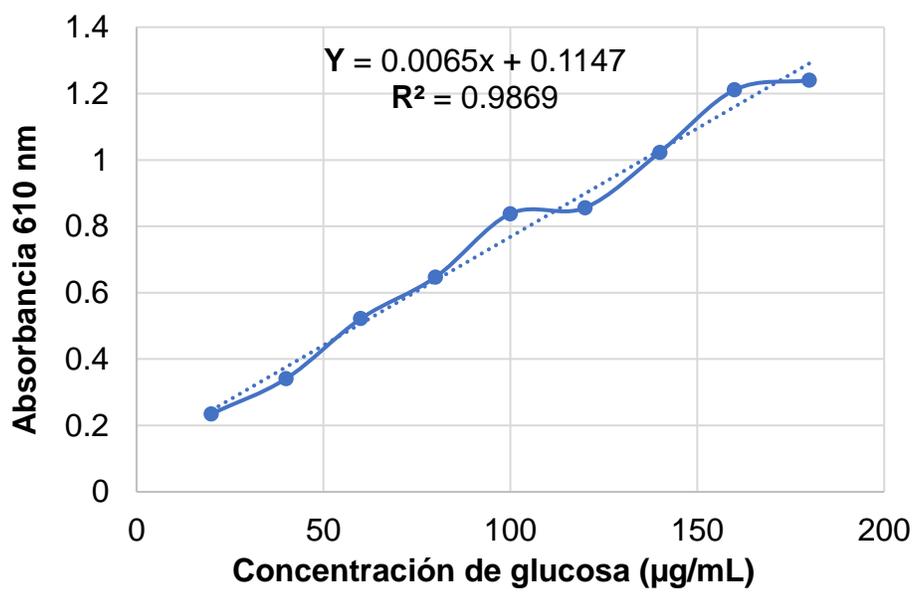


Figura 2. Curva estándar realizada de glucosa