



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**APLICACIÓN DE LACTOFERRINA BOVINA COMO INHIBIDOR
DEL CRECIMIENTO DE FUSARIUM VERTICILLIOIDES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

Ricardo Ramírez Mondragón

**ASESOR: DR. JUAN OMAR HERNÁNDEZ RAMÍREZ
COASESORES: DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA AMAYA
MC. GERARDO ALBERTO RAMÍREZ RICO**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México (FES CUAUTILÁN) 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**UNAM
FES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
DE LA FES CUAUTITLÁN**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Aplicación de lactoferrina bovina como inhibidor del crecimiento de Fusarium verticillioides

Que presenta el pasante: **Ricardo Ramírez Mondragón.**

Con número de cuenta: 312097699 para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Mayo de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
VOCAL	Dr. Juan Carlos del Río García	
SECRETARIO	Dr. Juan Omar Hernández Ramírez	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Yesica Virginia Torres Durán	

Agradecimientos.

A mi familia en general: Gracias por soportarme estos últimos 2 años que he trabajado en este proyecto, sé que no he sido alguien fácil de tolerar, sin ustedes no lo habría terminado.

A mi madre: Las palabras no pueden expresar lo agradecido que me siento con tu apoyo y amor incondicional, me has apoyado en cada decisión y no me dejas olvidar lo capaz que puedo llegar a ser. Agradezco todas tus enseñanzas e influencias ya que me motivaron a continuar y terminar de estudiar esta profesión, gracias a que me inculcaste una gran curiosidad y amor por los animales es que no me he vuelto completamente loco y disfruto de trabajar y vivir.

A mi padre: Siempre has sido la mayor fuente de aprendizaje y experiencia, nunca te has negado a compartirme nada, agradezco todo tu apoyo, palabras y enseñanzas, ya que son base de la persona que soy hoy en día, siempre has sido de mis mayores ejemplos y modelos a seguir. Agradezco tu gran influencia y motivación, desde pequeño me has incitado a intentar destacar en los estudios, pero sobre todo a disfrutar de mis actividades, que si no ¿qué sentido tendrían?

A mi hermano: A lo largo de nuestra vida como bien lo sabes, nuestros padres siempre influenciaron que tu fueras un ejemplo mío, quizás ese no era tu principal deseo al tener un hermano, pero debo decirte que, aunque no lo creas hiciste un gran trabajo, fuiste una gran influencia al decidir estudiar una carrera del área médica y no solo eso, has sido un gran ejemplo de trabajo, esfuerzo y dedicación, agradezco que compartamos padres y que seas una gran fuente de apoyo en mi vida.

A mi asesor: Agradezco toda su paciencia y tolerancia, tanto sus enseñanzas respecto a temas académicos como a situaciones de vida, es una gran persona, lo admiro tanto de manera profesional como personal, es un gran ejemplo, agradezco todo su apoyo, sus consejos y sus charlas, sobre todo aquellas de temas científicos y ficticios, agradezco la oportunidad de trabajar con un científico tan apasionado como usted, aunque sobre todo agradezco contar con su amistad.

A mis co-asesores: Agradezco el tiempo, la atención, las recomendaciones y las observaciones tanto a mi persona como las realizadas para este proyecto, agradezco infinitamente su paciencia y la oportunidad de poder trabajar con científicos ejemplares como son ustedes.

A mi pareja: Me has acompañado en los mejores y peores partes de este camino, agradezco todo lo que me has escuchado, el consuelo, la motivación, los consejos, todo lo que me has ofrecido, agradezco toda tu paciencia y tolerancia durante el tiempo que estuve trabajando, fuiste una gran fuente de inspiración y motivación, agradezco las veces que me hiciste compañía en el laboratorio, le diste un sabor especial a esos días, agradezco que aún sigas en mi vida no habría logrado esto sin tu apoyo Diana.

A mis amigos: Es difícil mencionar a todos los que quisiera, creo que los más importantes sabrán de antemano lo agradecido que estoy con ellos por haberme alentado a terminar y por haberme ayudado a distraerme o despejarme en los momentos necesarios, o darme apoyo moral, si he de mencionar a alguien creó sería a mi buen amigo Miguel, agradezco que me hayas convencido de estudiar veterinaria, conocí grandes personas, grandes maestros y conseguí trabajo todo en el mismo lugar, pero sobre todo te agradezco que hayamos pasado este viaje juntos, que pronto llegarás también a la meta.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	4
2.	INTRODUCCIÓN	5
2.1	Deterioro de granos y semillas	6
2.2	Condiciones generales, factores bióticos y abióticos en el deterioro de granos y semillas..	6
2.3	Hongos	8
2.4	Clasificación taxonómica de los hongos	9
2.5	Relación Hongos – Micotoxinas.....	10
2.6	Historia de las micotoxinas.....	11
2.7	Micotoxinas	11
2.8	Prevención y control de hongos y micotoxinas en campo.....	12
2.9	Características y taxonomía del Género <i>Fusarium</i>	14
2.9.1	Ciclo biológico de <i>Fusarium</i>	16
2.10	<i>Fusarium verticillioides</i>	17
2.11	Fumonisinias	19
2.12	Bicarbonato de amonio	20
2.13	Ácido acético glacial	21
2.14	Lactoferrina	21
3.	JUSTIFICACION.....	25
4.	HIPOTESIS.....	26
5.	OBJETIVOS	27
5.1	General.....	27
5.2	Particulares.....	27
6.	METODOLOGIA.....	28
6.1	Diseño experimental	28
6.2	Preparación medios de cultivo	28
6.3	Preparación solución de esporas de <i>F. verticillioides</i>	29
6.4	Inoculación de <i>F. verticillioides</i> en medio líquido	30
6.5	Inoculación de <i>F. verticillioides</i> en grano de maíz	30
6.6	Lectura en medio líquido.....	31
6.7	Lectura en grano de maíz	31
6.8	Pruebas de viabilidad	32

7.	RESULTADOS	33
7.1	Curva de producción de esporas CPD.....	33
7.2	Tratamiento Lfb 1.8 μ M CPD	34
7.3	Tratamiento BA 10 % CPD	35
7.4	Tratamiento AAG 10 % CPD.....	36
7.5	Tratamiento Lfb 1.4 μ M + BA 10 % CPD	37
7.6	Tratamiento Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % CPD.....	38
7.7	Curva de producción de esporas de <i>F. verticillioides</i> GM	39
7.8	Tratamiento Lfb 3 μ M GM.....	40
7.9	Tratamiento BA 10 % GM	41
7.10	Tratamiento AAG 10 % GM	42
7.11	Tratamiento Lfb 2 μ M + BA 10 % GM	43
7.12	Tratamiento Lfb 2 μ M + AAG 10 % GM	44
7.13	Tratamientos en CPD compilados	45
8.	DISCUSIÓN	51
9.	CONCLUSIONES	55
10.	REFERENCIAS.....	56

1. RESUMEN

Fusarium verticillioides es uno de los principales hongos que infecta al maíz, produce micotoxinas que impactan de forma negativa la salud animal y humana. Como medida de prevención y control, se han usado fungicidas como las sales de bicarbonato de amonio y el ácido acético, sin embargo, el problema persiste, el uso de Lactoferrina bovina (Lfb) podría ser una nueva alternativa; la Lfb es una proteína que secuestra iones libres de hierro se ha demostrado que puede inhibir el crecimiento de agentes microbianos, incluyendo hongos. Se evaluó el efecto de lactoferrina bovina, sales de bicarbonato de amonio (BA), ácido acético glacial (AAG) y la combinación de estos 2 últimos con Lfb sobre la producción de esporas y la viabilidad de *F. verticillioides* cultivado en grano de maíz (GM) y en caldo papa dextrosa (CPD). El diseño experimental consto de 6 tratamientos a 10 días de crecimiento para cada medio de cultivo, siendo estos: control (CT), lactoferrina bovina a una concentración de 3 μ M (GM) y 1.8 μ M (CPD), bicarbonato de amonio al 10 % (BA 10 %) (54 μ M CPD y 90 μ M GM), ácido acético glacial al 10 % (AAG 10 %) (54 μ M CPD y 90 μ M GM), lactoferrina bovina + bicarbonato de amonio al 10 % (Lfb 1.4 μ M + BA 10 % 10 μ M CPD y Lfb 2 μ M + BA 10 % 30 μ M GM) y lactoferrina bovina + ácido acético glacial al 10 % (Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % 10 μ M CPD y Lfb 2 μ M + AAG 10 % 30 μ M GM).

Entre los tratamientos mencionados, el único que no tuvo efectos inhibitorios en la producción y la viabilidad de las esporas fue BA 10 % en ambos medios de cultivo, el resto de los tratamientos mostraron efectos inhibitorios en la producción de esporas y la viabilidad de *F. verticillioides*, para los tratamientos realizados en CPD los tratamientos más eficaces fueron Lfb 1.4 μ M + BA 10 % (96 %), Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % (94 %) y AAG 10 % (93 %). En los tratamientos realizados en GM los tratamientos más eficaces fueron Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % (95 %), Lfb 1.4 μ M + BA 10 % (71 %) y AAG 10 % (61 %).

La Lfb resultó tener un efecto fungicida del 100 % sobre *F. verticillioides* a las 72 horas de su aplicación tanto en medio CPD a una concentración de 1.8 μ M, así como de 3 μ M en GM, logró disminuir la producción de esporas y las esporas restantes resultaron ser inviables. El BA 10% no presentó efectos inhibitorios durante los 10 días del tratamiento, contrariamente *F. verticillioides* produjo esporas con mayor vigor. Por otro lado, el AAG 10 % presentó un efecto fungicida a las 48 horas en CPD y a las 72 horas en GM, además, inhibió la producción de esporas y la viabilidad de estas. El uso combinado de Lfb con AAG y BA generó mayor eficiencia en los tratamientos tanto en GM (Lfb + AAG) como CPD (Lfb + BA) a las 24 horas de su aplicación. La Lfb podría ser sugerida de manera solitaria o en combinación con algún otro fungicida, como una alternativa de tratamiento o prevención a las infecciones que produce *F. verticillioides* en los diversos granos y semillas.

2. INTRODUCCIÓN

Las actividades pecuarias de México son base para el desarrollo económico del país, actualmente nuestro país cuenta con la existencia de una red de 12 tratados de libre comercio con 46 países, con un mercado potencial de 1,479 millones de personas. México es el séptimo principal productor de carne a nivel mundial, dentro de su producción los 3 tipos de carne que produce principalmente son bovina, porcina y aviar, abarcando el 98 % de la producción, el otro 2 % restante corresponde a carne de tipo ovina, caprina y pavícola. El principal insumo para poder producir este tipo de alimentos son los granos, que son usados para la preparación de alimentos balanceados (Castro-Samano et al., 2019).

Los granos constituyen una fuente de energía básica para la alimentación humana y animal, durante su formación y desarrollo en el campo, transporte y almacenamiento, los granos y semillas pueden ser invadidos por diversos hongos fitopatógenos, que, además, algunos de ellos pueden ser transmitidos de un ciclo agrícola a otro a través de las semillas. La determinación de los hongos asociadas a los granos y semillas es de gran importancia, ya que causan grandes pérdidas para la industria agroalimentaria, por lo cual, la inspección y su análisis permiten la detección oportuna de los microorganismos asociados a éstos. En el caso de los hongos transmitidos por semillas, es de gran importancia, además de ser propagados pueden sobrevivir en forma de esporas, formando plantas enfermas en el siguiente ciclo agrícola (Reyes-Pérez & Sánchez-Hernández, 2019).

En México, la producción de granos cuenta con dos ciclos, el de primavera-verano y el de otoño-invierno, el primero es del que se obtiene mayor producción; la obtención de estos granos consta en un proceso de selección, el cual está determinado principalmente por el contenido de humedad del grano, se tiene que buscar tener las menores pérdidas de cantidad y calidad de los mismos, previendo que estos se mantengan, y que las condiciones ambientales no favorezcan el deterioro del grano, generalmente, éste se da cuando los contenidos de humedad oscilan en el rango del 13 al 18 %; sin embargo, en las plantas de alimento recomiendan recibir el grano por abajo del 14 % para evitar castigos por concepto de secado y o deterioro del grano dentro de sus almacenes. Este proceso de cosecha y conservación se denomina postcosecha de granos, la cual podemos definir como el conjunto de procesos técnicos y operativos que engloban desde el acopio de los granos hasta su comercialización, cuyo funcionamiento permite garantizar la conservación de granos para satisfacer la demanda del consumidor (Rivers et al., 2016).

Por otra parte, se debe enfatizar el hecho, de que, los hongos al contaminar granos y semillas ocasionan diversos daños y algunas especies pueden llegar a producir micotoxinas, éstas son metabolitos secundarios que al ser ingeridos pueden ser dañinos para el hombre y los animales causando micotoxicosis (Reyes-Pérez & Sánchez-Hernández, 2019).

2.1 Deterioro de granos y semillas

Muchos productos vegetales como granos, semillas, raíces, tubérculos, frutos y pasturas, que constituyen alimentos básicos en el mundo entero, son almacenados normalmente en bodegas por cierto tiempo antes de ser utilizados en la alimentación o en diversas industrias. Si estos productos no están en condiciones adecuadas de almacenamiento, en poco tiempo proliferan especies micóticas, causando deterioro de los granos y semillas. El deterioro de éstos no es un problema que sólo se presenta cuando están almacenados, sino también en algunas ocasiones desde el campo, cosecha y transporte de los productos (Reyes-Pérez & Sánchez-Hernández, 2019).

2.2 Condiciones generales, factores bióticos y abióticos en el deterioro de granos y semillas

Factores abióticos

a. Humedad (H°):

El principal factor que gobierna la capacidad de deterioro en granos y semillas es la H° , considerando la cantidad de agua existente en el ambiente además de los sustratos. La H° es uno de los factores más importantes para la implantación de los hongos y la posible producción de micotoxinas, sin embargo, no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de esta, por lo que, el agua se puede encontrar en forma libre y en forma combinada. El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales. Por otra parte, la forma combinada está presente en los tejidos vegetales y animales, integrada a las células que las componen formando uniones con las proteínas y glúcidos. Es importante resaltar que, para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre (Gimeno, 2001; Reyes-Pérez & Sánchez-Hernández, 2019).

Unidades relacionadas con la cantidad de agua relacionada con el contenido de H° :

- Humedad relativa de equilibrio (HRE): es la cantidad de agua de la que disponen los microorganismos una vez alcanzados el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje y varía en los alimentos conforme a su contenido de glúcidos y o en materia grasa.
- Agua disponible (A_w): es la relación existente entre el agua libre en los alimentos y la capacidad de los microorganismos para proliferar. La A_w nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema – alimento-medio ambiente. La A_w se expresa como la relación existente entre la tensión del vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura (P_0), a la misma temperatura, ($A_w = P/P_0$). Si la H° del alimento está en equilibrio con la HRE de la atmósfera que lo rodea, la A_w en el alimento es numéricamente equivalente a esta, ($A_w = HRE/100$).

Tengamos en cuenta que la HRE se refiere a la atmósfera en equilibrio con el producto y la A_w se refiere al propio producto. El agua pura tiene una $A_w = 1.0$ y está en equilibrio con una atmósfera de 100 % de HRE. La A_w de un alimento es siempre < 1.0 (Gimeno, 2001).

b. Temperatura (T°):

La mayoría de los hongos son mesófilos y crecen a temperaturas moderadas en un intervalo de 10 – 40 °C., siendo la óptima entre 25 y 35 °C. Además, el gradiente térmico a través del grano puede entonces hacer que la H° emigre de un área a otra, similarmente la condensación afectará adversamente los niveles de A_w (Reyes-Pérez & Sánchez-Hernández, 2019).

c. Potencial de hidrogeniones (pH):

El pH es otra variable para tomar en cuenta en el desarrollo de los hongos, generalmente, son considerados más tolerantes que las bacterias a las condiciones ácidas, en el laboratorio muchos hongos crecen en un intervalo de pH de 4.5 - 8.0 y muestran un amplio intervalo de pH (óptimo de 5.5 - 7.5). Algunas especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son tolerantes al ácido y pueden crecer en niveles de pH menores a 2.0.

d. Potencial óxido/reducción O_2/CO_2 (ORP):

La mayor parte de los hongos son aerobios y por lo tanto necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Una carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de éstos (Gimeno, 2001).

Se ha demostrado que la HRE, H° , A_w , T° , pH y ORP son factores que están fuertemente relacionados, siendo determinantes en el crecimiento para cada una de las especies de hongos (Reyes-Pérez & Sánchez-Hernández, 2019).

Factores bióticos.

a. Presencia de invertebrados:

La presencia de insectos, actúan como agente de diseminación del microbiota y por lo tanto contribuyen al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de H° del sustrato y además promueve la rotura del pericarpio y permite la infección del interior del grano (Gimeno, 2001).

b. Composición del sustrato:

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional, suelen nutrirse de los micro y macroelementos existentes en el sustrato en el que se desarrollan. Sin embargo, la composición del sustrato está muy ligada con la producción de micotoxinas (Gimeno, 2001).

c. Estirpes específicas:

En una misma especie fúngica, no todas las estirpes se comportan de la misma forma. Tal es el caso de la estirpe NRRL 1957 de *Aspergillus flavus*, no produce aflatoxina, sin embargo, ésta es producida por otras estirpes como NRRL 3251, NRRL 3357, NRRL 3517 y NRRL 3353. Otro ejemplo, es el caso de *Fusarium roseum*, este hongo necesita temperaturas mínimas de 15 °C para desarrollarse, siendo la T° óptima entre 24 – 27 °C y que, en cambio, una de las micotoxinas que puede producir como es el caso de la zearalenona, solo la producirá a temperaturas entre 10 – 14 °C. No obstante, hay variedades de *F. roseum* como es el caso de *F. roseum* “*gibbosum*” y *F. roseum* “*semitectum*” que son capaces de producir en un sustrato como el sorgo a 25 °C, cantidades de zearalenona equivalentes a las producidas a una T° de 10 °C (Gimeno, 2001; Gimeno & Martins, 2011).

2.3 Hongos

Los hongos filamentosos son microorganismos ampliamente diseminados en la naturaleza, se consideran eucariontes, heterótrofos, pluricelulares, aeróbicos y termófilos; pueden crecer en un amplio rango de temperatura (5 - 45 °C); son organismos no móviles, ya que no poseen flagelos que les permita el movimiento, sus células forman una masa filamentosa conocidas como hifas, las cuales son ramificadas y al agruparse son llamadas micelio, estas forman parte del cuerpo principal del hongo. Adicionalmente, poseen una pared celular, pero sin clorofila, por lo que no realizan fotosíntesis y estas estructuras pueden tolerar altas concentraciones de solutos, así como condiciones extremas de pH (2.0 – 8.0), su reproducción puede ser sexual o asexual, a través de la generación de esporas. En cuanto a su alimentación, suelen obtener nutrientes para su desarrollo actuando como saprófitos o como parásitos, generando enfermedades a plantas, animales y humanos (Cepero de García et al., 2012; Cortés-Sánchez et al., 2016).

Los hongos no son un grupo monofilético natural (variantes). La conclusión es que han tenido un origen evolutivo separado. Se les agrupa solo con finalidades prácticas hasta tener suficiente información de sus verdaderas relaciones evolutivas. Los criterios que se usan para agrupar a los hongos son con base a su heterotrofismo, su formación de esporas, la presencia de quitina en su pared celular y la falta de componentes orgánicos complejos. Con base a lo anterior, el estudio de la secuencia genómica mantiene la promesa (como en muchos microorganismos) de proveer la información definitiva de su filogenia (Alexopoulos et al., 1996).

2.4 Clasificación taxonómica de los hongos

El reino *Fungi* se puede clasificar en cuatro *phylas* principales:

- *Phylum Chtridiomycota*:

Los Quitridomicetos son los únicos que producen células móviles en su ciclo de vida, aunque con un solo flagelo posterior en forma de látigo.

- *Phylum Zygomycota*:

Están caracterizados por un micelio cenocítico, con septos en la base de las estructuras reproductoras o septos secundarios. El nombre del grupo proviene de la presencia en parte de su ciclo de una zigospora característica.

- *Phylum Ascomycota*:

Los Ascomicetos están caracterizados por la presencia en su ciclo de vida, de una célula fértil, llamada célula ascógena, que producirá endógenamente ocho ascosporas (típicamente). Los representantes de este grupo prácticamente se encuentran poblando todo tipo de hábitat, y pueden presentar cualquier tipo de forma de nutrición, ya sea saprofitos, parásitos o simbioses.

- *Phylum Basidiomycota*:

Los Basidiomicetos están caracterizados por la presencia de una célula fértil en su ciclo de vida, llamada basidio, que produce exógenamente cuatro basidiosporas (típicamente). Normalmente originadas en tétrade, desde un basidio por medio de un esterigma, que es una prolongación del ápice del basidio, desde donde, generalmente, son violentamente expulsadas, por lo que reciben el nombre de balistosporas (Alexopoulos et al., 1996).

Existe una subdivisión llamada *Deuteromycota* donde se encuentran “hongos imperfectos”, estos son llamados así porque no se conoce en ellas una fase sexual de reproducción, comprenden más de 1500 especies de dos filos diferentes, Ascomicetos y Basidiomicetos (Alexopoulos et al., 1996).

Los hongos que crecen sobre productos agrícolas en especial los que invaden granos durante su desarrollo, cosecha o almacenamiento, han sido clasificados desde el punto de vista ecológico por Christensen y Kauffman, en hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado (Christensen & Kaufmann, 1969).

Hongos de campo:

Estos hongos invaden a las semillas durante su formación a planta o cuando éstas han madurado y permanecen en el campo en espera de ser cosechadas; para su crecimiento, requieren HRE > 90 % y una H° del 25 al 30 % en base al peso húmedo del grano. Las especies de hongos de campo que se encuentran con mayor frecuencia pueden variar según el cultivo, región o ubicación geográfica y clima, dentro de los que destacan diversos géneros tales como: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Fusarium* entre otros, estos se caracterizan por ocasionar diferentes afecciones a las plantas (Christensen & Kaufmann, 1969; Moreno, 1977). *Alternaria* es común de encontrar en muchos granos y semillas, especialmente en los cereales, pero no se limita a las semillas de cereales ya que es muy común encontrarlo en los cacahuates. *Cladosporium* es común en las semillas de cereales que han estado expuestas a la H° durante la cosecha, especialmente en los granos cosechados con cáscara, como la cebada, la avena y el arroz. *Helminthosporium* es común en muchos lotes de semillas de cereales, especialmente si el clima justo antes de la cosecha ha sido húmedo. *Fusarium* también es común en semillas de cereales recién cosechadas. Algunas cepas o especies causan "la roña" en la cebada, el trigo y el maíz; el grano con costra puede ser tóxico para los animales, incluido el hombre, por lo que no es deseable como alimento (Christensen & Kaufmann, 1969).

Christensen y Kaufmann evidenciaron que la contaminación leve por *Fusarium* no era detectada por inspección visual, (pero detectable al cultivar granos contaminados en su superficie al estar en contacto con agar) y que estos pueden resultar en el deterioro y o decoloración de los granos almacenados. Con esta posible excepción, el daño que los hongos de campo causan al grano ya se produce en el momento en que se cosecha el grano, o al menos en el momento en que el grano se seca hasta un contenido de H° < 20 - 22 %. Por otro lado, entre los daños que pueden ocasionar los hongos de campo podemos mencionar, el oscurecimiento de los granos o semillas invadidos, decoloración de la semilla, la muerte de la semilla en germinación o de la plántula joven, así como pudrición de la raíz y el tizón de la planta madura. Todos los hongos de campo requieren un alto contenido de H° en las semillas para poder crecer, un contenido de HRE de 90 % o más (en las semillas de cereales con almidón, 20 - 21 % de H°, en peso húmedo). Los hongos del campo pueden sobrevivir durante años en el grano seco, pero mueren con bastante rapidez en los granos mantenidos con contenidos de HRE > 70 %; en los granos de cereales con almidón, esto significa contenidos de H° superiores al 14 % (Christensen & Kaufmann, 1969).

2.5 Relación Hongos – Micotoxinas

Como se ha dicho los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios está asociado con la fase rápida o exponencial de crecimiento. También producen metabolitos secundarios, estos son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo. Dentro de este grupo, tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Por otra parte, la presencia del hongo no implica necesariamente la producción de la micotoxina, ya que, existen múltiples factores que ya hemos mencionado, más allá de la capacidad genética del

hongo, es necesario que concurren ciertas condicionantes para que el hongo produzca una micotoxina determinada. También puede ocurrir el hecho de detectar la micotoxina sin la presencia del hongo productor, puesto que las formas vegetativas y germinativas del moho pueden ser inactivadas por procesos químicos o por alteración de los factores ecológicos, no ocurriendo lo mismo con las micotoxinas, que permanecen en el sustrato (Gimeno, 2001).

2.6 Historia de las micotoxinas

Las micotoxinas y los cuadros de micotoxicosis, han existido desde hace más de 3000 años, existen registros de sus usos, así como descripciones de los hallazgos de los hongos en plantas de centeno, provocando intoxicaciones en quienes consumieran alimentos preparados con ello. Por otro lado, el daño de las micotoxinas no solo ha repercutido la salud humana, existen registros desde 1950 de casos de miles de caballos muertos a causa de leucoencefalomalacia equina (ELEM), ELEM ha sido reportada en muchos países y en última instancia, el descubrimiento del hongo implicado (*F. verticillioides*) y sus toxinas (ácido fusárico, fusarina C, naftoquinonas, moniliformina y fumonisinas) involucró a investigadores de los EE. UU., África y Europa. Los investigadores determinaron los efectos de las toxinas, los cuales son muy amplios y van desde efectos: neurotóxicos (ELEM), cancerígenos (carcinoma de esófago, carcinoma de células escamosas en esófago, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas cervical y carcinoma cervical), hemodinámicos (edema pulmonar en cerdos y trombos intraventriculares en ratas), hemorrágicos e inflamatorios en el endocardio de ratas (Bezuidenhout et al., 1988; Gelderblom et al., 1988; Gelderblom et al., 1984; Jaskiewicz et al., 1987; Kellerman et al., 1972; Kriek et al., 1981; Makaula et al., 1996; Marasas et al., 1984; Marasas, 1981; Soriano del Castillo, 2007; Thiel et al., 1986; Wilson & Maronpot, 1971).

Teniendo en cuenta todo lo anterior podemos decir que el impacto económico de las micotoxinas incluye pérdidas de vidas humanas, animales, aumento en gasto de tratamientos médicos y veterinarios, eliminación de alimentos contaminados, pérdida de producción agrícola, entre otros.

2.7 Micotoxinas

Las micotoxinas, que deriva de las palabras griegas *mikes* (hongo) y *toxina* (veneno), son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante el comienzo de la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Soriano del Castillo, 2007).

En la actualidad, más de 400 micotoxinas junto con sus derivados han sido identificadas, las cuales están clasificadas en aproximadamente 25 tipos, de acuerdo con su estructura química, con frecuencia son hidrocarburos aromáticos (a veces alifáticos) con gran resistencia a factores ambientales (Hernández Guzmán & Carballo Carballo, 2018; Soriano del Castillo, 2007).

Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que se tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos, en la biosíntesis de los ácidos grasos que los hongos realizan.

Estas micotoxinas son producidas principalmente por los géneros de hongos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Penicillium* y *Stachybotrys*; son mohos contaminantes habituales del ecosistema agropecuario, ya que contaminan los granos que se usan como materia prima para la elaboración de alimentos con origen vegetal, especialmente en cereales, pero también en nueces y otras semillas oleaginosas, frutos secos, cocoa, café, vino, cerveza, hierbas, especias, alimento para animales, y productos derivados de los animales por consumo de alimento contaminado con micotoxinas, como carne, huevo, leche y derivados de la leche. El consumir alimento contaminado con micotoxinas, así como su inhalación o contacto con la piel, origina un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis, que resultan en efectos negativos para el hombre o los animales que las consuman (Gimeno, 2001; Serrano-Coll & Cardona-Castro, 2015; Soriano del Castillo, 2007).

Además, hay que tener en cuenta que la presencia de estas micotoxinas en los alimentos puede ser individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en su acción sobre el organismo aumentando así su toxicidad (Soriano del Castillo, 2007).

Por su capacidad toxigénica las micotoxinas más importantes son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos (deoxinivalenol- toxina T2) y las fumonisinas (Darwish et al., 2014).

2.8 Prevención y control de hongos y micotoxinas en campo.

La prevención de la producción de micotoxinas en los cultivos implica el control de la biosíntesis de la toxina y el metabolismo de los hongos en el campo. El manejo adecuado de los cultivos se considera el método ideal de control de la contaminación de las cosechas con micotoxinas. Sin embargo, en la práctica es difícil controlar factores ambientales como la T° y H° de los cultivos (Denli & Pérez, 2006). Para combatir estos hongos desde el punto de vista de campo, se han desarrollado diversas estrategias para su prevención y control, las cuales van desde la logística de la plantación, uso de fungicidas, el empleo de variedades vegetales resistentes, la modificación genética de las plantas o aplicación de estrategias bio competitivas (Soriano del Castillo, 2007).

En cuanto a la logística de la plantación es importante considerar algunos puntos, como la selección del terreno; para el establecimiento de la plantación se deben evitar aquellos sitios que presenten acumulación de HRE, compactación y mal drenaje. Se debe usar material vegetal sano, para el establecimiento de una plantación se deben utilizar plantas provenientes de viveros certificados; sin embargo, una de las alternativas es el uso de plántulas desarrolladas a partir de esquejes. También es importante tomar en cuenta la fecha de la plantación, se deben evitar establecer plantaciones durante los meses de septiembre y octubre, debido a que la incidencia de marchitez y de otras enfermedades es elevada, ya que es la época de mayor H° del suelo y ambiental (Tlapal-Bolaños, 2013).

Sobre el uso de fungicidas, los más habituales usados para tratar el suelo son bicarbonato y carbonato de amonio, ácido acético y cobre, existen métodos que normalmente se aplican sobre las semillas antes de su siembra, lo cual constituye lo que se conoce como “Tratamiento de semillas”. Se clasifican en 3 categorías:

- a) Desinfección de semillas, la cual implica la erradicación de un patógeno que se encuentre en el interior de la semilla.
- b) Desinfestación de semillas, implica la eliminación de los hongos que se encuentran superficialmente en la semilla.
- c) Protección de las semillas, se lleva a cabo mediante el uso de fungicidas (Captan, Arasan y Trigran) protegen la semilla durante su germinación y emergencia (Moreno, 1977).

Además, deben usarse también insecticidas, se debe tener cuidado con los niveles residuales de estos, con esto no solo reduciremos la posibilidad de crecimiento fúngico y proliferación, sino que también se mantendrá la integridad física de los granos en lo que respecta a ataque de insectos, estos no solo atacan el grano y lo deterioran, sino que también son vectores, transportadores que actúan como diseminadores de la microflora y contribuyen a la contaminación. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de H^o o Aw del sustrato, la rotura que provoca dentro del pericarpio permite la infección del interior del grano. La parte interna del grano es más vulnerable que la cutícula o parte externa. Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico (Gimeno & Martins, 2011).

En cuanto al uso de variedades resistentes a los hongos, se han identificado genotipos de maíz resistentes al ataque de *A. flavus* como el denominado GT-MAS: gk, que ha demostrado ser capaz de resistir la infección y producción de aflatoxinas. Parece ser que en el desarrollo de esta resistencia están implicadas las ceras presentes a nivel del pericarpio del grano. De igual modo se están desarrollando distintas variedades de cereales resistentes al ataque de otros hongos filamentosos toxigénicos, principalmente especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos, en especial de deoxinivalenol, así como de fumonisinas, zearalenona y moniliformina (Soriano del Castillo, 2007).

Por otra parte, Tlalpal Bolaños y col. hicieron uso de *Trichoderma spp.*, *Bacillus subtilis* o la mezcla de ambos, en el material de propagación de cultivos de *Agave tequilana* Weber var. Azul y resulto ser un tratamiento preventivo de poblaciones de *Fusarium spp.* (Tlalpal Bolaños et al., 2014).

Además de estos tratamientos, se recurre a la utilización de conservantes químicos de síntesis o de productos naturales con actividad antimicrobiana, así como al empleo de atmósferas modificadas o controladas. Estos tipos de tratamientos y otras adicionales, deben ser integrados de forma preventiva en la implantación del sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (HACCP), este sería el enfoque más eficaz para controlar la contaminación de los productos cerealistas por micotoxinas, pues se buscaría introducir medidas preventivas en todas las posibles fases críticas del ciclo de producción de determinado grano (Soriano del Castillo, 2007).

2.9 Características y taxonomía del Género *Fusarium*

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Sordariomycetes*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Nectriaceae*

Género: *Fusarium*

Especie: *verticillioides*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Algunas de sus especies producen toxinas que afectan al hombre y animales. De las más de 100 especies de *Fusarium* descritas, sólo 12 de ellas pueden considerarse patógenas para el humano, entre ellas destacan *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, en orden decreciente de frecuencia (Tapia & Amaro, 2014).

Este género está distribuido en todo el mundo, varias de sus especies son patógenas e infectan a una amplia gama de cultivos, entre los más importantes se encuentra el maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum spp.*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), entre otros (Leyva-Mir et al., 2017).

Las características microscópicas de *Fusarium spp.* varían de acuerdo con el medio de cultivo en el que se desarrolle, de manera general presenta finas estructuras en forma de botella; simple o ramificada; estas se les denominan fiálides, pueden ser cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fialide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Los microconidios, son ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”) en cadenas largas o cortas. De igual forma, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo (Tapia & Amaro, 2014).

Los cuatro medios utilizados para la identificación de especies de *Fusarium* son el agar de hoja de clavel (Fisher, 1982), el agar papa dextrosa (PDA) (Nelson et al., 1983), el medio KCl (Fisher et al., 1983) y el agar de suelo (Klotz et al., 1988). El medio PDA permite observar la morfología de la colonia, está tiene una textura algodonosa y aterciopelada, el pigmento es muy variado, puede ser desde blanco hasta rojo carmín y violeta, pasando por diferentes tonalidades de amarillo quemado, en algunas ocasiones el pigmento se difunde al medio de cultivo, algunos ejemplos de las cepas en cuestión se pueden observar en (**Figura 1**) (Cepero de García et al., 2012; Mokobi, 2020; Tapia & Amaro, 2014).

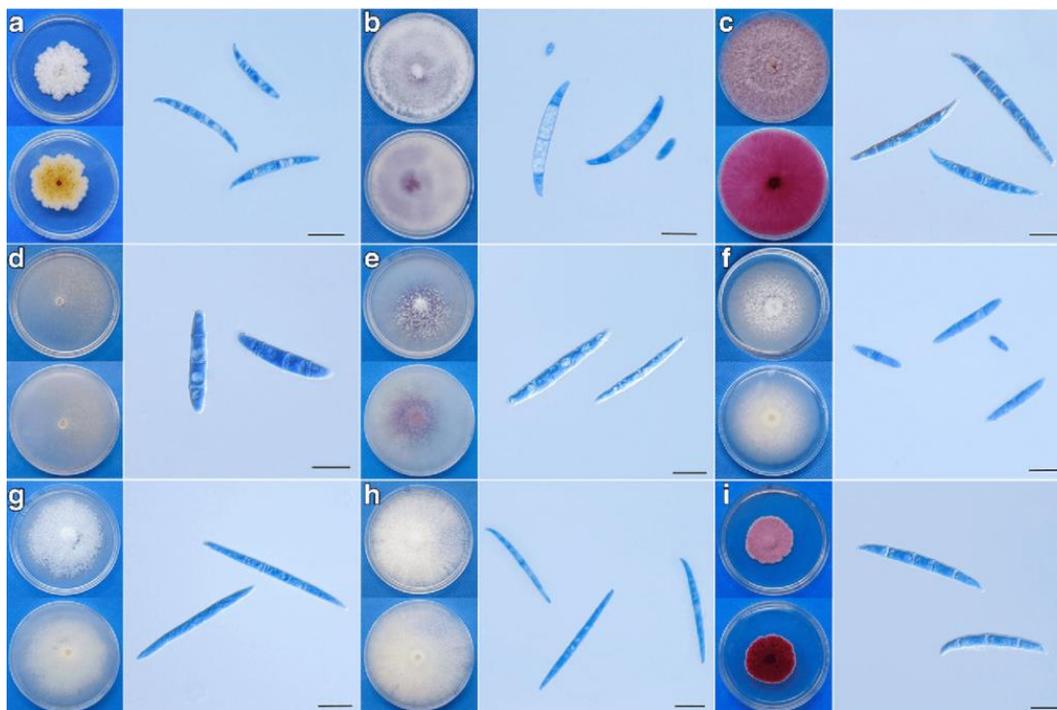


Figura 1. Colonias típicas y macroconidios de aislados de *Fusarium* en medio agar papa-dextrosa y macroconidios en medio de carboximetilcelulosa después de 5 días de crecimiento. a) *F. equiseti*; b) *F. oxysporum*; c) *F. graminearum*; d) *F. solani*; e) *F. commune*; f) *F. verticillioides*; g) *F. proliferatum*; h) *F. fujikuroi*; i) *F. avenaceum*. Barra de escala = 20 μm (Mokobi, 2020).

En campo, *Fusarium spp.* se puede identificar porque forma lesiones hundidas de color negro o marrón en la base de los tallos, además produce manchas rojizas en los pecíolos cercanos a la copa de la planta, y a veces masas de micelios rosadas o blancas que crecen en la base de los esquejes o en la copa de una planta (Buechel, 2020).

Las especies de *Fusarium* son saprófitas en algunas de sus fases de crecimiento y pueden o no desarrollar una fase de reproducción sexual según la especie. Se han descrito estados sexuales (telemorfos) para algunas de sus especies (Samuels et al., 2001).

Fusarium spp. produce clamidosporas, resistentes al secado y a las condiciones adversas, permiten que el hongo sobreviva períodos prolongados en el suelo, mientras que los conidios, se producen en un esporodio, que es una masa de conidióforos (tallos que contienen conidios) colocados firmemente juntos. Hay dos tipos de conidios: macroconidios (esporas grandes y multicelulares) y microconidios (esporas pequeñas y unicelulares). Los conidios generalmente no se transmiten por el aire, pero el hongo puede transmitirse por el aire en trozos de restos de plantas infectadas, en polvo o en salpicaduras de agua (Koike & Tjosvold, 2020).

Las enfermedades causadas por *Fusarium spp.* pueden ser muy agresivas en climas húmedos. En las zonas donde la H° es baja, la infección la causa casi de manera exclusiva el inóculo presente en residuos de cereales infectados que permanecen en el suelo. El patógeno invade directamente la base de los tallos, cerca o debajo de la superficie del suelo, o entra a la planta a través de las

raíces. Las esporas de hongos luego germinan en el área afectada (herida), favorecida por la alta H° y T° (Cook, 2010).

Además, especies del género *Fusarium* producen una diversidad de tipos de micotoxinas, especialmente en granos, las más frecuente son zearalenona, fumonisina, moniliformina y tricotecenos (toxina T-2 / HT-2, deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, nivalenol) (Desjardins, 2006; Nesic et al., 2014).

2.9.1 Ciclo biológico de *Fusarium*

Las especies de *Fusarium* tienen diversos ciclos de vida, especializados en su nicho, adaptados al hospedero por cierta especificidad. *Fusarium graminearum* y *Fusarium verticillioides* son patógenos de rango estrecho de hospedantes que infectan predominantemente los cereales, mientras que *Fusarium oxysporum* tiene un amplio rango de hospedantes e infecta plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas; además, también es un patógeno emergente en pacientes inmunocomprometidos y otros mamíferos (Armstrong, 1978; O'Donnell et al., 2004; Ortoneda et al., 2004).

Las especies de *Fusarium* varían en la estrategia de reproducción; *F. oxysporum* es asexual, otros son tanto asexuales como sexuales con autofertilidad (homotalismo) o cruzamiento obligado (heterotalismo). Las especies de *Fusarium* producen esporas meióticas (sexuales) y al menos tres tipos de esporas mitóticas (asexuales). Sin embargo, no todas las especies de *Fusarium* producen todo tipo de esporas: Además, menos del 20 % de las especies de *Fusarium* se reproducen sexualmente (Ma et al., 2013).

El ciclo de vida generalizado de *Fusarium spp.* comienza con un organismo creciendo como una colonia haploide de hifas, a excepción de las etapas dicariótica breve (cada célula que contiene dos núcleos haploides parentales) y diploides que preceden a la meiosis y la producción de esporas haploides producidas sexualmente (ascosporas). Las ascosporas se producen en grupos de ocho en un saco (asco) contenido dentro de una estructura en forma de matraz (peritecio). Las especies homotálicas son capaces de autofertilizarse y producir descendencia clonal de ascosporas (apomixis); las especies heterotálicas son autoestériles. Se pueden producir tres formas principales de esporas mitóticas (asexuales), según la especie. Las pequeñas esporas asexuales (microconidios) se producen en el micelio a partir de estructuras simples que forman esporas (conidióforos). Las esporas septadas (macroconidios) largas, en forma de canoa, se producen en agregaciones en forma de cojín de conidióforos llamados esporodoquios y o en conidióforos en el micelio aéreo. Las esporas resistentes de paredes gruesas (clamidosporas) se producen dentro o sobre hifas o macroconidios (Ma et al., 2013).

La mayoría de las especies de *Fusarium spp.* pueden clasificarse libremente como hemibiótrofos, porque la infección inicialmente se asemeja a la de un patógeno que depende de un huésped vivo (biotrófico), pero eventualmente pasa a matar y consumir células huésped (necrotrofico). Las enfermedades que producen pueden iniciarse en las raíces a partir del inóculo del suelo o en partes

de la planta por encima del suelo a través del aire o el agua. *F. oxysporum*, por ejemplo, inicialmente penetra en las raíces de manera asintomática; posteriormente coloniza el tejido vascular y provoca necrosis y clorosis de las partes aéreas de la planta. Por el contrario, *F. graminearum*, la principal causa del tizón de la espiga de los cereales por *Fusarium* en todo el mundo produce una necrosis limitada. Infecta los tejidos florales durante la antesis y se propaga a las flores no infectadas a través del eje central de la inflorescencia, dañando eventualmente los granos y contaminándolos con toxinas. La especificidad del huésped varía entre las especies de *Fusarium*. *F. verticillioides* causa la pudrición de la mazorca, principalmente en el maíz y el sorgo, pero puede infectar a muchas otras plantas (Baayen et al., 2000; O'Donnell et al., 1998).

2.10 *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión *Deuteromycota*, en esta se agrupan a los hongos en los que no se ha descrito una fase sexual, o bien, está es muy rara. *F. verticillioides* entra dentro de esta última categoría ya que, si presenta una fase sexual llamada teleomorfo, o forma perfecta, es muy difícil de encontrar en la naturaleza y se requieren condiciones especiales para observarlo *in vitro* (Deacon, 1997; Leslie & Summerell, 2007). 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. Siempre se forman a partir de monofiálides, los cuales se pueden agrupar en pares en forma de “v” dando una apariencia de “oreja de conejo” formando cadenas bastante largas. Algunas cepas también generan macroconidias lo cual es muy raro, suelen tener una 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, algunas de las estructuras mencionadas previamente se pueden apreciar en (**Figura 2**) (Leslie & Summerell, 2007).

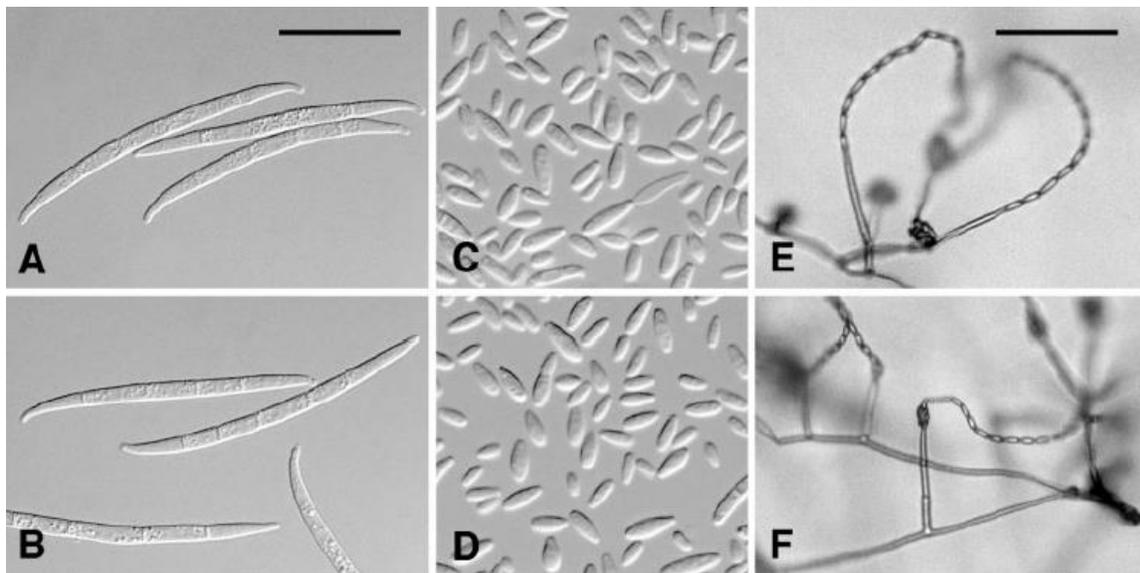


Figura 2. *Fusarium verticillioides* A – B (Macroconidios); C – D (Microconidios); E – F (Microconidios *in situ* en agar hoja de clavel) A – D, barra de escala 25 μ m; E – F, barra de escala a 50 μ m (Leslie & Summerell, 2007).

Las características y la morfología de la colonia de esta especie varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en PDA 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, un ejemplo de la apariencia de las colonias se puede observar en **(Figura 3)** (Leslie & Summerell, 2007; Pitt, 2014).



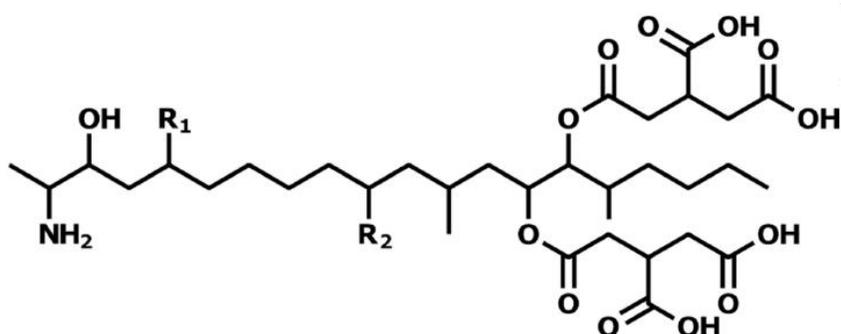
Figura 3. *Fusarium verticillioides*. Colonias de *F. verticillioides* en medio PDA y agar dicloran cloranfenicol peptona (Pitt, 2014).

La especie *F. verticillioides* se distribuye por todo el mundo, y con alta frecuencia es aislada del maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona 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 luego, sobrevive como saprófito en el rastrojo. Sin embargo, durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en las semillas y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. 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 (Desjardins et al., 1995; Duncan & Howard, 2010; Kedera et al., 1994).

El clima caliente y húmedo favorece la putrefacción de la mazorca durante el periodo de llenado de grano (Samapundo et al., 2007; Torres et al., 2003). A diferencia de otros hongos que son estrictamente biótrofos, *F. verticillioides* no genera estructuras especializadas que faciliten la entrada al tejido y a las células. Sin embargo, es capaz de producir cantidades importantes de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso infeccioso. Entre las micotoxinas que sintetiza la especie se hallan el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la moniliformina y las fumonisinas, estas últimas son las más abundantes. La presencia de esos compuestos en productos agrícolas causa gran preocupación, debido a los efectos que ocasionan cuando animales y humanos los consumen (Bacon et al., 1989, 1996; Jennings, 2007; Rabie et al., 1982).

2.11 Fumonisin

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas que contaminan el maíz y son producidas principalmente por *F. verticillioides*, y de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), desde 1993 se encuentran catalogadas en el grupo 2B como posibles carcinógenos humanos por detrás de Aflatoxina B₁ (AFB₁) que se encuentra en el grupo 1 de esta clasificación. Existen 15 tipos de fumonisinas agrupadas en cuatro categorías (A, B, C, P); siendo las más conocidas FB₁, FB₂ y FB₃, de las cuales FB₁ es la más tóxica y representa aproximadamente 70 % de la fumonisina total (Torres-Sánchez & López-Carrillo, 2010). Las fumonisinas B contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarboxílico esterificados en C-14 y C-15 su estructura molecular se puede observar en (Figura 4) (Bezuidenhout et al., 1988; de la Torre-Hernández et al., 2014; Rheeder et al., 2002).



	R1	R2
Fumonisin B1	OH	OH
Fumonisin B2	OH	H

Figura 4. Estructura química de las fumonisinas del grupo B (de la Torre-Hernández et al., 2014).

En cuanto a la capacidad de producir fumonisinas, existen varios factores a considerar como las características de la cepa *F. verticillioides*, aun cuando las cepas crezcan bajo las mismas condiciones en un sustrato natural como maíz o en un medio de cultivo de composición definida, factores ambientales como el pH, Aw, y nutrientes también regulan la síntesis de fumonisinas, por lo que, está es muy variable (de la Torre-Hernández et al., 2014).

Debido a que las fumonisinas tienen una estructura química similar a la cadena larga de los precursores de los esfingolípidos se considera que el metabolismo de estos últimos es el blanco de la acción tóxica de la fumonisina. El metabolismo de los esfingolípidos consta de dos etapas, la síntesis de novo a partir del complejo serina palmitoil-CoA y el recambio de esfingolípidos que incluye la hidrólisis de esfingolípidos complejos. En ambas etapas interviene la enzima ceramida sintetasa, la cual es bloqueada por la acción de la fumonisina. Este bloqueo conlleva la inhibición en la síntesis de ceramida, incremento de la esfinganina y la esfingosina, una mayor degradación

de las bases esfingoides provenientes de la dieta y, finalmente, una reducción en la formación de esfingomielina (Abdel Nour et al., 2007; Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008).

Los esfingolípidos forman parte de la membrana celular e intervienen en los procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular al mantener la estructura de la membrana, la comunicación intercelular, la interacción entre las células y la matriz extracelular, regulando los receptores del factor de crecimiento y actuando como segundos mensajeros (Merrill et al., 1997).

El agotamiento de esfingolípidos complejos (ceramida, esfingomielina y glicofosfolípidos) y la acumulación de las bases esfingoides (esfinganina y esfingosina) alteran las funciones celulares mencionadas anteriormente, y favorecen el estrés oxidativo y la proliferación de peroxisoma, entre otros (Marasas et al., 2004; Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008; Turner et al., 1999).

A través de la activación del factor de necrosis tumoral, la exposición a FB₁ altera el balance de muerte celular y replicación contribuyendo a la carcinogénesis (Wild & Gong, 2009).

A pesar de existir diversas alternativas de prevención y control para el problema de hongos y micotoxinas, es necesario buscar nuevas alternativas que pudieran contribuir a disminuir este problema, dado que, los conocimientos técnicos y científicos actuales aún no nos permiten la completa eliminación de este peligro, solo establecer límites de sus concentraciones en los granos para evitar consumir aquellos que estén contaminados con altas concentraciones de micotoxinas. De tal forma que, el uso de lactoferrina bovina (Lfb) podría ser una buena alternativa, esta proteína tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas contra bacterias, parásitos, hongos y virus. Otro de los objetivos de esta investigación fue estudiar los efectos de Lfb en conjunto de alguno de los fungicidas usados en la agricultura con mayor frecuencia, por lo que, también se realizaron tratamientos con bicarbonato de amonio y ácido acético.

2.12 Bicarbonato de amonio

El bicarbonato de amonio (NH₄) HCO₃ (BA) es un sólido cristalino que se descompone en amoníaco y dióxido de carbono en condiciones adecuadas de H° y T°. Las soluciones acuosas de esta sal suelen ser ligeramente alcalinas (Winston, 1995).

Se sabe que los compuestos de bicarbonato y carbonato presentan propiedades fungicidas para fines agrícolas. El BA inhibe la germinación esclerótica y el crecimiento micelial de diversos hongos y tiene actividad antimicótica contra una variedad de hongos micotoxigénicos, incluido *Aspergillus parasiticus* en el maíz. Se desconoce el mecanismo por el cual el BA inhibe los hongos. Punja propuso que la inhibición involucraba el amoníaco no ionizado asociado con este compuesto y sugirió que la toxicidad del BA no era un efecto directo del pH, sino que parecía estar mediada por el pH. La disociación de las especies NH₄⁺ para la formación de amoníaco libre sin carga depende del pH y se rige por la ecuación de equilibrio NH₄⁺ + H₂O = NH₃ + H₃O⁺ (pKa = 9.25 a 25 °C). La toxicidad del amoníaco se atribuye a la difusión pasiva de la membrana de las especies de NH₃ no ionizado en los compartimentos intracelulares de los organismos susceptibles. La

permeabilidad de la membrana, y por tanto la toxicidad, de los iones de amonio hidratados y cargados es relativamente baja (Depasquale et al., 1990; Punja, 1986).

2.13 Ácido acético glacial

El ácido acético (CH_3COOH), presenta una masa molecular de 60.05 kilodalton (kDa), es un compuesto orgánico líquido, incoloro, miscible con el agua, con un olor acre y un sabor claramente agrio. El ácido acético glacial (AAG) se refiere al ácido acético anhidro, es decir, sin presencia de agua. Se le da el nombre de glacial ya que cuando el ácido acético se congela tiende a precipitarse dejando el agua en forma de cristales sobre él (da Silva et al., 2015). El ácido acético puede tener efecto fungicida, fungistático, bactericida – bacteriostático, nematocida, herbicida y fumigante (Tenuta et al., 2002; Ushiwata et al., 2009).

Se han sugerido algunos mecanismos para explicar el efecto inhibitorio del ácido acético. El ácido acético disminuye el valor del pH, esto puede influir en el crecimiento al acidificar la célula, lo que consumirá una gran cantidad de energía para mantener la homeostasis del pH intracelular. También se han propuesto otras explicaciones, incluida la ruptura de la membrana, la interrupción de las reacciones metabólicas y la acumulación de aniones tóxicos. Tres de los hongos (*P. roqueforti*, *P. commune* y *F. sporotrichoides*) y una especie de levadura (*Kluyveromyces marxianus*) no crecieron a pH 3 (Kang et al., 2003).

2.14 Lactoferrina

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de unión a metales. Esta molécula se descubrió por primera vez como "proteína roja" en la leche bovina y se aisló de la leche humana y bovina (Takayama, 2013).

Lf pertenece a una familia de proteínas llamada transferrinas, es un grupo de proteínas de unión al hierro que se encuentran en muchos organismos eucariontes, y está formada por 4 proteínas la transferrina sérica, ovotransferrina, melanotransferrina y Lf. Las transferrinas se encontraron originalmente en el plasma sanguíneo y en fluidos secretores de vertebrados. Esta familia se ha dividido en función de la secuencia de aminoácidos que conforman cada proteína, también por su función y ubicación. La transferrina sérica es sintetizada por los hepatocitos y eritrocitos, su función principal es el transporte de hierro. Otro miembro de la familia, la ovotransferrina, está es secretada principalmente en el hígado y oviducto de aves, constituye un 12 % de la proteína de la clara de huevo, tiene funciones antimicrobianas por su capacidad para fijarse en iones de Fe^+ , Cu^+ , Zn^{2+} y Mn^{3+} . La melanotransferrina, fue descubierta en los 80's como uno de los primeros antígenos tumorales del melanoma, se le han atribuido múltiples funciones como transporte de hierro, angiogénesis, proliferación y migración celular, así como cancerogénesis (Lambert et al., 2005; Rahmanto et al., 2012; Vogel, 2012).

La Lf se encuentra en las secreciones de mamíferos como la leche materna (especialmente en el calostro), el líquido seminal, las secreciones uterinas, las lágrimas y la saliva. La Lf es sintetizada

por diferentes poblaciones celulares, incluyendo a los neutrófilos, macrófagos y epiteliales glandulares, se secreta principalmente en respuesta a procesos inflamatorios (Actor et al., 2009; Baker & Baker, 2005; González-Chávez et al., 2009; Legrand et al., 2008).

Se identificó a Lf como una proteína de unión a hierro debido a su secuestro de iones libres Fe^{2+} y Fe^{3+} y, por lo tanto, se incluye en el grupo de metaloproteínas. Esta biomolécula tiene capacidad multifuncional, incluyendo: propiedades inmunomoduladoras en relación con la respuesta inmune innata y adaptativa; propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas contra bacterias, parásitos, hongos y virus; además contribuye a la capacidad regenerativa de tejidos (Moreno-Expósito et al., 2018).

La Lf se conoce como una proteína altamente básica y se une a moléculas aniónicas como el ADN, la heparina, los glucosaminoglicanos y las endotoxinas. La multifuncionalidad de la lactoferrina podría explicarse por la diversidad de células y moléculas diana. Los datos estructurales y funcionales de la Lf sugieren que su estructura característica contribuye a sus diversas funciones (Takayama, 2013).

La estructura molecular de Lf consiste en una cadena polipeptídica simple y glucano, cuenta con un peso molecular de 78 kDa. La lactoferrina humana y bovina consta de 691 y 696 aminoácidos, respectivamente, su homología en cuanto a la secuencia de aminoácidos es de un 70 % aproximadamente mientras que para el caso de lactoferrina humana y de chimpancé comparten un 97 % de homología en su secuencia. A nivel molecular Lf cuenta con estructuras secundarias conformadas por hélices (33 - 34 %) y hebras (17 - 18 %). Las estructuras terciarias de Lf, constan de 2 lóbulos simétricos (lóbulo N y lóbulo C) unidos por una α -hélice corta. Estos dos lóbulos son globulares y se pueden dividir en 2 subdominios de tamaño similar: N1 y N2; C1 y C2, respectivamente (Wang et al., 2017; Yount et al., 2007). En la (**Figura 5**) podemos observar un modelo tridimensional de la estructura molecular de Lf (Takayama, 2013).

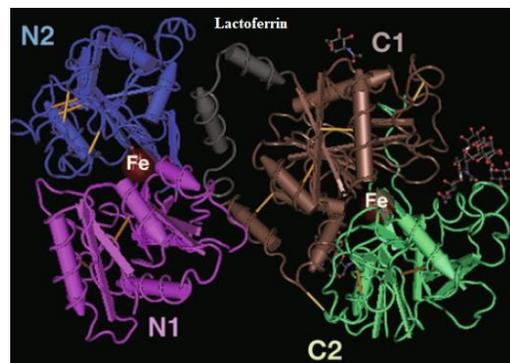


Figura 5. Estructura tridimensional de Lactoferrina (Takayama, 2013).

El ion metálico más común asociado con la lactoferrina es el ion de hierro férrico (Fe^{3+}). Una molécula de lactoferrina puede unir dos iones de hierro con alta afinidad ($K \sim 10^{22} \text{ M}$) (Takayama, 2013).

Debido a la capacidad de unirse reversiblemente al hierro férrico (Fe^{3+}), Lf puede estar libre de hierro (apo-Lf) o asociado a él (holo-Lf), y esto le da una conformación tridimensional diferente a la molécula dependiendo de si está unida al hierro férrico o no. Apo-Lf tiene una conformación abierta, mientras que holo-Lf es de conformación cerrada y con mayor resistencia a proteasas. Para el caso de la lactoferrina bovina (Lfb) está se encuentra saturada parcialmente de hierro (>20 %) (González-Chávez et al., 2009; Takayama, 2013).

La afinidad de la lactoferrina humana y bovina por el ion hierro es aproximadamente 260 veces y 30 veces mayor que la de la transferrina, respectivamente. Esta estabilidad de la lactoferrina es causada por la interacción cooperativa de los dos lóbulos. La alta afinidad y estabilidad de la unión al hierro por la lactoferrina hace que esta proteína no solo sea un portador de hierro, sino también un fuerte eliminador de hierro y una molécula antioxidante (Takayama, 2013).

Se han realizado estudios donde se ha demostrado que la Lf de múltiples especies de mamíferos puede inhibir el crecimiento de algunos agentes patógenos, incluyendo hongos y parásitos. Sin embargo, las concentraciones mínimas inhibitorias de crecimiento informadas para Lf son mucho más altas que las de la mayoría de los medicamentos antimicóticos disponibles actualmente y varían notablemente de un papel a otro, lo que probablemente se deba a diferentes condiciones de ensayo y a una variación significativa dentro de la especie en la susceptibilidad a la proteína (Leboffe et al., 2009).

Se tiene bien documentado que Lfb tiene actividad antifúngica contra una gran variedad de patógenos de humanos y plantas, incluyendo levaduras y hongos filamentosos. Lo que más ampliamente se ha estudiado es la actividad antifúngica en el género *Candida*, los primeros trabajos con este género atribuyeron el efecto antifúngico de Lf a su capacidad de secuestrar hierro resultando en un efecto fungistático, se confirmó al agregar hierro a cultivos de *Candida* y *Cryptococcus* previamente inhibidos con Lf (Kirkpatrick et al., 1971).

Estudios más recientes ahora sugieren que el principal mecanismo antifúngico de Lf, además de la quelación de hierro, ocurre a través de una interacción directa de Lf con la superficie de la célula fúngica, lo que conduce a daños y fugas en la membrana celular. Los ensayos de proteínas sobrenadantes y la tinción con yoduro de propidio han demostrado que Lf altera la permeabilidad de la superficie celular en *C. albicans*, *C. krusei* y *Cryptococcus neoformans*, lo que lleva a la muerte celular (Kondori et al., 2011; Nikawa et al., 1993; Wakabayashi et al., 1998).

A través de microscopia electrónica de barrido, se han observado alteraciones en la superficie celular, provocando una fuga de proteínas, la formación de ampollas en la superficie, hinchazón y colapso celular en muestras de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. neoformans* (Nikawa et al., 1993; Wakabayashi et al., 1998).

Se ha estudiado la inducción de un fenotipo apoptótico en las células de *C. albicans* posterior a ser tratada con Lf, esto se manifestó con liberación de iones potasio intracelulares, acidificación del

citoplasma, cambios en el potencial de membrana, acumulación intracelular de radicales superóxido y condensación de cromatina (picnosis). Los detalles por los cuales Lf induce procesos similares a la apoptosis en hongos siguen sin estar claros, sin embargo, estudios recientes han examinado este mecanismo en especies de levadura significativas. En *Saccharomyces cerevisiae*, se demostró que holo-Lf induce la muerte celular al dañar a la mitocondria por un mecanismo dependiente de caspasa, que se caracteriza por acumulación de radicales superóxido y liberación del citocromo c (Acosta-Zaldívar et al., 2016; Viejo-Díaz et al., 2005) .

El trabajo del mismo grupo, pero en *Candida albicans* determinó que el objetivo de holo-Lf es una ATPasa Pma1p, que es una proteína translocadora de protones, está es la principal contribuyente en la regulación del pH en levaduras (Andrés et al., 2016).

3. JUSTIFICACION

La contaminación de cualquier tipo de grano por hongos micotoxigénicos tiene un gran impacto económico en el sector agropecuario, pero no solo se limita a eso, también tiene efectos negativos en la salud y producción animal, así como en la salud humana. Actualmente, la resistencia a los antifúngicos contribuye a la contaminación fúngica en el sector agrícola. De manera que, el estudio de la interacción de Lfb y *F. verticillioides* podría proponer una alternativa novedosa, se ha demostrado que Lfb tiene actividad antifúngica en diferentes especies de hongos, actualmente no existen reportes en *F. verticillioides*, además no se ha reportado resistencia antimicrobiana a Lfb, por lo que determinar su efecto podría contribuir a establecer nuevas alternativas terapéuticas para la prevención o tratamiento de su infección en el campo.

4. HIPOTESIS

La lactoferrina bovina tendrá un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, al interactuar en medio líquido y sólido interrumpirá el crecimiento exponencial del hongo y las esporas restantes serán inviables.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Estudiar el efecto que produce la lactoferrina bovina (Lfb) en el hongo *Fusarium verticillioides* en cultivo líquido y sólido.

5.2 Particulares

- Elaborar una curva de producción de esporas de *F. verticillioides* en caldo papa dextrosa (CPD) y en grano de maíz estéril.
- Establecer el efecto de Lfb en la producción de esporas de *F. verticillioides* en CPD y en grano de maíz estéril.
- Observar el efecto de las sales de bicarbonato de amonio (BA) en la producción de esporas de *F. verticillioides* en CPD y en grano de maíz estéril.
- Identificar el efecto del ácido acético glacial (AAG) en la producción de esporas de *F. verticillioides* en CPD y en grano de maíz estéril.
- Estudiar el efecto de Lfb en combinación con BA y también AAG durante la producción de esporas de *F. verticillioides* en CPD y en grano de maíz estéril.

6. METODOLOGIA

Los experimentos se realizaron en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, en el laboratorio del Programa de Investigación Aviar (PIA) de micotoxicología.

La cepa con la cual se prepararon los inóculos de *F. verticillioides* (UNIGRAS-2509), fue proporcionada amablemente por el Dr. Ernesto Moreno Martínez † de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Tanto Lfb (Nutrisciencias®, USA) como AAG (SIGMA®, USA) fueron proporcionados amablemente por el Laboratorio 52 de Biología celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Lfb se reconstituyó con agua destilada y posteriormente se realizó una esterilización por filtración en membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore, USA).

Las sales de BA (Econoclear®, México) y AAG se prepararon con agua destilada a una concentración del 10 %.

6.1 Diseño experimental

El experimento se realizó en 2 fases, en una se utilizó CPD como medio de cultivo y en la otra viales con granos de maíz amarillo *Zea mays* (GM).

Cada fase contó con 6 tratamientos, control (CT), lactoferrina bovina a una concentración de 3 µM (GM) y 1.8 µM (CPD), bicarbonato de amonio al 10 % (BA 10 %) (54 µM CPD, 90 µM GM) ácido acético glacial al 10 % (AAG 10 %) (54 µM CPD, 90 µM GM), lactoferrina bovina + bicarbonato de amonio al 10 % (Lfb 1.4 µM + BA 10 % 10 µM CPD y Lfb 2 µM + BA 10 % 30 µM GM) y lactoferrina bovina + ácido acético glacial al 10 % (Lfb 1.4 µM + AAG 10 % 10 µM CPD y Lfb 2 µM + AAG 10 % 30 µM GM). A cada tratamiento se le inocularon 1000 esporas de *F. verticillioides*, tuvieron un crecimiento de 10 días, se les dio lectura cada 24 horas (hrs). Los tratamientos en CPD tuvieron 6 repeticiones y los viales con maíz amarillo 9 repeticiones.

Las lecturas de cada tratamiento consistían en la cuantificación de esporas y medición de pH.

6.2 Preparación medios de cultivo

Previo a la inoculación de los medios de cultivo se realizó lo siguiente:

- Maíz: Para la realización de todos los experimentos se usaron 1.82 kg de Maíz amarillo, este maíz se limpió de forma manual buscando eliminar granos rotos o con alguna pigmentación, así como la eliminación de alguna partícula ajena al maíz. Posteriormente se determinó la humedad del maíz (HF) por el método de secado, el cual consistió en tomar

el peso individual de 10 frascos vacíos (WC), después vaciar entre 3 a 4 gr de maíz (SH, peso del grano), volverlos a pesar (WC + SH), se dejaron esos 10 frascos por 5 días en un horno de cultivo bacteriológico a una temperatura entre 30 – 36 °C, después se volvieron a pesar (SS, peso de grano seco) (WC + SS), se determinó la humedad de cada vial con la siguiente fórmula:

$$(WC + SH) - (WC + SS) = AQU$$
$$HF = \left(\frac{AQU}{SH} \right) \times 100$$

El Maíz se distribuyó en viales de vidrio, a cada uno se le colocó 3.0 g de maíz, la boquilla de cada vial fue cubierta con una tapa de papel filtro, junto con una liga que mantuviera dicho papel adherido a la boca del vial. El maíz fue esterilizado por vapor utilizando el autoclave.

- Caldo papa dextrosa: Se prepararon 3.0 litros de CPD se distribuyeron en viales de vidrio estériles con 10 ml en cada vial, una vez servido el medio de cultivo se tapó la boca de cada contenedor.

6.3 Preparación de solución de esporas de *F. verticillioides*.

Para preparar todos los inóculos que crecieron en los medios de cultivo se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se desinfectó el área de trabajo.
2. Se tomó un agar cultivado con *F. verticillioides* (también se pueden usar granos de maíz que han sido inoculados) y se realizó un explante al agar, el cual fue colocado en un vaso de precipitado de 200 ml.
3. Se agregó 10 ml. de Tween 80 % al vaso de precipitado y se homogenizó.
4. Se filtró el contenido del vaso a través de un embudo el cual contaba con una gasa estéril y el contenido fue recolectado.
5. Se realizó la cuantificación de esporas por cámara de Neubauer de una suspensión de 10 ml filtrada previamente.

Cuantificación de esporas:

- Se llenaron los retículos superior e inferior de la cámara con la suspensión de esporas.
- Se realizó el conteo de esporas de forma visual, los cuadrantes que se contaron se muestran en la **(Figura 6)** (CETA FES ZARAGOZA, 2018).

- El conteo de los cuadrantes se realizó de la siguiente manera: el orden de conteo de cada cuadrante es el que tienen los números en la **Figura 6**, cada cuadrante se comenzaba a contar en su carril superior empezando del lado izquierdo, el sentido del conteo del siguiente carril comienza donde se terminó de contar el primero (lado derecho), se evitaron contar estructuras que estuvieran a la mitad o encima de las líneas superiores y del lado derecho de cada cuadrícula del cuadrante (CETA FES ZARAGOZA, 2018).

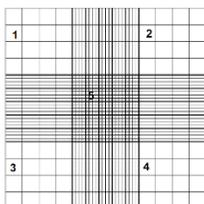


Figura 6. Cámara de Neubauer. Los números representan el orden en que se realizó el conteo de los cuadrantes. Editada de (CETA FES Zaragoza, 2018)

- Una vez obtenidos los conteos de ambos retículos se promediaron sus valores, al tener ambos valores estos también se promediaron, el resultado se multiplicó por un factor x100 para obtener la concentración de esporas por ml.
6. Una vez determinada la concentración de esporas se aforo la suspensión de esporas a 100 ml con Tween 80 %.

6.4 Inoculación de *F. verticillioides* en medio líquido

Una vez preparados los medios de cultivo para cada tratamiento se procedió también con la preparación de solución de esporas a una concentración de 10,000 esporas por ml. Posteriormente se inocularon los viales de acuerdo con los volúmenes siguientes para cada tratamiento CT (Tween 80 % 540 µl), Lfb 1.8 µM (540 µl), BA 10 % (540 µl), AAG 10 % (540 µl), Lfb 1.4 µM (440 µl) + BA 10 % (100 µl) y Lfb 1.4 µM (440 µl) + AAG 10 % (100 µl).

Todos los tratamientos fueron inoculados con 1000 esporas; posteriormente, se les colocó papel aluminio estéril con ventilación y se mantuvieron en un horno bacteriológico (T° de 30 – 36 °C, HRE 35 – 40 %).

6.5 Inoculación de *F. verticillioides* en grano de maíz

Se preparó una solución de esporas de la misma manera como se describió en el capítulo 6.3, a una concentración de 10,000 esporas por ml. Se inocularon los viales, utilizando la siguiente fórmula para determinación de volumen (27 % Humedad final = HF) (CH= volumen para llegar a humedad final) (H.I= humedad inicial del grano)

$$CH = \left(\left\| \frac{100 - H.I}{100 - H.F} \right\| - 1 \right) \times \text{cantidad de grano}$$

Una vez que se determinó el volumen de requerimiento a H.F de 27 %, se requirió 1.0 ml, y se inocularon los viales de la siguiente manera, CT (Tween al 20 % 900 μ l), Lfb 3 μ M (900 μ l), BA 10 % (900 μ l), AAG 10 % (900 μ l), Lfb 2 μ M (600 μ l) + BA 10 % (300 μ l) y Lfb 2 μ M (600 μ l) + AAG 10 % (300 μ l).

Los tratamientos fueron inoculados con 1000 esporas y se agitaron por 2 minutos, posteriormente se incubaron los viales con papel filtro para su ventilación a T° 30 – 36 °C, HRE 35 – 40 %.

6.6 Lectura en medio líquido

Para realizar la cuantificación de esporas y la medición de pH, se preparó una solución de esporas de cada repetición con el siguiente procedimiento:

1. Se tomaron 10 ml de CPD y fueron filtrados en un embudo y papel filtro.
2. Una vez que se filtraron todas las muestras se centrifugaron (4000 rpm/5 min).
3. Se decantó el líquido sobrenadante quedándose con el botón al fondo del tubo el cual se restituyó con 10 ml/Tween 20 %.
4. Los lavados se repitieron tres veces para posterior lectura.

La cuantificación de esporas se hizo utilizando el mismo método descrito en el capítulo 6.2.

6.7 Lectura en grano de maíz

Para realizar la cuantificación de esporas y la medición de pH, se realizó una solución de esporas de cada repetición siguiendo este procedimiento:

1. Se añadió 10 ml de Tween al 20 % a cada muestra que se fuera a dar lectura y se taparon con un tapón de goma.
2. Se agitaron las muestras por 2 minutos.
3. Se tomó cada muestra y se pasó su contenido por un embudo de plástico con un papel filtro.
4. El contenido fue recolectado en tubos de ensayo de 50 ml.

La cuantificación de esporas se hizo utilizando el mismo método descrito en el capítulo 6.2.

6.8 Pruebas de viabilidad

Durante el curso de este experimento se determinó la viabilidad de las esporas de *F. verticillioides* en cada tratamiento, una vez que se inoculó y se realizó la lectura, en los días 4 y 8 se tomaron 100 µl de esporas los cuales fueron inoculados en agar papa dextrosa (PDA) (3 repeticiones por tratamiento), las observaciones fueron realizadas a las 24, 48 y 72 hrs. después de la inoculación. Dentro de éstas, se evaluó la implantación de alguna estructura micótica con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

7. RESULTADOS

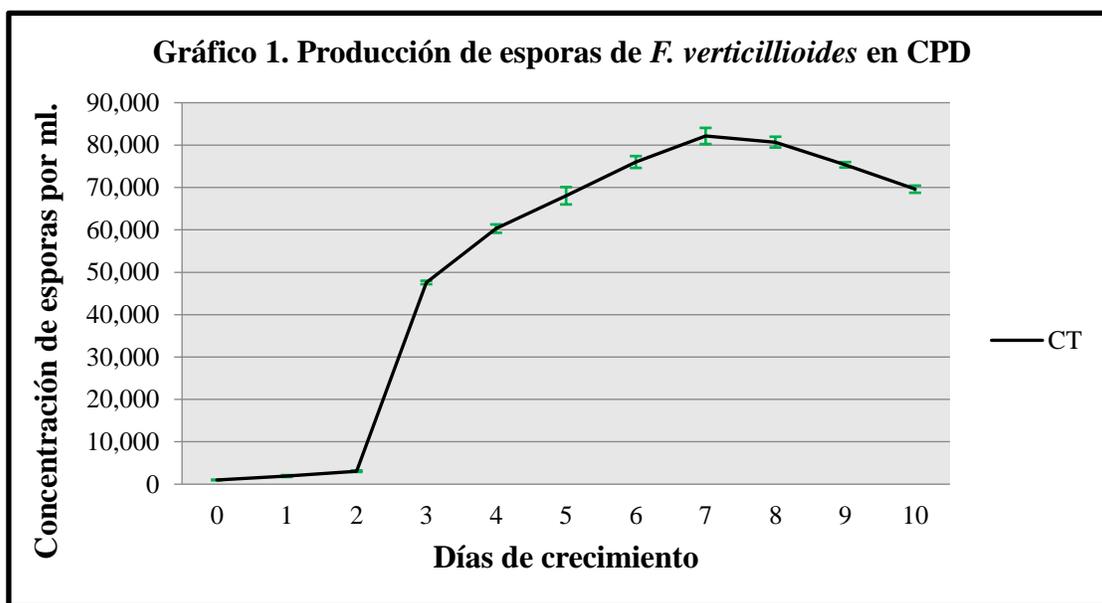
Se elaboró una curva de producción de esporas del hongo, esto con la finalidad de conocer las fases de crecimiento tanto en un medio sintético como lo es el caldo papa dextrosa y en una fuente natural de contaminación como lo es el grano de maíz.

7.1 Curva de producción de esporas CPD

Se estableció la curva de producción de esporas, los días 1 y 2 se estabilizó la producción de esporas representando una fase de latencia, los días 3 – 7 se observa un aumento significativo en su producción, representando una fase exponencial, los días 8 – 10 la producción de esporas disminuyó progresivamente, representando una fase estacionaria con tendencia a muerte. Durante el tratamiento la solución de esporas del hongo mantuvo un rango de pH muy amplio del 5.6 al 7.2, los primeros 2 días el valor del pH es atribuible a las características del medio (pH CPD 5.6), el hongo al crecer de manera exponencial alcaliniza ligeramente el pH llevándolo a un valor cercano del neutro (7.2) para posteriormente ir acidificando el medio. La cuantificación de las esporas y las mediciones de pH para cada día de crecimiento se puede observar en la **Tabla 1. y Gráfico 1.**

Tabla 1. Cuantificación de esporas y pH de *F. verticillioides* CPD

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 ± 0	5.6
1	1,933 ± 208	5.6
2	3,074 ± 173	7.0
3	47,600 ± 400	7.2
4	60,300 ± 990	7.0
5	68,050 ± 2,051	6.6
6	76,010 ± 1,400	6.1
7	82,150 ± 1,909	5.9
8	80,700 ± 1,273	5.8
9	75,530 ± 636	5.9
10	69,600 ± 849	6.0



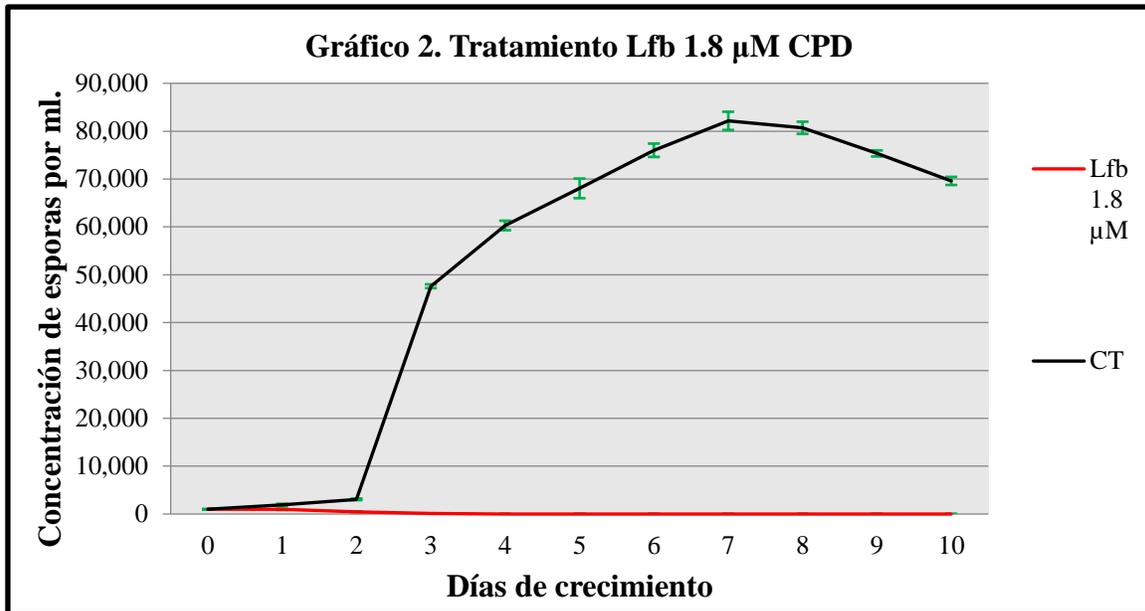
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y, se observa la concentración estimada de esp/ml. La producción de esporas se estabiliza los días 1 y 2, del día 3 – 7 se observa un aumento significativo en la producción de esporas, los días 8 – 10 la producción empieza a disminuir progresivamente.

7.2 Tratamiento Lfb 1.8 μ M CPD

Para poder determinar el efecto de Lfb, se realizó una incubación con *F. verticillioides*. Los efectos de Lfb fueron evidentes a partir del día 2, las concentraciones de esporas disminuyeron de manera progresiva hasta el día 4 donde ya no se encontraron esporas. Durante los primeros 2 días de tratamiento, se presentaron valores de pH influenciados por Lfb reconstituida (pH Lfb 6.5), una vez pasadas las 48 hrs. se observaron los efectos inhibitorios en la producción de esporas, el pH comenzó a subir hasta alcanzar un valor de 8.7 el día 4, posteriormente el pH se mantuvo en rangos de 7.1 a 7.8 con una tendencia ligeramente alcalina. La cuantificación de esporas y las mediciones de pH del tratamiento se puede observar en la **Tabla 2** y **Gráfico 2**.

Tabla 2. Cuantificación de esporas y pH tratamiento Lfb 1.8 μ M CPD

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1000 \pm 0	6.5
1	960 \pm 139	6.5
2	462 \pm 67	7.3
3	96 \pm 13	7.9
4	0 \pm 0	8.7
5	0 \pm 0	7.7
6	0 \pm 0	7.8
7	0 \pm 0	7.8
8	0 \pm 0	7.1
9	0 \pm 0	7.7
10	0 \pm 0	7.8



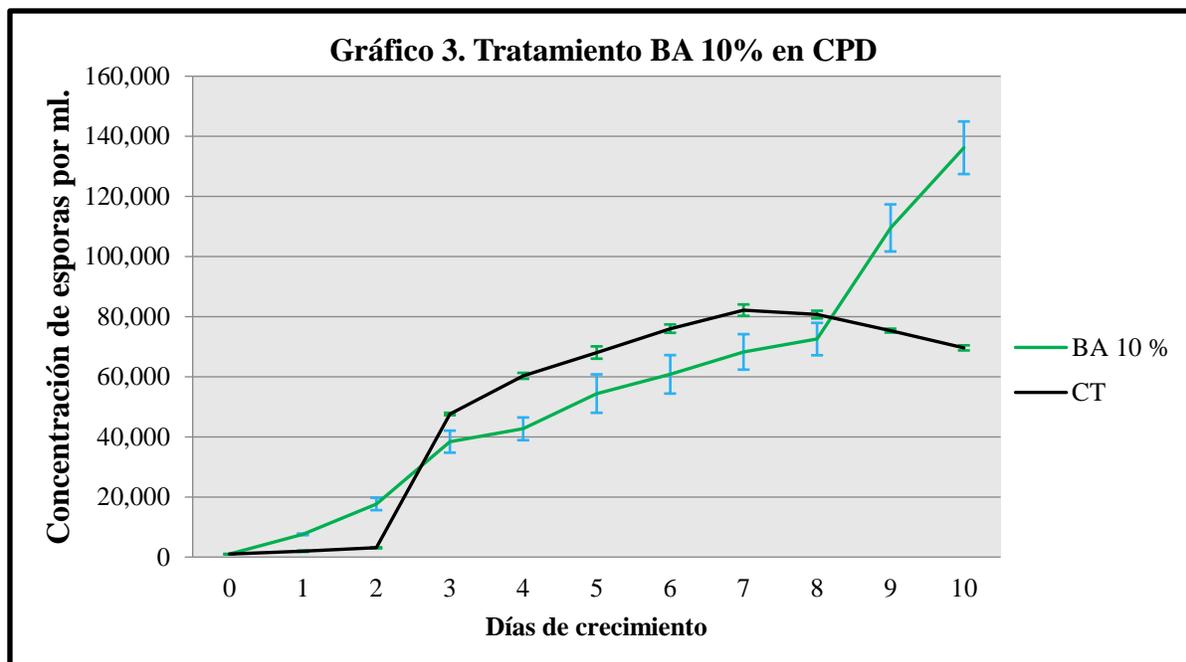
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Se logra observar que no hay aumento en la producción de esporas, a partir del día 4 ya no se observaron esporas viables.

7.3 Tratamiento BA 10 % CPD

Está documentado que las sales de BA son usadas como agentes fungicidas en el campo, por lo que se estudió sus efectos a una concentración del 10 %. En la cuantificación de esporas se observaron en cantidades mayores al tratamiento CT los días 1, 2, 9 y 10 de crecimiento. En este tratamiento los valores de pH tuvieron una tendencia ligeramente ácida, mayormente se mantuvo en rangos de 5.9 a 6.6. El hongo nunca detuvo su producción de esporas, la cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se pueden observar en **Tabla 3** y **Gráfico 3**. De acuerdo con nuestros resultados, las sales de BA no tienen un efecto inhibitor sobre *F. verticillioides* a una concentración del 10 %.

Tabla 3. Cuantificación de esporas y pH tratamiento BA 10 % CPD

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	5.6
1	7,550 \pm 265	6.5
2	17,667 \pm 2,053	7.0
3	38,400 \pm 3,666	6.0
4	42,667 \pm 3,781	7.6
5	54,400 \pm 6,400	5.9
6	60,800 \pm 6,400	6.6
7	68,267 \pm 5,903	6.5
8	72,533 \pm 5,390	6.6
9	109,520 \pm 7,840	7.0
10	136,200 \pm 8,754	7.1



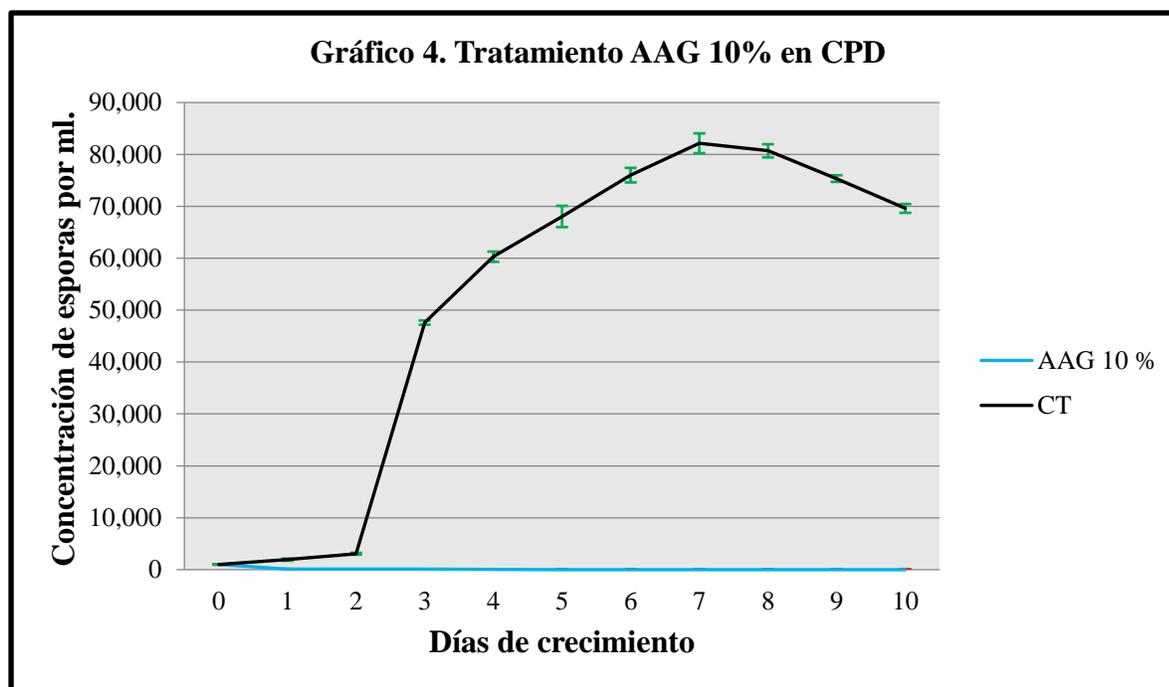
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Se logra observar que el hongo durante los 10 días no dejó de producir esporas.

7.4 Tratamiento AAG 10 % CPD

Se tiene documentado que el AAG tiene efectos tanto fungistáticos como fungicidas, al ser usado de manera frecuente en la industria agrícola, se estudió su efecto en *F. verticillioides*. El AAG mostró efectos inhibitorios significativos a las 24 hrs de su aplicación, las concentraciones de esporas llegaron a 0 de manera progresiva el día 5 del tratamiento. Durante el tratamiento el pH mantuvo una tendencia ácida en rangos de 4.0 a 4.4, es clara la influencia del ácido acético ya que por sí solo la solución al 10 % tiene un valor de pH de 4.0. La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en **Tabla 4.** y **Gráfico 4.**

Tabla 4. Cuantificación de esporas y pH tratamiento AAG 10 % CPD

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 ± 0	4.0
1	128 ± 15	4.0
2	106 ± 11	4.2
3	100 ± 14	4.6
4	60 ± 5	4.4
5	0 ± 0	4.2
6	0 ± 0	4.2
7	0 ± 0	4.2
8	0 ± 0	4.3
9	0 ± 0	4.3
10	0 ± 0	4.4



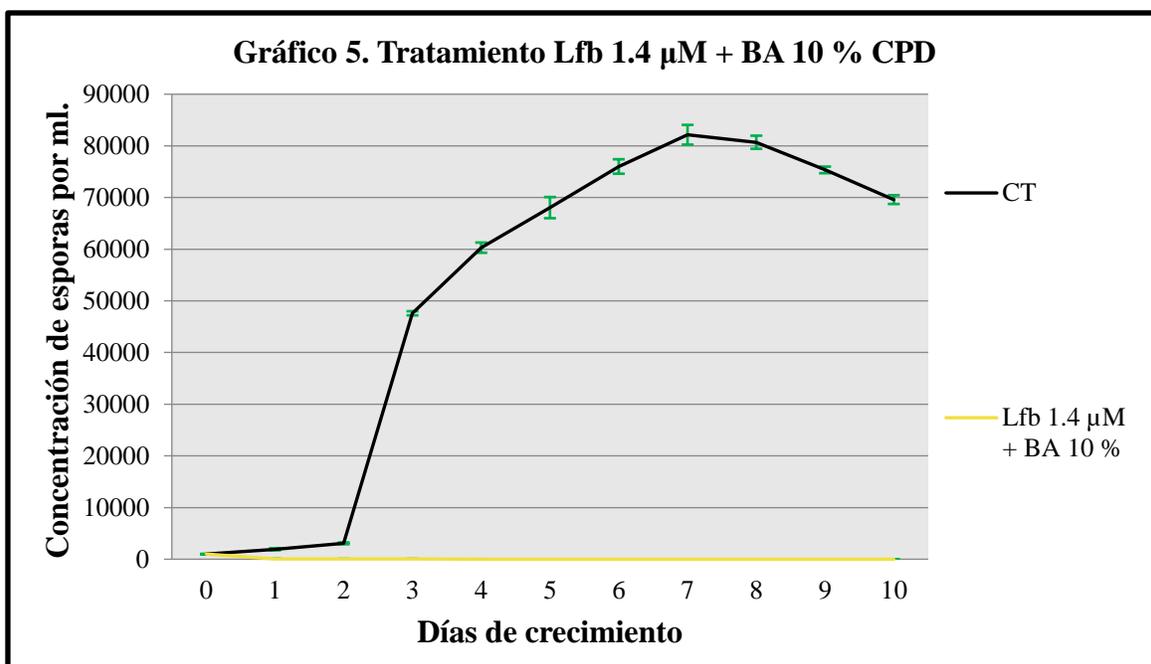
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Los efectos inhibitorios se observan desde el día 1 y se llega a 0 el día 5.

7.5 Tratamiento Lfb 1.4 μ M + BA 10 % CPD

Uno de los objetivos particulares fue estudiar el efecto de sales de BA al 10 % usado en combinación con Lfb a 1.4 μ M, el tratamiento tuvo efectos inhibitorios 24 hrs posteriores a su aplicación, los días posteriores se encontraron cantidades muy bajas de esporas hasta llegar a 0 el día 5. Durante los primeros 5 días de tratamiento el pH tiene una tendencia hacia la alcalinidad (8.0 – 9.0), una vez que se detuvo la producción de esporas por completo el pH comenzó a bajar con una tendencia a lo ácido (5.8 – 6.3). La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en **Tabla 5** y **Gráfico 5**.

Tabla 5. Cuantificación de esporas y pH tratamiento Lfb 1.4 μ M + BA 10 % CPD

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	8.0
1	72 \pm 18	8.2
2	50 \pm 20	8.1
3	50 \pm 20	9.0
4	17 \pm 6	7.8
5	0 \pm 0	7.9
6	0 \pm 0	5.8
7	0 \pm 0	6.1
8	0 \pm 0	6.3
9	0 \pm 0	6.6
10	0 \pm 0	6.3



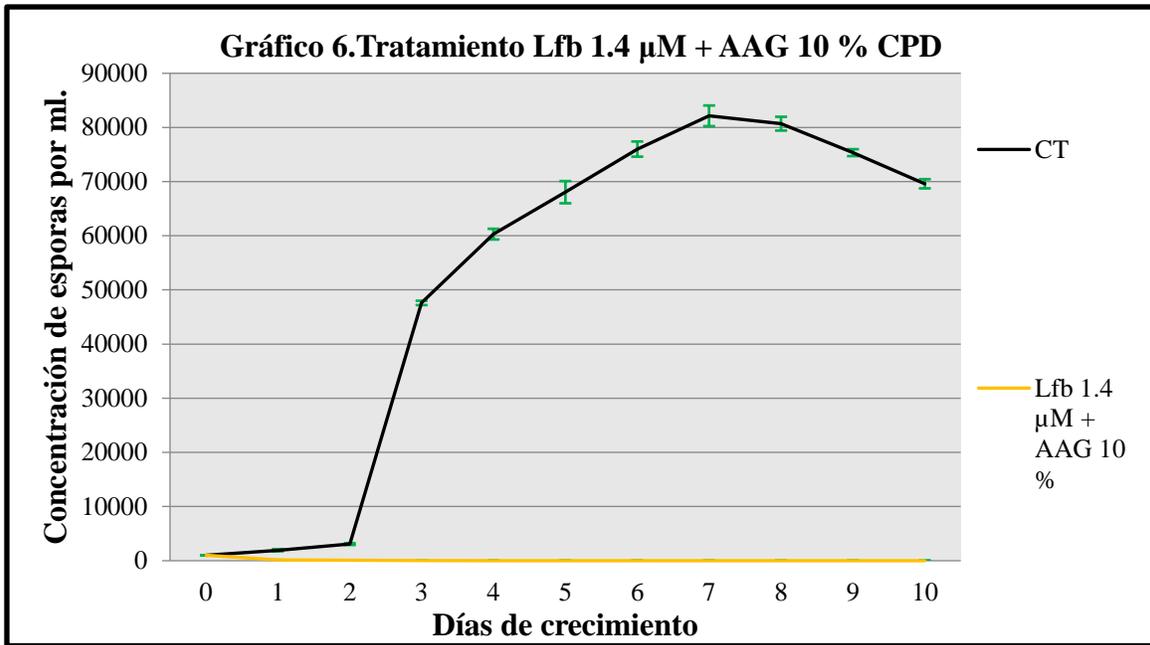
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Desde el día 1 se logra observar un efecto inhibitorio y a partir del día 5 ya no hay crecimiento alguno.

7.6 Tratamiento Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % CPD

Se estudió el efecto en conjunto de Lfb 1.4 μ M + AAG 10 %, se observaron efectos inhibitorios en la producción de esporas a las 24 hrs del tratamiento, la concentración de esporas disminuyó de forma progresiva hasta el día 4, en este, ya no se observaron esporas. En este tratamiento el rango de pH no fue tan variable, mayoritariamente tuvo una tendencia ácida, la influencia de Lfb genera un aumento en el valor del pH del ácido acético glacial, ya que al comienzo el pH tuvo un valor de 5.0 y con el paso de los días fue tendiendo a acidificarse, oscilando mayormente entre 4.6 – 4.8. La cuantificación de esporas de todo el tratamiento y las mediciones de pH se puede observar en la **Tabla 6** y **Gráfico 6**.

Tabla 6. Cuantificación de esporas y pH tratamiento Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % CPD

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	5.0
1	123 \pm 5	5.0
2	67 \pm 6	5.1
3	20 \pm 10	5.1
4	0 \pm 0	4.3
5	0 \pm 0	4.8
6	0 \pm 0	4.7
7	0 \pm 0	4.6
8	0 \pm 0	4.6
9	0 \pm 0	4.7
10	0 \pm 0	4.8



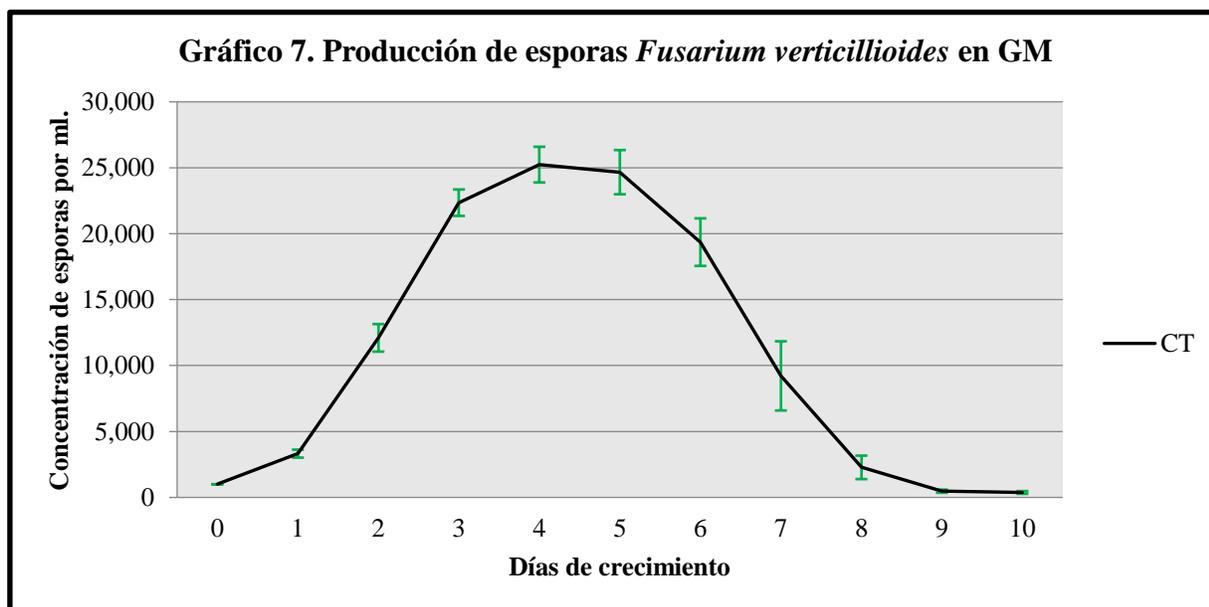
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Desde el día 1 se logra observar un efecto inhibitorio y a partir del día 4 ya no hay crecimiento alguno.

7.7 Curva de producción de esporas de *F. verticillioides* GM

Se decidió usar granos de maíz al ser el principal cereal que suele ser infectado en forma natural por *F. verticillioides*, se estableció la curva de producción de esporas, la producción de esporas se estabilizó el día 1 representando una fase de latencia, los días 2 – 4 aumentó de forma significativa la producción de esporas, representando una fase exponencial, la producción fue disminuyendo los días 5 y 6 representando una fase estacionaria y a partir del día 7 - 10 la producción de esporas fue disminuyendo de forma progresiva, representando una fase de muerte. Durante este experimento el pH tuvo una tendencia neutra 7.0 - 7.6. La cuantificación de esporas y las mediciones de pH para cada día se pueden observar en la **Tabla 7** y **Gráfico 7**.

Tabla 7. Cuantificación de esporas y pH *F. verticillioides* en GM

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 ± 0	7.4
1	3,320 ± 303	7.9
2	12,100 ± 1,046	7.7
3	22,352 ± 1,003	7.1
4	25,240 ± 1,353	7.4
5	24,667 ± 1,677	7.4
6	19,360 ± 1,803	7.0
7	9,216 ± 2,623	7.0
8	2,280 ± 890	7.2
9	472 ± 119	7.7
10	376 ± 106	7.6



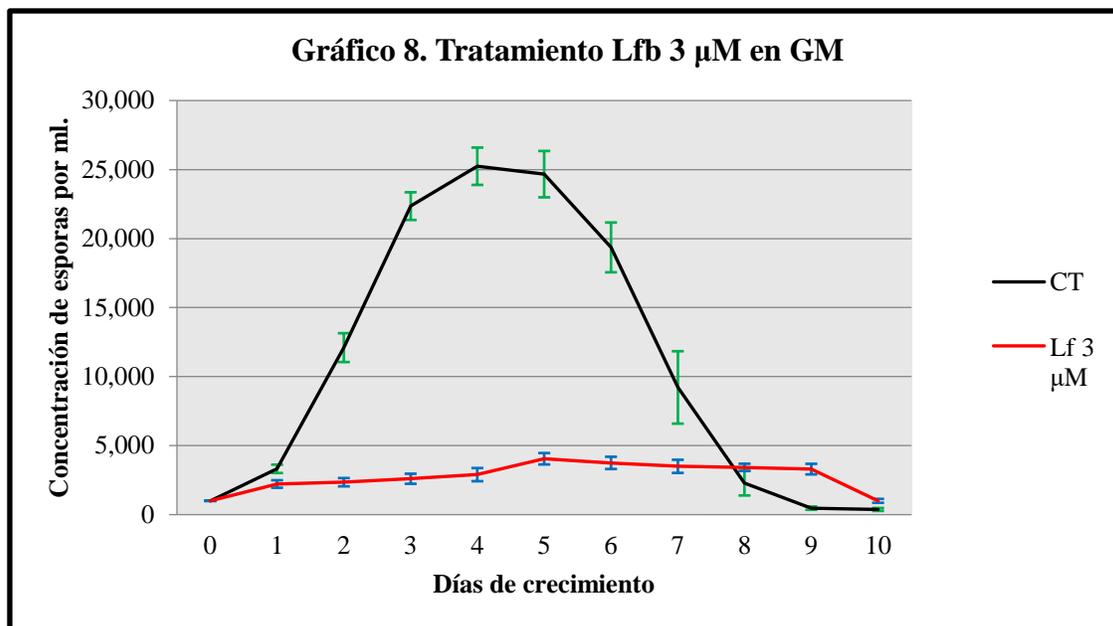
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. La producción de esporas se estabiliza el día 1, aumenta de forma exponencial del día 2 al 4 y disminuye progresivamente del 5 al 10.

7.8 Tratamiento Lfb 3 μ M GM

El tratamiento de Lfb 3 μ M demostró efectos inhibitorios durante los 10 días, las concentraciones de esporas fueron variables, el punto máximo fue el día 5 y el mínimo el día 10, a pesar de que no se llegaron a encontrar muestras sin esporas la viabilidad de éstas fue puesta a prueba. Durante este tratamiento el pH tuvo una tendencia neutra mayormente, se mantuvo en rangos de 7.0 a 7.4, las primeras 48 horas el medio tuvo una ligera tendencia hacia lo alcalino (7.7 – 7.9). La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en la **Tabla 8** y **Gráfico 8**.

Tabla 8. Cuantificación de esporas y pH tratamiento Lfb 3 μ M GM

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	7.6
1	2,222 \pm 273	7.9
2	2,350 \pm 300	7.7
3	2,600 \pm 365	7.1
4	2,900 \pm 476	7.4
5	4,050 \pm 412	7.4
6	3,750 \pm 443	7.0
7	3,500 \pm 476	7.0
8	3,425 \pm 263	7.2
9	3,300 \pm 383	7.7
10	1,000 \pm 141	7.6



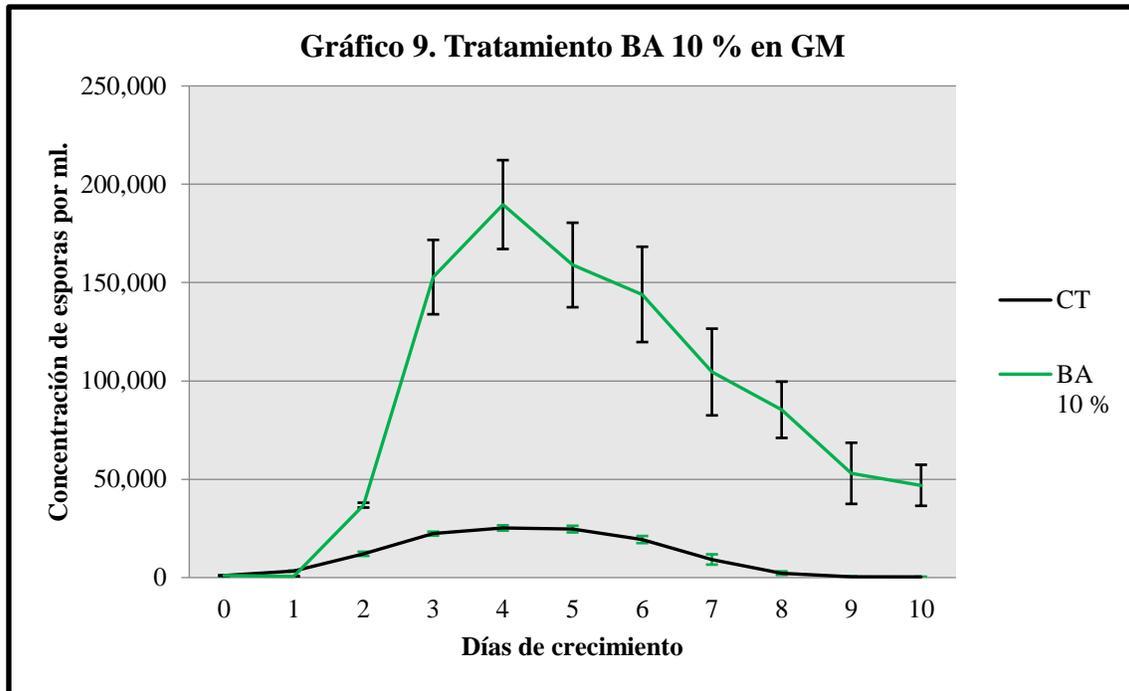
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. La producción de esporas parece no detenerse durante el tratamiento, las cantidades son variables el día máximo es el 5 y el mínimo el día 10.

7.9 Tratamiento BA 10 % GM

Durante el tratamiento BA 10 % se observó un efecto inhibitor a las 24 hrs del tratamiento, la producción de esporas aumentó con mayor vigor del día 2 al 10, nunca se observó una disminución en la producción de esporas. La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en la **Tabla 9** y **Gráfico 9**.

Tabla 9. Cuantificación de esporas de BA 10 % cultivado en GM

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	7.4
1	640 \pm 89	6.4
2	36,850 \pm 1,226	7.0
3	152,800 \pm 18,909	7.2
4	189,667 \pm 22,598	7.1
5	158,950 \pm 21,483	7.4
6	144,000 \pm 24,230	7.1
7	104,533 \pm 22,047	6.9
8	85,333 \pm 14,311	6.8
9	53,029 \pm 15,552	7.0
10	46,933 \pm 10,451	6.8



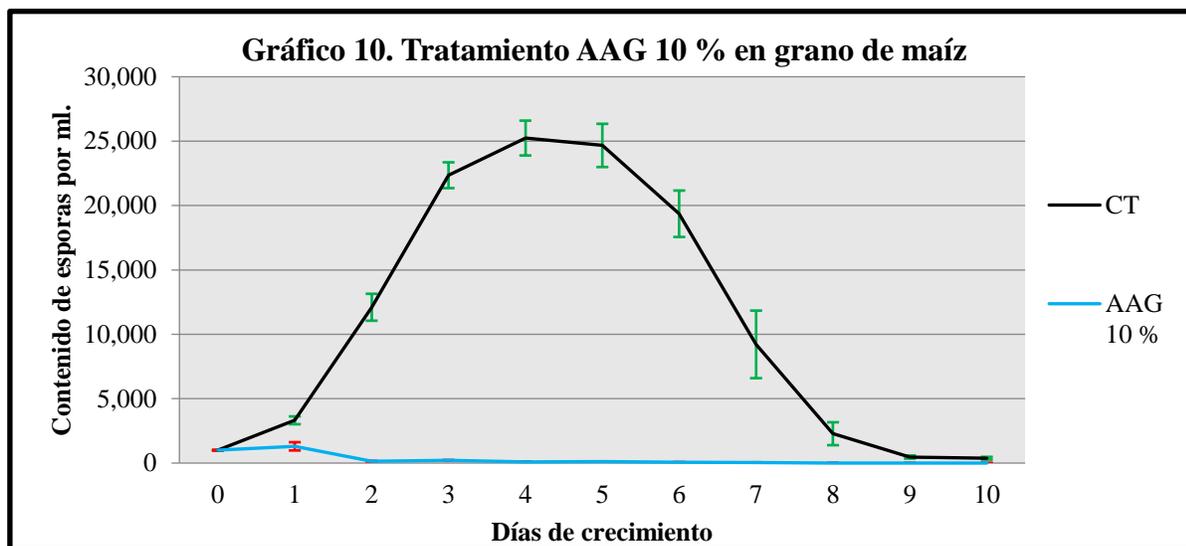
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Se pueden apreciar efectos inhibitorios a las 24 hrs, a partir del día 2 no disminuyó la producción de esporas se realizó con mayor vigor.

7.10 Tratamiento AAG 10 % GM

El tratamiento AAG 10 % tiene efectos inhibitorios en las primeras 24 hrs, los cuales son más notorios a partir del día 2, la producción de esporas disminuyó de manera progresiva a 0 el día 8. Durante este tratamiento el pH fue variable, comenzó con un valor de 4.0 seguramente por la influencia del ácido acético (pH 4.0 AAG), una vez pasaron las primeras 72 hrs, el pH comenzó a ascender y a oscilar los días posteriores en rangos de 6.0 – 6.4. La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en la **Tabla 10 y Gráfico 10**.

Tabla 10. Cuantificación de esporas y pH tratamiento AAG 10 % GM

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 ± 0	4.0
1	1,300 ± 321	4.0
2	150 ± 17	4.3
3	207 ± 30	4.8
4	100 ± 26	4.5
5	110 ± 20	4.9
6	56 ± 22	5.4
7	35 ± 25	6.0
8	0 ± 0	6.0
9	0 ± 0	6.3
10	0 ± 0	6.1



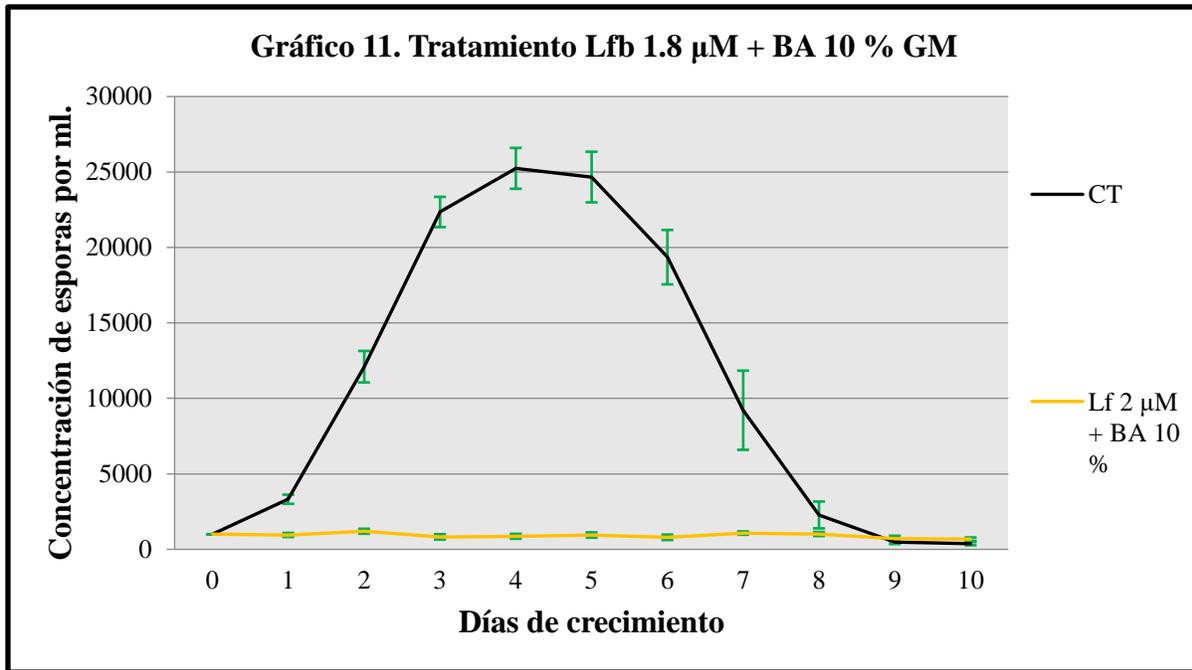
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Se logra observar que a partir del día 8 no hay crecimiento fúngico.

7.11 Tratamiento Lfb 2 μ M + BA 10 % GM

Al usar Lfb 2 μ M + BA 10 % se observaron efectos inhibitorios en todos los días del tratamiento. Las concentraciones de esporas fueron variables, pero nunca tuvieron un aumento significativo u exponencial. El pH del tratamiento fue variable, los primeros 4 días tuvo una tendencia hacia lo alcalino (7.9), posteriormente se fue manteniendo en rangos con tendencia a lo neutro (7.4 – 7.7). La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en la **Tabla 11** y **Gráfico 11**.

Tabla 11. Cuantificación de esporas y mediciones de pH tratamiento Lfb 2 μ M + BA 10 % GM

Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	6.5
1	956 \pm 133	6.9
2	1,200 \pm 163	7.7
3	829 \pm 180	7.7
4	867 \pm 163	7.9
5	950 \pm 176	7.4
6	800 \pm 179	7.4
7	1,080 \pm 110	6.8
8	1,017 \pm 133	7.7
9	720 \pm 179	7.6
10	680 \pm 110	7.6



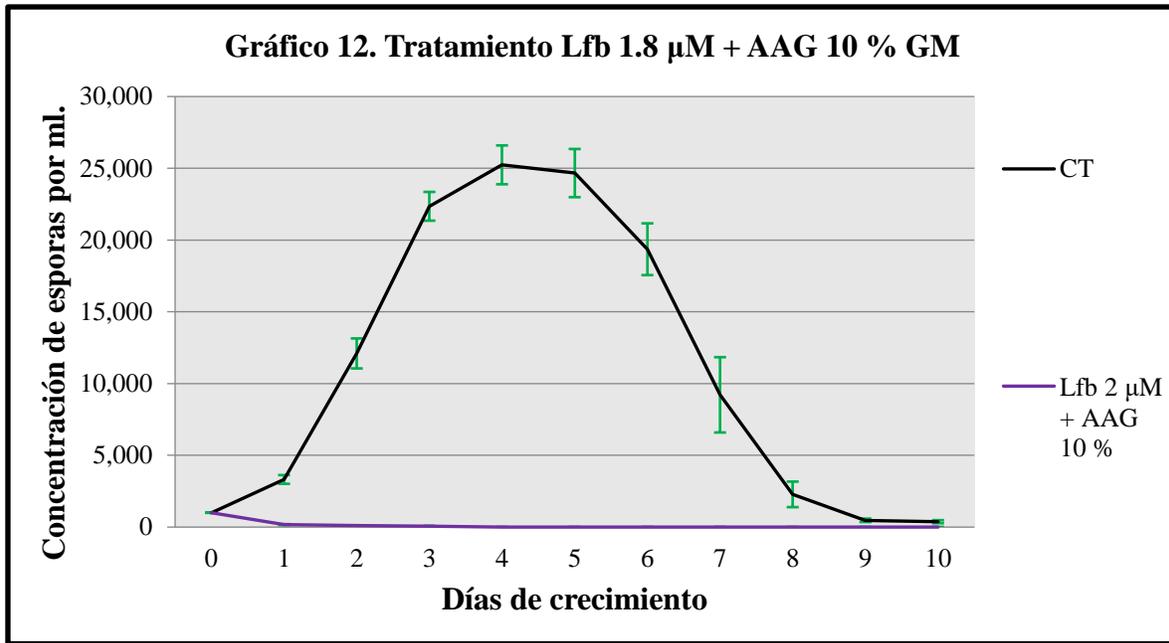
En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. La producción de esporas fue variable no aumento, se mantuvo la mayor parte en concentraciones menores a las de inoculación.

7.12 Tratamiento Lfb 2 μ M + AAG 10 % GM

Al usar AAG 10 % en combinación con Lfb 2 μ M, la producción de esporas disminuyó en las primeras 24 hrs, al día 4 ya no se encontró espóra alguna. En este tratamiento el rango de pH fue variable, comenzó con un valor tendiendo a lo ácido (4.6) posteriormente fue alcalinizándose hasta llegar a 6.8, para ese momento las muestras ya no tenían esporas. La cuantificación de esporas y las mediciones de pH de todo el tratamiento se puede observar en la **Tabla 12** y **Gráfico 12**.

Tabla 12. Cuantificación de esporas y mediciones de pH tratamiento Lfb 2 μ M + AAG 10 % GM

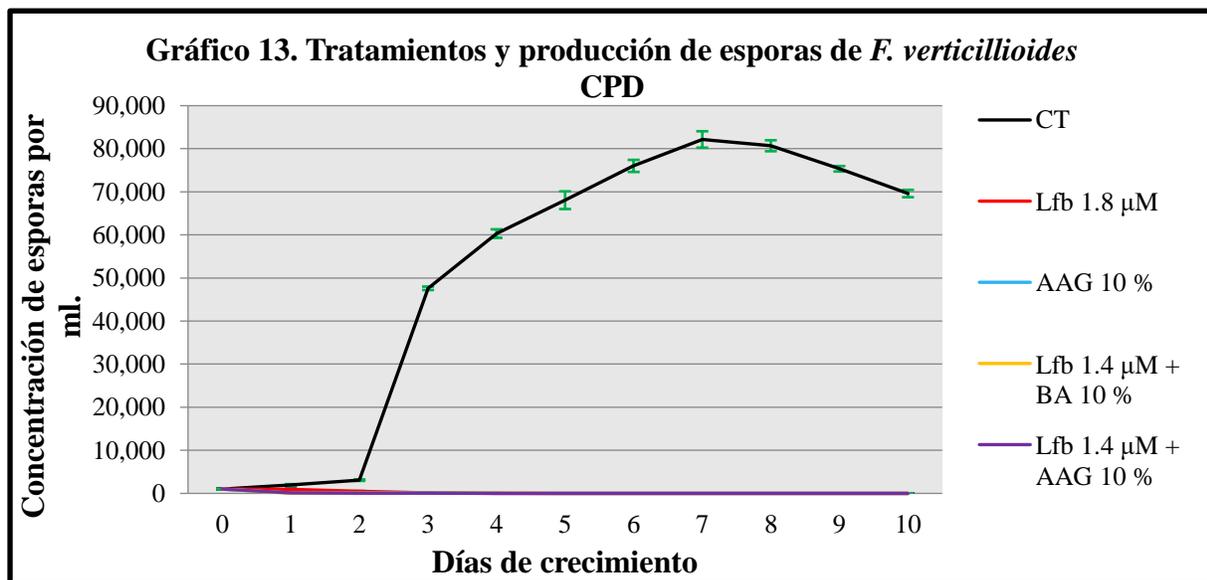
Día de crecimiento	Esporas/ml	pH
0	1,000 \pm 0	4.6
1	173 \pm 33	5.2
2	104 \pm 22	5.7
3	67 \pm 24	6.1
4	0 \pm 0	6.3
5	0 \pm 0	6.5
6	0 \pm 0	6.5
7	0 \pm 0	6.4
8	0 \pm 0	6.8
9	0 \pm 0	6.6
10	0 \pm 0	6.5



En el eje de las X se muestran los días de crecimiento y en el eje de las Y se observa la concentración estimada de esporas por ml. Se observa una disminución en la producción de esporas desde el día 1 y continúa hasta el día 4 donde ya no hay esporas.

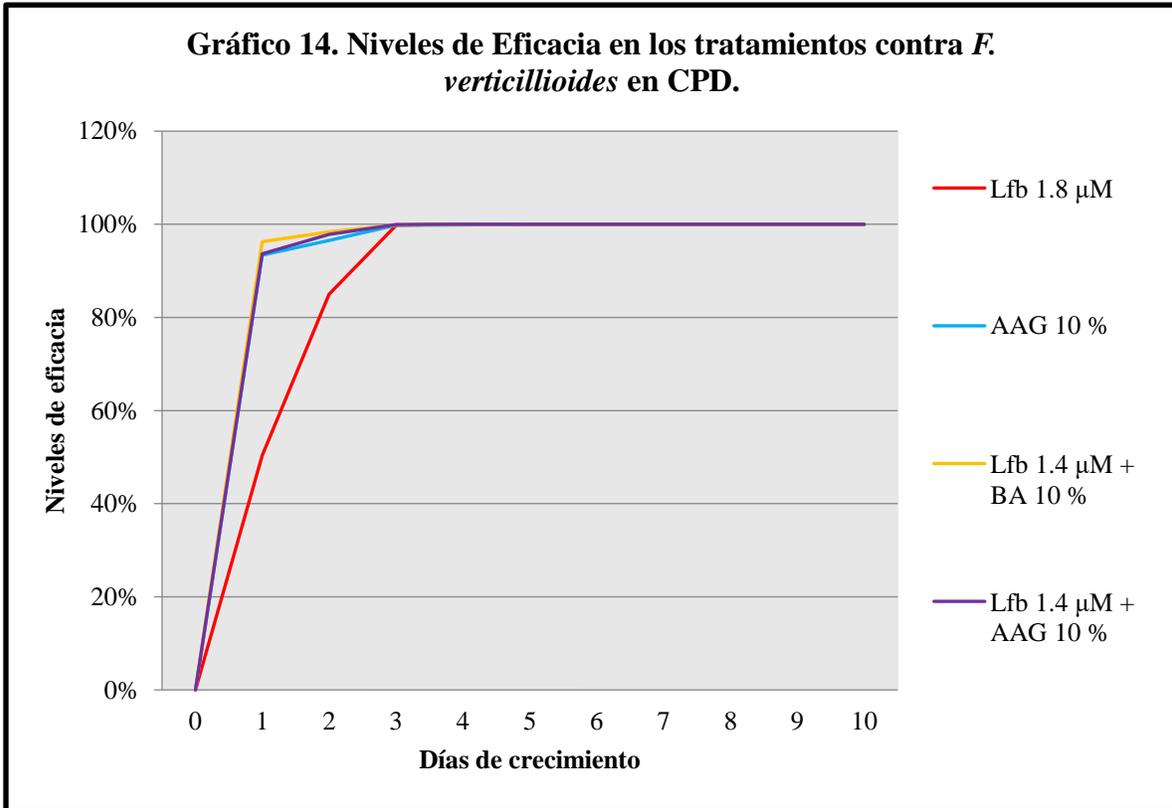
7.13 Tratamientos en CPD compilados

Se puede observar en el **Gráfico 13.** todos los tratamientos con resultados favorables realizados en CPD, el único tratamiento que no tuvo una respuesta favorable fue el de BA 10 %, ya que mantiene un crecimiento mayor al tratamiento CT como se puede observar en el **Gráfico 3.**, tanto los tratamientos de Lfb 1.8 μ M, AAG 10 %, Lfb 1.4 μ M + BA 10 % y Lfb 1.4 μ M + AAG 10 % tuvieron un efecto inhibitor en el crecimiento de *F. verticillioides*.



En el eje de las X se encuentran los días de crecimiento y en el eje de las Y la concentración de esporas por ml.

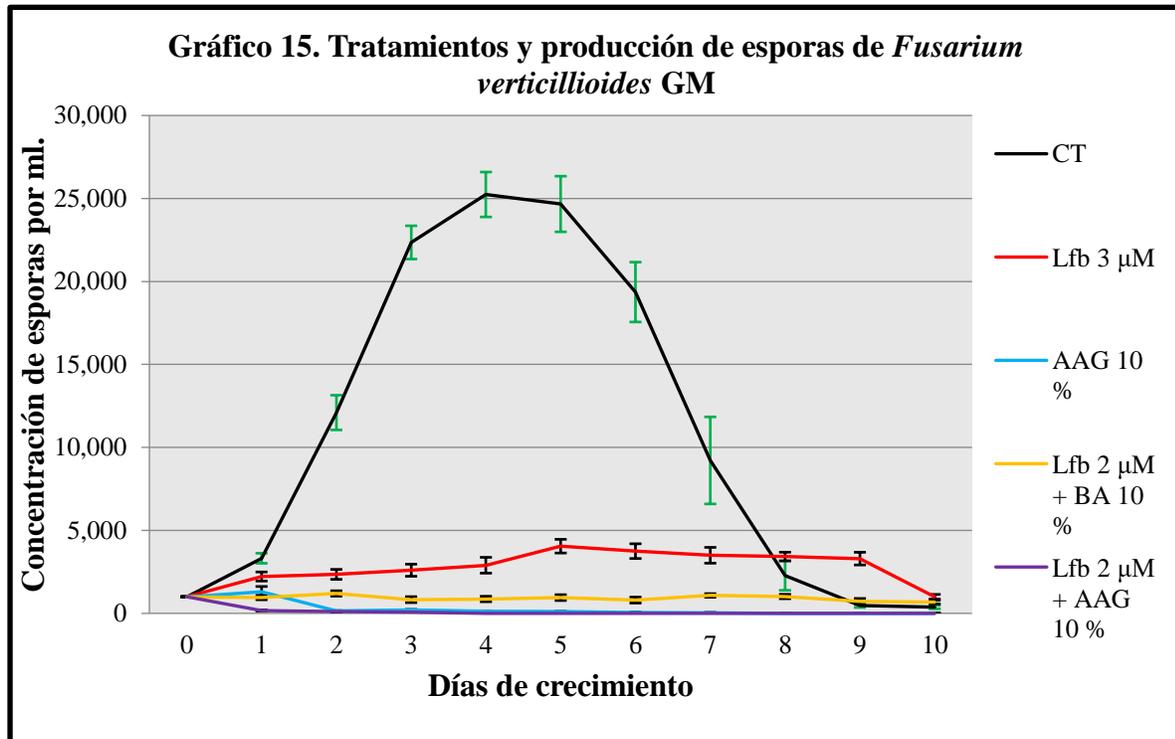
Se establecieron los niveles de eficiencia de cada tratamiento destacando Lfb 1.8 μM , AAG 10 %, Lfb 1.4 μM + BA 10 % y Lfb 1.4 μM + AAG 10 %, estos tratamientos llegaron a un nivel de eficiencia del 100 % a las 72 hrs, el tratamiento que destacó mayormente por haber tenido mayor eficacia a las 24 hrs fue Lfb 1.4 μM + BA 10 % (96 %), seguido de los tratamientos Lfb 1.4 μM + AAG 10 % (94 %) y AAG 10 % (93 %), esto se puede observar en **Gráfico 14**.



En el eje de las X se encuentran los días de crecimiento y en el eje de las Y los niveles de eficacia de cada tratamiento con efectos inhibitorios.

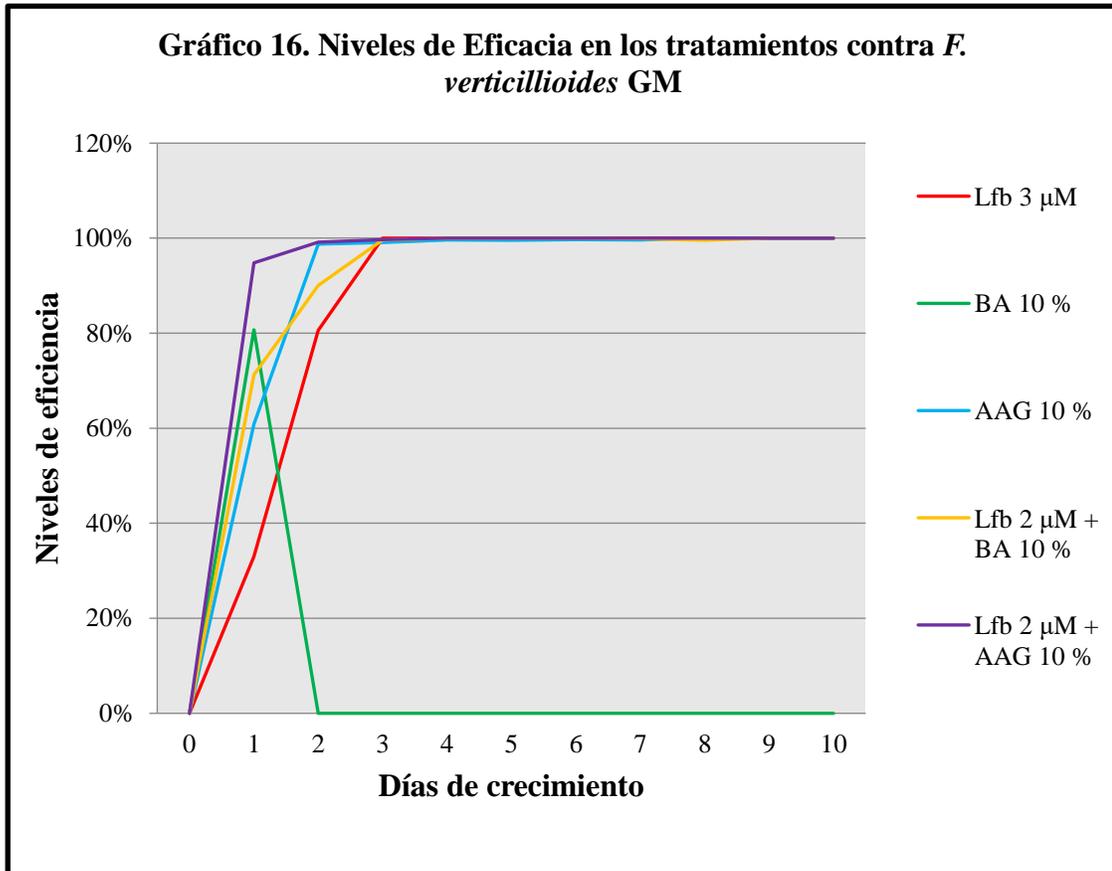
7.14 Tratamientos en GM compilados

En el **Gráfico 15**, se observan todos los tratamientos con resultados favorables realizados en grano de maíz, al igual que en CPD el único tratamiento que no tuvo una respuesta favorable fue el de BA 10 % como se puede observar en la **Gráfica 9.**, mantiene un crecimiento mayor a CT, tanto los tratamientos de Lfb 3 μ M, AAG 10 %, Lfb 2 μ M + BA 10 % y Lfb 2 μ M + AAG 10 % tuvieron un efecto inhibitor en el crecimiento de *F. verticillioides*.



En el eje de las X se encuentran los días de crecimiento y en el eje de las Y la concentración de esporas por ml.

Se establecieron los niveles de eficiencia de cada tratamiento destacando Lfb 3 μM , AAG 10 %, Lfb 2 μM + BA 10 % y Lfb 2 μM + AAG 10 %, estos tratamientos llegaron a un nivel de eficiencia del 100 %, los tratamientos que destacaron mayormente por haber tenido mayor eficacia a las 24 hrs fue Lfb 1.4 μM + AAG 10 % (95 %), seguido de los tratamientos Lfb 1.4 μM + BA 10 % (71 %) y AAG 10 % (61 %), todos los niveles de eficacia se pueden observar en el **Gráfico 16**.



En el eje de las “X” se encuentran los días de crecimiento y en el eje de las “Y” el nivel de eficiencia.

7.15 Pruebas de viabilidad

En la **Tabla 13.** se muestran los resultados de la viabilidad de *F. verticillioides* a 4 y 8 días de crecimiento en CPD, las esporas fueron cultivadas en viales con PDA, los resultados fueron iguales para ambos días, el único tratamiento que mostró crecimiento a las 24 - 72 hrs de su inoculación fue BA 10 %, tanto los días 4 como el 8.

Tabla 13. Pruebas de viabilidad en *F. verticillioides* tratamientos cultivados en CPD a 4 y 8 días de crecimiento

Tratamiento	Crecimiento a 24 hrs	Crecimiento a 48 hrs	Crecimiento a 72 hrs
Lfb 1.8 μ M	-	-	-
BA 10 %	+	++	+++
AAG 10 %	-	-	-
Lfb 1.4 μ M + BA 10 %	-	-	-
Lfb 1.4 μ M + AAG 10 %	-	-	-

La nomenclatura para registrar los resultados fue la siguiente: +: crecimiento apenas visible, ++: crecimiento moderado, +++: crecimiento abundante, -: sin crecimiento

En cuanto a los resultados de viabilidad de *F. verticillioides* en los tratamientos realizados en grano de maíz, estos fueron iguales tanto para el día 4 y 8 de crecimiento, las esporas fueron cultivadas en viales con PDA, el tratamiento que mostró crecimiento a las 48 – 72 hrs de su inoculación fue BA 10 %, esto se puede observar en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Pruebas de viabilidad en *F. verticillioides* tratamientos cultivados en grano de maíz a 4 y 8 días de crecimiento

Tratamiento	Crecimiento a 24 hrs	Crecimiento a 48 hrs	Crecimiento a 72 hrs
Lfb 3 μ M	-	-	-
BA 10 %	-	+	++
AAG 10 %	-	-	-
Lfb 2 μ M + BA 10 %	-	-	-
Lfb 2 μ M + AAG 10 %	-	-	-

La nomenclatura para registrar los resultados fue la siguiente: +: crecimiento apenas visible, ++: crecimiento moderado, +++: crecimiento abundante, -: sin crecimiento

8. DISCUSIÓN

El hongo *F. verticillioides*, es el principal patógeno del maíz, se distribuye ampliamente en zonas tropicales y subtropicales, tiene una gran capacidad toxigénica y de resistencia a los fungicidas, razón por la cual se decidió probar una nueva alternativa para la prevención y control de la infección del maíz (Chavarrí et al., 2017; de la Torre-Hernández et al., 2014).

Es importante resaltar que este es el primer estudio en hacer uso conjunto de Lfb y BA junto con AAG, además de ser de los primeros en reportar los efectos de Lfb, BA, Lfb + BA y Lfb + AAG sobre *F. verticillioides* en condiciones *In vitro*. A pesar de no haber estudios que coincidan rigurosamente con las condiciones y las variables de estos experimentos, se determinaron los efectos para cada tratamiento de acuerdo con la producción de esporas y las pruebas de viabilidad.

La Lfb tiene un efecto fungicida a concentraciones de 1.8 μM (CPD) y 3 μM (GM), al transcurrir 72 hrs de la aplicación del tratamiento en condiciones *In vitro*. Actualmente no existe algún otro trabajo donde se haya buscado inhibir el crecimiento de *F. verticillioides* usando Lfb, aunque sí se han realizado estudios de Lf en otras especies de *Fusarium*, tal es el caso de Han y col., en 2012, demostraron que Lfb tiene un efecto fungicida en *F. graminearum*, incluso a concentraciones más bajas que las empleadas en este estudio, ellos usaron extractos proteicos de trigo transgénico capaz de expresar a Lfb a concentraciones de 0.25 – 0.80 nM/mg (0.00025 - 0.00080 μM) de tejido de hoja, que había sido previamente inoculado con esporas de *F. graminearum*, para realizar un ensayo de difusión en gel en agar, al igual que este estudio una vez que pasaron 8 días determinaron que las esporas eran inviables (Han et al., 2012).

Se han clasificado diferentes mecanismos por los que la Lf tiene actividad antifúngica, los estudios que proponen dichos mecanismos fueron realizados en diversas especies fúngicas, mayormente en levaduras, en la mayoría se usa Lactoferrina proveniente de humanos, a pesar de eso no se descarta que, *F. verticillioides* haya sufrido alguno de los mecanismos que se discutirán a continuación, ya que comparte algunas características que son generales para los hongos y dichas características están relacionadas con los mecanismos antifúngicos de la Lf.

Como cualquier organismo vivo (dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento) *F. verticillioides* necesita hierro para su crecimiento, generalmente los hongos requieren una concentración de hierro de 1 – 3 μM para mantener sus funciones metabólicas, posiblemente la Lfb disminuyó las concentraciones de hierro (CPD 0.28 μM y GM 2.5 μM) en ambos medios para inhibir el crecimiento del hongo, este es el principal mecanismo antifúngico de la Lf, e incluso se ha observado usando concentraciones de Lf menores a las de este estudio, el primero en reportarlo fue Kirkpatrick y col., en 1971, usaron Lactoferrina humana (Lfh) a concentraciones de 4.92 nM (0.00492 μM) proveniente de fluidos salivales parótidos para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, ellos observaron una inhibición del crecimiento contabilizando las células fúngicas y le atribuyeron este efecto inhibitorio a la capacidad de secuestrar hierro de Lf, ya que al enriquecer con hierro el cultivo previamente inhibido volvía a crecer (Kirkpatrick et al., 1971; Walker & White, 2017).

La estructura básica de los hongos filamentosos (*F. verticillioides*) es la hifa, una célula cilíndrica con una punta característica, las hifas extienden su crecimiento por la punta en un proceso que

abarca el transporte polarizado de vesículas a los sitios de crecimiento, donde se fusionan para asegurar la deposición de la membrana plasmática y la pared celular. La membrana plasmática es una bicapa lípida conformada por fosfolípidos, glucolípidos, lípidos neutros como los esteroides (ergosterol y zosterol) y proteínas en igual cantidad de promedio, se conocen cerca de 200 tipos de proteínas presentes en la membrana, entre ellos se encuentran las glucoproteínas, de acuerdo a su ubicación las proteínas pueden clasificarse en periféricas o transmembranales, entre estas se destacan receptores como proteasas, fosfolipasas, ATPasa, la composición de la membrana plasmática suele ser similar en la mayoría de los hongos, caso contrario con la pared celular, la cual está conformada principalmente por polisacáridos (quitina, glucano, manano, celulosa, quitosan) y proteínas (glucoproteínas), se ha observado que la composición de los polisacáridos puede variar de acuerdo al grupo taxonómico, para el caso de los hongos ascomicetos (mismos a los que pertenecen *F. verticillioides*, *Candida spp* y *Saccharomyces cerevisiae*), los polisacáridos principales son quitina y glucano (Cepero de García et al., 2012).

Tomando en cuenta lo mencionado, es posible que Lfb haya interactuado con las hifas de *F. verticillioides* y que la producción de esporas se vio afectada por los mecanismos antifúngicos de Lfb, los cuales además del secuestro de hierro, pueden incluir una alteración directa con la superficie fúngica (pared celular y membrana plasmática); Nikawa y col., en 1993, usaron Lfh concentraciones más bajas a las empleadas en este estudio, de 0.06 μM , 0.12 μM y 0.24 μM para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* y *Candida krusei*, estas fueron inoculadas a una concentración de 5000 U.F.C., junto con Lfh, observando diversos niveles de efectividad que son similares a los obtenidos en este estudio (50 – 100 %), en la inhibición del crecimiento de las levaduras, que van desde el 50 al 98 %, además mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), observaron que en las cepas de *C. albicans* y *C. krusei* más susceptibles tratadas con Lfh, había ampollas superficiales y agregados similares a ampollas en la superficie celular. También, mediante el análisis de las proteínas sobrenadantes, se determinó que había fuga de proteínas en las cepas sensibles, lo que indica una alteración de la permeabilidad de la superficie del hongo (Nikawa et al., 1993).

Algunos otros posibles efectos que Lfb pudo tener en *F. verticillioides* están relacionados con el funcionamiento del metabolismo fúngico y la regulación de la muerte celular, procesos que son muy similares en la mayoría de los ascomicetos, en 2016, Acosta-Zaldívar y col., a través de recuentos en placa observaron un 65 % de inhibición (menor al de este estudio) en la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* usando una concentración de Lfh mayor a las de este estudio 6.25 μM , se caracterizó el proceso de muerte fúngica al agregar cicloheximida (inhibe la glucólisis e induce depleción de ATP), observaron que atenuó el efecto de Lfh, indicando que la muerte celular requiere la participación activa de la maquinaria celular, dependiendo de la síntesis de nuevas proteínas y del metabolismo energético. Todavía cabe señalar que caracterizaron más el fenómeno de muerte, ya que investigaron si se expresaban marcadores apoptóticos, lograron observar condensación de cromatina, acumulación de radicales superóxidos (ROS) y liberación del citocromo C (permeabiliza la membrana mitocondrial), lo que favoreció la muerte celular, aunque se conservó la estructura orgánica de la levadura (Acosta-Zaldívar et al., 2016; Cepero de García et al., 2012).

Los estudios más recientes sugieren que en adición a los efectos de Lf, está tiene como blanco la proteína translocadora de protones ATPasa (H^+ -ATPasa), estas proteínas de membrana tienen un papel importante en la fisiología fúngica, de manera general, regulan el crecimiento celular, el pH intracelular y la actividad de las serina/treonina proteincinasas, mediante la producción y el mantenimiento de un gradiente electroquímico de protones transmembranal que impulsa la captación de una serie de iones y nutrientes, lamentablemente la función y la regulación de estas proteínas ha sido poco estudiada en hongos filamentosos, aunque se ha documentado la posibilidad de que estas proteínas puedan regular la biosíntesis de metabolitos secundarios (micotoxinas), en *Salvia miltiorrhiza*, la proteína de membrana plasmática SmPHA4, regula negativamente la biosíntesis de tanshinones, por otro lado en *F. graminearum* se han asociado estas proteínas con la vía biosintética de DON, aunque se requieren mayores estudios para comprender mejor esta función, y además se desconoce cuáles sean las proteínas translocadoras de protones de *F. verticillioides*, se infirió que, posiblemente Lfb haya afectado a las proteínas del hongo, ya que existen estas proteínas en una especie similar (*F. graminearum*), en 2016, Andrés y col., usaron Lfh a concentraciones de 5 μ M (ligeramente mayores a las de este estudio) en cultivos de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, de manera similar, observaron una inhibición de la viabilidad del 93 – 96 % y además, observaron que la Lf inhibe la proteína Pma1p, provocando acumulación de protones como consecuencia del metabolismo activo, disminución del pH, salida de K^+ , mediada por sus propios canales K^+ y la despolarización de la membrana. La salida de K^+ citoplasmático facilitó el flujo de salida de K^+ desde la matriz mitocondrial a través del antiportador mitocondrial K^+/H^+ , lo que facilitó la acidificación de la matriz mitocondrial debido a la salida de K^+ mitocondrial que podría compensarse con la reentrada masiva de H^+ a través de la ATPasa (ATP sintasa mitocondrial), estableciendo dos bucles de retroalimentación positiva acoplados de K^+/H^+ citoplásmico y mitocondrial. La supuesta acidificación intramitocondrial (inundación de protones mitocondriales) es la señal crítica y desencadenante que conduce a los pasos posteriores de muerte celular apoptótica (Andrés et al., 2016; Wu et al., 2022).

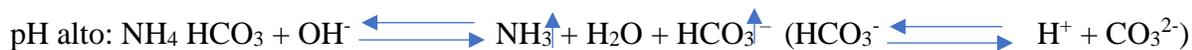
En cuanto a los resultados de BA 10 % estos no fueron favorables, *F. verticillioides* produjo esporas con mayor vigor en ambos medios de cultivo, además de que las esporas de los tratamientos resultaron viables a las 24 hrs para CPD y a las 48 hrs para GM. Actualmente no existe algún trabajo que haya usado BA en *F. verticillioides*, no obstante, se han realizado observaciones similares en estudios como los de Leach y Davey, en 1942, usaron sales de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ en un pH con tendencia ácida (6.0, muy similar al rango de pH del tratamiento) y no observaron daño en el micelio de *Sclerotium rolfsii* (Leach & Davey, 1942).

De manera similar, en 1981, Tsao y Oster usaron sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ a una concentración incluso mayor a la de este trabajo, de 1000 μ M y observaron que la formación de esporangios de *Phytophthora cinnamomi* y *P. parasitica* fue menos efectiva a un pH de 6.0 (23 % de inhibición), que a un pH de 8.0 (99 % de inhibición) (Tsao & Oster, 1981).

Una de las posibles razones por las que no funcionó el tratamiento es por el pH que tuvo cada medio de cultivo, durante la realización del tratamiento (pH CPD 5.6 GM 7.2), éste pudo influir en la disociación molecular de BA (NH_4HCO_3), en 1981, Punja y Grogan realizaron un estudio, donde se observó que BA en concentraciones mayores a las de este estudio, (10, 30 y 50 mM) al

estar en un pH alto (8 – 14) aumenta la concentración relativa de HCO_3^- y NH_3 y en pH bajos (0 – 7) aumenta la concentración de CO_2 y NH_4^+ .

Las siguientes ecuaciones explican la disociación de BA mediada por el pH:



El efecto fungicida de BA esta mediado por el pH, al aumentar la concentración relativa de HCO_3^- alcaliniza el medio aumentando la prevalencia de NH_3 , el cual es identificado como el principal compuesto tóxico, (Punja & Grogan, 1981).

En 1990, Depasquale y Montville realizaron un estudio sobre el mecanismo de acción por el cual BA inhiben el crecimiento fúngico, usaron sales de sulfato de amonio y BA a concentraciones mayores a las de este estudio, 110 mM en cultivos de *P.griseofulvum* y *F.graminearum* en CPD bufferado, calcularon las concentraciones de amoniaco libre en un rango de pH de 7.8 – 8.7 y demostraron que los efectos fungicidas de estos compuestos nitrogenados se deben al aumento de NH_3 , el % de germinación de los hongos fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración de NH_3 (pH de 7.8, 1 mM) (pH de 8.7, 24 mM), además de que demostraron que el amoniaco se difunde de manera pasiva a través de la membrana celular acumulándose en los espacios intracelulares, aumentando el pH intracelular (Depasquale & Montville, 1990).

La diferencia de los resultados es muy evidente, BA al 10 % no presentó efectos inhibitorios en la producción de esporas de *F. verticillioides* a 10 días de crecimiento en un rango de pH 5.8 – 7.4, se considera que se necesitan realizar estudios con condiciones similares a las que se han reportado estos efectos inhibitorios asociados a pH altos >8.0.

Con respecto a los resultados del tratamiento AAG 10 %, estos fueron favorables, se logró inhibir la producción de esporas al 100 % y las esporas de estos tratamientos resultaron inviables para ambos medios de cultivo.

De manera similar, en 2021, Gergolet-Díaz y col., usaron ácido acético, pero de origen orgánico a una concentración mayor a la de este estudio, de 1 mM en cultivos de *F. verticillioides* observando una inhibición del 100 % del hongo (Gergolet Diaz et al., 2021).

Se han realizado diversos estudios en diferentes especies micóticas y de la misma manera, se ha logrado eliminar por completo otros hongos, algunos del mismo género *Fusarium*.

Tal es el caso de Momma y col., en 2006, usaron una solución de desinfestación biológica del suelo (BSD) hecha a base de ácido acético y butírico con concentraciones mayores a las empleadas, (concentraciones ácido acético 800 mg/l y 200 mg/l) para inhibir a *F. oxysporum f. sp.lycopersici* y *Rhizoctonia solanacearum*, que se encontraban contaminando el suelo de diversos cultivos, una vez pasaron 48 hrs del tratamiento las esporas de los hongos dejaban de ser viables (Momma et al., 2006).

Otro ejemplo similar es el de Abd-El-Kareem, en 2009, realizó un estudio usando vapores de ácido acético a concentración de 0, 2, 4, y 6 $\mu\text{l/l}^{-1}$ en el suelo de plantas de pepino, para inhibir el

crecimiento de *F. solani*, *F. oxysporum f.sp. cucumerinum*, *R. solani*, *S. rolfsii* y *Didymella meloni*, el ácido acético obtuvo una completa inhibición del crecimiento siendo más sensible a *R. solani* (Abd-El-Kareem, 2009).

Los efectos antifúngicos del ácido acético han sido estudiados, se atribuyen a un valor alto de pKa (pKa = 4.75), que puede generar una concentración mucho mayor en su forma no disociada, se cree que esta forma es capaz de atravesar la membrana y disociarse en la célula, lo que provoca una reducción del pH (Juodeikiene et al., 2018; le Lay et al., 2016).

Para los tratamientos donde se utilizó Lfb en conjunto con BA 10 % y AAG 10 %, en ambas combinaciones los resultados fueron favorables, se logró inhibir la producción de esporas y su viabilidad, la eficacia de los tratamientos en conjunto fue mayor a la de cada tratamiento realizado de manera solitaria. Al usar Lfb + BA se generó una respuesta de sinergia en la inhibición de producción de esporas, como se mencionó anteriormente el efecto fungicida de BA depende de la concentración de amoníaco libre y esto se logra aumentando el valor del pH, tomando en cuenta las mediciones de pH es posible que Lfb favoreció el pH hacia la alcalinidad, ejerciendo un efecto de “buffer” , sobre todo en CPD cuyas características son ácidas, el rango de pH de ambos tratamientos fue de 7.7 - 9.0, es posible que se haya favorecido la disociación de BA a HCO₃ y NH₃, tal como en el trabajo de Depasquale y Montville, en 1990, usaron BA a 110 mM (mayor a la concentración empleada) en cultivos de *P.griseofulvum* y *F.graminearum* en CPD bufferado, calcularon las concentraciones de amoníaco libre en un rango de pH de 7.8 – 8.7 y demostraron que los efectos fungicidas de estos compuestos nitrogenados se deben al aumento de NH₃ (Depasquale & Montville, 1990).

Una de las mayores dudas que se tuvo al realizar el experimento, fue el usar Lfb + AAG, ya que la funcionalidad de Lfb puede variar al interactuar en medios con condiciones ácidas, durante el tratamiento los efectos inhibitorios fueron similares a los del tratamiento AAG por sí solo, aunque la adición de Lfb generó una inhibición más eficaz, se descarta que AAG haya alterado la funcionalidad de Lfb, ya que existen estudios como los de Abe y col., en 1991, realizaron un estudio sobre la integridad y la funcionalidad de Lfb en condiciones ácidas, determinaron que a un pH de 4.0 (AAG pH 4.0) Lfb se mantiene estable, resiste sin perder de forma significativa la capacidad de ligar hierro (Abe et al., 1991).

Tomando en cuenta lo anterior, es posible que el uso conjunto de Lfb y AAG, generó una respuesta de sinergia en los efectos inhibitorios del tratamiento, el uso conjunto de Lfb + AAG parece prometedor, aunque para entender mejor los alcances de esta interacción se requieren más estudios.

9. CONCLUSIONES

El efecto de Lfb sobre *F. verticillioides* resultó ser fungicida al 100 % a las 72 hrs de su aplicación tanto en medio CPD (1.8 μM) como GM (3 μM), Lfb logró disminuir la producción de esporas y las esporas observables restantes resultaron ser inviables.

El tratamiento AAG 10 % (540 μM CPD y 900 μM) presentó un efecto fungicida a las 48 hrs en CPD y a las 72 hrs en GM, se logró inhibir la producción de esporas y las esporas restantes resultaron ser inviables.

El uso de Lfb (2 μM GM y 1.4 μM CPD) en conjunto con AAG 10 % (100 μM CPD y 300 μM GM) produjo una mayor eficacia en la inhibición de la producción de esporas a las 24 hrs de sus tratamientos en solitario, la interacción de ambas moléculas también generó una sinergia.

Se determinó el efecto del tratamiento BA 10 % (540 μM CPD y 900 μM GM), éste no presentó efectos inhibitorios durante los 10 días del tratamiento contrariamente *F. verticillioides* produjo esporas con mayor vigor, debido a que las condiciones ambientales no favorecieron la disociación de BA a HCO_3 y NH_3 .

El uso de Lfb (2 μM GM y 1.4 μM CPD) en conjunto con BA 10 % (100 μM CPD y 300 μM GM) produjo una sinergia entre ambas moléculas, el efecto fungicida fue mayor a las 24 hrs de sus tratamientos individuales.

10. REFERENCIAS

- Abdel Nour, A. M., Ringot, D., Guéant, J. L., & Chango, A. (2007). Folate receptor and human reduced folate carrier expression in HepG2 cell line exposed to fumonisin B1 and folate deficiency. *Carcinogenesis*, 28(11), 2291–2297. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm149>
- Abd-El-Kareem, F. (2009). Effect of acetic acid fumigation on soil-borne fungi and cucumber root rot disease under greenhouse conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(3), 213–220. <https://doi.org/10.1080/03235400600999380>
- Abe, H., Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S., Nagao, E., & Tomita, M. (1991). Heat Stability of Bovine Lactoferrin at Acidic pH. *Journal of Dairy Science*, 74(1), 65–71. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(91\)78144-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(91)78144-7)
- Acosta-Zaldívar, M., Andrés, M. T., Rego, A., Pereira, C. S., Fierro, J. F., & Côte-Real, M. (2016). Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Apoptosis*, 21(2), 163–173. <https://doi.org/10.1007/S10495-015-1199-9/METRICS>
- Actor, J. K., Hwang, S.-A., & Kruzel, M. L. (2009). Lactoferrin as a natural immune modulator. *Current Pharmaceutical Design*, 15(17), 1956–1973.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4th Edition. Wiley, New York., 868.
- Andrés, M. T., Acosta-Zaldívar, M., & Fierro, J. F. (2016). Antifungal mechanism of action of lactoferrin: Identification of H⁺-ATPase (P3A-type) as a new apoptotic-cell membrane receptor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4206–4216. <https://doi.org/10.1128/AAC.03130-15>
- Armstrong, G. M. (1978). *Formae Speciales and Races of Fusarium oxysporum Causing Wilts of the Cucurbitaceae*. *Phytopathology*, 68(1), 19. <https://doi.org/10.1094/phyto-68-19>
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N. M., Roebroek, E. J. A., & Waalwijk, C. (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90(8), 891–900. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.891>
- Bacon, C. W., Marijanovic, D. R., Norred, W. P., & Hinton, D. M. (1989). Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.55.11.2745-2748.1989>
- Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P., & Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4039-4043.1996>
- Baker, E. N., & Baker, H. M. (2005). Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2531–2539.
- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., & Vlegaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 11, 743–745. <https://doi.org/10.1039/C39880000743>
- Buechel, T. (2020). *Perfil de las enfermedades radiculares: Fusarium*. <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/perfil-de-las-enfermedades-radiculares-fusarium/>
- Castro-Samano, M. A., García-Mata, R., Parra-Insunza, F., Portillo-Vázquez, M., Márquez-Sánchez, I., García-Sánchez, R. C., Castro-Samano, M. A., García-Mata, R., Parra-Insunza, F., Portillo-Vázquez, M., Márquez-Sánchez, I., & García-Sánchez, R. C. (2019). El mercado de la carne de bovino en México, considerados los factores externos. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 16(1), 85–103.
- Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., & Vargas Estupiñán, N. (2012). Biología de Hongos. In *Universidad de los Andes*. Universidad de los Andes. [https://ediciones.uniandes.edu.co/Documents/Paginas/preliminares/Biología de hongos.pdf](https://ediciones.uniandes.edu.co/Documents/Paginas/preliminares/Biología%20de%20hongos.pdf)

- CETA FES ZARAGOZA. (2018). *Blog del Manual del Laboratorio Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II*. <https://Blogceta.Zaragoza.Unam.Mx/Manualbct2/Anexo-2-Camara-de-Neubauer/>.
- Chavarri, M., Barroyeta, J., Ochoa, Y., Rumbos, N., Alezones, J., Chavarri, M., Barroyeta, J., Ochoa, Y., Rumbos, N., & Alezones, J. (2017). Detección de fusarium verticillioides y fumonisinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados Yaracuy y Guárico, Venezuela. *Nova Scientia*, 9(19), 171–184. <https://doi.org/10.21640/NS.V9I19.1035>
- Christensen, C. M., & Kaufmann, H. H. (1969). *Grain Storage: The Role of Fungi in Quality Loss* (University of Minnesota Press, Ed.).
- Cook, R. J. (2010). Fusarium root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. *Compendium of Wheat Diseases and Pests*, 3, 37–39.
- Cortés-sánchez, A. D. J., Martín-azocar, A. L. S., & García-barrientos, R. (2016). About Fungi, Mycotoxins and Food Safety. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology.*, 10(12), 99–109. <https://doi.org/10.9790/2402-10120299109>
- da Silva, P. A. S., Dupim, M. S., & Chazin, E. L. (2015). Ácido Acético (CAS 64-19-7). *Revista Virtual de Química*, 7(6), 2647–2662.
- Darwish, W. S., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M. M., & Ishizuka, M. (2014). An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76(6), 789–797. <https://doi.org/10.1292/JVMS.13-0563>
- de la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisinas— Síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-maíz. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77–91.
- Deacon, J. W. (1997). *Modern mycology* (Vol. 3). Blackwell Science Oxford.
- Denli, M., & Pérez, J. (2006). Contaminación Por Micotoxinas En Los Piensos: Efectos, Tratamiento Y Prevención. *XXII Curso de Especialización FEDNA*, 1–18.
- Depasquale, D. A., El-Nabarawy, A., Rosen, J. D., & Montville, T. J. (1990). Ammonium bicarbonate inhibition of mycotoxigenic fungi and spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*, 53(4), 324–328. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.4.324>
- DePasquale, D. A., & Montville, T. J. (1990). Mechanism by which ammonium bicarbonate and ammonium sulfate inhibit mycotoxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), 3711–3717. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.12.3711-3717.1990>
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Desjardins, Plattner, R. D., Nelsen, T. C., & Leslie, J. F. (1995). Genetic analysis of fumonisin production and virulence of Gibberella fujikuroi mating population A (Fusarium moniliforme) on maize (Zea mays) seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 79–86. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.79-86.1995>
- Duncan, K. E., & Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by Fusarium verticillioides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-1-0006>
- Fisher, N. L. (1982). Carnation Leaves as a Substrate and for Preserving Cultures of Fusarium species. *Phytopathology*, 72(1), 151. <https://doi.org/10.1094/phyto-77-151>
- Fisher, N. L., Marasas, W. F. O., & Toussoun, T. A. (1983). Taxonomic Importance of Microconidial Chains in Fusarium Section Liseola and Effects of Water Potential on Their Formation. *Mycologia*, 75(4), 693. <https://doi.org/10.2307/3792999>

- Gelderblom, W. C. A., Marasas, W. F. O., Steyn, P. S., Thiel, P. G., Van Der Merwe, K. J., Van Rooyen, P. H., Vlegaar, R., & Wessels, P. L. (1984). Structure elucidation of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 2, 122–124. <https://doi.org/10.1039/C39840000122>
- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R., & Kriek, N. (1988). Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1806–1811.
- Gergolet Diaz, D. G., Pizzolitto, R. P., Vázquez, C., Usseglio, V. L., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., Zygodlo, J. A., & Merlo, C. (2021). Effects of the volatile organic compounds produced by *Enterococcus* spp. strains isolated from maize grain silos on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Journal of Stored Products Research*, 93, 101825. <https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2021.101825>
- Gimeno, A. (2001). Revisión genérica del problema de los hongos y micotoxinas en alimentos animales. *Albeitar*, 45, 31.
- Gimeno, A., & Martins, M. L. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. *Special Nutrients, Florida*, 50–53.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 33, Issue 4, pp. 301.e1-301.e8). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- Han, J., Lakshman, D. K., Galvez, L. C., Mitra, S., Baenziger, P. S., & Mitra, A. (2012). Transgenic expression of lactoferrin imparts enhanced resistance to head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-33>
- Hernández Guzmán, J. A., & Carballo Carballo, A. (2018). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. *Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*, 8.
- Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O. & van der Walt, F. E. (1987). Oesophageal and other main cancer patterns in four districts of Transkei, 1981-1984. *South African Medical Journal*, 72(1), 27–30.
- Jennings, P. (2007). *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology* - by Anne E. Desjardins. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01505.x>
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele, V., & Bartkevics, V. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT*, 89, 307–314. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.10.061>
- Kang, H. C., Park, Y. H., & Go, S. J. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. *Microbiological Research*, 158(4), 321–326. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00211>
- Kedera, C. J., Leslie, J. F., & Claflin, L. E. (1994). Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-603>
- Kellerman, T. S., Marasas, W. F. O., Pienaar, J. G., & Naudé, T. W. (1972). *A mycotoxicosis of equidae caused by Fusarium moniliforme sheldon*. A preliminary communication.
- Kirkpatrick, C. H., Green, I., Rich, R. R., & Schade, A. L. (1971). Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: Relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Infectious Diseases*, 124(6), 539–544. <https://doi.org/10.1093/infdis/124.6.539>
- Klotz, L. V., Nelson, P. E., & Toussoun, T. A. (1988). A Medium for Enhancement of Chlamydospore Formation in *Fusarium* Species. *Mycologia*, 80(1), 108. <https://doi.org/10.2307/3807500>

- Koike, S. T., & Tjosvold, S. A. (2020). *Begonia / Floriculture and Ornamental Nurseries / Agriculture: Pest Management Guidelines / UC Statewide IPM Program (UC IPM)*. <https://www2.ipm.ucanr.edu/agriculture/floriculture-and-ornamental-nurseries/begonia/>
- Kondori, N., Baltzer, L., Dolphin, G. T., & Mattsby-Baltzer, I. (2011). Fungicidal activity of human lactoferrin-derived peptides based on the antimicrobial $\alpha\beta$ region. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.08.020>
- Kriek, N. P., Kellerman, T. S., & Marasas, W. F. (1981). A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48(2), 129–131.
- Lambert, L. A., Perri, H., Halbrooks, P. J., & Mason, A. B. (2005). Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 142(2), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.007>
- le Lay, C., Coton, E., le Blay, G., Chobert, J. M., Haertlé, T., Choiset, Y., van Long, N. N., Meslet-Cladière, L., & Mounier, J. (2016). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 79–85. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.06.020>
- Leach, L. D., & Davey, A. E. (1942). Reducing southern Sclerotium rot of sugar beets with nitrogenous fertilizers. *J. Agric. Res*, 64, 1–18.
- Leboffe, L., Giansanti, F., & Antonini, G. (2009). Antifungal and antiparasitic activities of lactoferrin. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 8(2), 114–127. <https://doi.org/10.2174/187152109787846105>
- Legrand, D., Pierce, A., Ellass, E., Carpentier, M., Mariller, C., & Mazurier, J. (2008). Lactoferrin structure and functions. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_6
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2007). The *Fusarium* Laboratory Manual. In *The Fusarium Laboratory Manual*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., Tovar-Pedraza, J. M., Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., & Tovar-Pedraza, J. M. (2017). Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el bajío, México. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(2), 142–151. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902017005000404>
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Makaula, A. N., Marasas, W. F., Venter, F. S., Badenhorst, C. J., Bradshaw, D., & Swanevelder, S. (1996). Oesophageal and other cancer patterns in four selected districts of the Transkei, Southern Africa:1985-1990. *African Journal of Health Sciences*, 3(1), 11–115.
- Marasas, W. F. O. (1981). Mycoflora of Corn Produced in Human Esophageal Cancer Areas in Transkei, Southern Africa. *Phytopathology*, 71(8), 792. <https://doi.org/10.1094/phyto-71-792>
- Marasas, W. F. O., Nelson, P. E. & Toussoun, T. A. (1984). *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*. (P. S. University., Ed.).
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-Van Waes, J., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W. C. A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J. D., Starr, L., Sullards, M. C., Roman, A. V., Voss, K. A., Wang, E., & Merrill, A. H. (2004). Fumonisin Disrupts Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk

- Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *Journal of Nutrition*, 134(4), 711–716. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.711>
- Merrill, A. H., Schmelz, E. M., Wang, E., Dillehay, D. L., Rice, L. G., Meredith, F., & Riley, R. T. (1997). Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. *Journal of Nutrition*, 127(5 SUPPL.), 830S-833S. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.830s>
- Mokobi F. (2020). *Fusarium spp.* En línea: <https://microbenotes.com/fusarium-spp/> Fecha de consulta: julio (2022).
- Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P., & Shishido, M. (2006). Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). *Journal of General Plant Pathology*, 72(4), 247–252. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0274-z>
- Moreno, E. (1977). Los hongos y la calidad de los granos y semillas. *Boletín de La Sociedad Mexicana de Micología*, 11(1969), 127–135.
- Moreno-Expósito, L., Illescas-Montes, R., Melguizo-Rodríguez, L., Ruiz, C., Ramos-Torrecillas, J., & de Luna-Bertos, E. (2018). Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. In *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.002>
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. 206.
- Nesic, K., Ivanovic, S., & Nesic, V. (2014). Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 228, 101–120. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01619-1_5
- Nikawa, H., Samaranyake, L. P., Tenovuo, J., Pang, K. M., & Hamada, T. (1993). The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Archives of Oral Biology*, 38(12), 1057–1063. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(93\)90167-K](https://doi.org/10.1016/0003-9969(93)90167-K)
- O'Donnell, K., Kistlerr, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., Sanche, S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Van Burik, J. A. H., Padhye, A., Anaissie, E. J., Francesconi, A., Walsh, T. J., & Robinson, J. S. (2004). Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: Evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5109–5120. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5109-5120.2004>
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E., & Di Pietro, A. (2004). *Fusarium oxysporum* As a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity*, 72(3), 1760–1766. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1760-1766.2004>
- Pitt, J. I. (2014). Mycotoxins: Fumonisin. *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 299–303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00192-X>
- Punja, Z. K. (1986). Effects of Calcium and Nitrogen Fertilizers, Fungicides, and Tillage Practices on Incidence of *Sclerotium rolfsii* on Processing Carrots. *Plant Disease*, 70(9), 819. <https://doi.org/10.1094/pd-70-819>
- Punja, Z. K., & Grogan, R. G. (1981). Effects of Inorganic Salts, Carbonate-Bicarbonate Anions, Ammonia, and the Modifying Influence of pH on Sclerotial Germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 72(6), 635. <https://doi.org/10.1094/PHTO-72-635>

- Rabie, C. J., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Lübben, A., & Vlegaar, R. (1982). Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology*.
<https://doi.org/10.1128/aem.43.3.517-521.1982>
- Rahmanto, Y. S., Bal, S., Loh, K. H., Yu, Y., & Richardson, D. R. (2012). Melanotransferrin: search for a function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3), 237–243.
- Reyes-Pérez, M. C. J., & Sánchez-Hernández, G. (2019). *Curso - Taller: Hongos de almacén y análisis de la calidad física y fisiológica de semillas*.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., & Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101–2105. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2101-2105.2002>
- Rivers, A., González-Regalado, J., Reyes-Zavala, M., Vilchis-Ramos, R., & Ramírez-Martínez, G. (2016). Poscosecha de granos básicos en el medio rural. *Claridades Agropecuarias*, 217, 52.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.005>
- Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., & Seifert, K. A. (2001). Perithecial species of *Fusarium*. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, 408.
- Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Med*, 29(1), 143–151.
- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*.
https://books.google.com/books/about/Micotoxinas_en_alimentos.html?hl=es&id=wgRVcFvk--IC
- Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*, 27(11), 799–809.
- Takayama, Y. (2013). Lactoferrin and its role in wound healing. In *Lactoferrin and its Role in Wound Healing*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2467-9>
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85–86.
- Tenuta, M., Conn, K. L., & Lazarovits, G. (2002). Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92(5), 548–552. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.5.548>
- Thiel, P. G., Gelderblom, W. C. A., Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., & Wilson, T. M. (1986). Natural Occurrence of Moniliformin and Fusarin C in Corn Screenings Known to Be Hepatocarcinogenic in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(5), 773–775. <https://doi.org/10.1021/jf00071a001>
- Tlapal Bolaños, B., González Hernández, H., Zavaleta Mejía, E., Sánchez García, P., Mora Aguilera, G., Nava Díaz, C., Real Laborde, J. I. Del, & Rubio Cortes, R. (2014). Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en Plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el Efecto Sobre la Fisiología de la Planta y Densidad de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(1), 62–74.
- Tlapal-Bolaños, B. (2013). *Efecto de Trichoderma y Bacillus en la dinámica poblacional de Fusarium spp. en agave tequilero (Agave tequilana Weber var. Azul) en Jalisco*. 81.
- Torres, M. R., Ramos, A. J., Soler, J., Sanchis, V., & Marín, S. (2003). SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 81(3), 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00226-X)

- Torres-Sánchez, L., & López-Carrillo, L. (2010). [Fumonisin intake and human health]. *Salud Publica Mex*, 52(5), 461–467.
- Tsao, P. H., & Oster, J. J. (1981). Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathology*, 71(1), 53–59.
- Turner, P. C., Nikiema, P., & Wild, C. P. (1999). Fumonisin contamination of food: Progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1–2), 81–93. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00012-5)
- Ushiwata, S. Y., Amemiya, Y., & Inubushi, K. (2009). Inhibition of in vitro growth of *Rhizoctonia solani* by liquid residue derived from steam-treated grass clippings. *Journal of General Plant Pathology*, 75(4), 312–315. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0174-0>
- Viejo-Díaz, M., Andrés, M. T., & Fierro, J. F. (2005). Different anti-*Candida* activities of two human lactoferrin-derived peptides, Lfpep and kaliocin-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2583–2588. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2583-2588.2005>
- Vogel, H. J. (2012). Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(3), 233–244.
- Wakabayashi, H., Abe, S., Teraguchi, S., Hayasawa, H., & Yamaguchi, H. (1998). Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.42.7.1587>
- Walker, G. M., & White, N. A. (2017). Introduction to Fungal Physiology. *Fungi*, 1–35. <https://doi.org/10.1002/9781119374312.CH1>
- Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., & Adhikari, B. (2017). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1381583>, 59(4), 580–596. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1381583>
- Wild, C. P., & Gong, Y. Y. (2009). Mycotoxins and human disease: A largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1), 71–82. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp264>
- Wilson, B. J., & Maronpot, R. R. (1971). Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *The Veterinary Record*, 88(19), 484–486. <https://doi.org/10.1136/VR.88.19.484>
- Winston, A. E. (1995). *Slow-release ammonium bicarbonate fungicide compositions*. Google Patents.
- Wu, L., Yuan, Z., Wang, P., Mao, X., Zhou, M., & Hou, Y. (2022). The plasma membrane H⁺-ATPase FgPMA1 regulates the development, pathogenicity, and phenamacril sensitivity of *Fusarium graminearum* by interacting with FgMyo-5 and FgBmh2. *Molecular Plant Pathology*, 23(4), 489–502. <https://doi.org/10.1111/MPP.13173>
- Yount, N. Y., Andrés, M. T., Fierro, J. F., & Yeaman, M. R. (2007). The γ -core motif correlates with antimicrobial activity in cysteine-containing kaliocin-1 originating from transferrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(11), 2862–2872. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2007.07.024>