

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL CIENCIAS PECUARIAS**



**ESTUDIO DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* (SECCIÓN *Liseola*) AISLADAS DE  
MAÍZ. CONTROL DE *Fusarium verticillioides* Y FUMONISINAS MEDIANTE  
EXTRACTOS DE ALCALOIDES DE *Lupinus exaltatus***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS**

**PRESENTA:**

**MVZ. ROSA MARINA FIGUEROA GÓMEZ**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ (Directora)  
DR. ROBERTO LEZAMA GUTIERREZ  
DR. CARLOS BUCIO VILLALOBOS**

**ASESORES:**

**DRA. MARIA MARTA REYNOSO  
DRA. ESTHER ALBARRAN RODRÍGUEZ  
DR. MARIO ALBERTO RUIZ LOPEZ**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, DICIEMBRE DE 2006**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS  
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló la pasante de la Maestría Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, MVZ Rosa Marina Figueroa Gómez, cuyo título es:

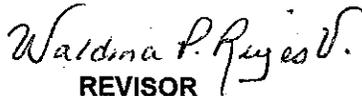
**Estudio de las especies de *Fusarium* (sección *Liseola*) aisladas de maíz. Control de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas mediante extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus***

Trabajo dirigido por: Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios. Se otorga el visto bueno para que se efectúe la impresión de la tesis y se continúe con los trámites correspondientes para presentar el examen de grado.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 26 Octubre del 2006

  
REVISOR

Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez

  
REVISOR

Dr. Roberto Lezama Gutiérrez

  
REVISOR

Dr. Carlos Bucio Villalobos

  
REVISOR

Dra. Delia Guillermina González Aguilar

  
REVISOR

Dra. Esther Albarrán Rodríguez

# CONTENIDO

	Página
Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	iv
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Anexos	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. La contaminación del maíz	3
2.2. Taxonomía del género <i>Fusarium</i>	5
2.3. Sección <i>Liseola</i>	5
2.4. Ciclo biológico de <i>Fusarium verticillioides</i>	6
2.5. Complejo <i>Gibberella fujikuroi</i>	8
2.6. Micotoxinas	11
2.6.1. Fumonisinias	12
2.6.2. Efectos biológicos de las fumonisinias	14
2.7. Factores que influyen en la contaminación del maíz por <i>Fusarium</i> y Fumonisinias	16
2.7.1. Factores ambientales	16
2.7.2. Prácticas agronómicas	17
2.7.3. Características del maíz	18
2.7.4. Operaciones post-cosecha	19
2.8. Prevención y control de la contaminación con fumonisinias	20
2.9. Género <i>Lupinus</i> (Lupinos)	21
2.9.1. Composición química y valor nutritiva de los Lupinos silvestres	23
2.9.2. Alcaloides de los <i>Lupinus</i>	25
2.9.3. Actividad biológica de género <i>Lupinus</i>	27

<b>3. HIPÓTESIS</b>	30
<b>4. OBJETIVOS</b>	31
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
5.1. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> de la sección <i>Liseola</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco	33
5.1.1. Muestreo	33
5.1.2. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> de diferentes híbridos de maíz	33
5.2. Determinación de la población y tipo de apareamiento de las especies de <i>F. verticillioides</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz	36
5.2.1. Cepas	36
5.2.2. Cruzamientos sexuales	37
5.3. Evaluación de la capacidad productiva de fumonisinas de las cepas de <i>F. verticillioides</i> aisladas y caracterizadas	37
5.3.1. Cepas	37
5.3.2. Extracción y cuantificación de fumonisinas	38
5.3.3. Análisis estadístico	39
5.4. Análisis de las condiciones climáticas registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003	39
5.5. Valoración del efecto del antioxidante BHA y de los extractos de alcaloides de <i>L. exaltatus</i> sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> y la producción de FBs	39
5.5.1. Efecto del antioxidante BHA	39
5.5.1.1. Inoculación y condiciones de cultivos	40
5.5.1.2. Análisis estadístico	41
5.5.2. Efecto del extracto de alcaloides de <i>Lupinus exaltatus</i> .	41
5.5.2.1. Extracción de los alcaloides del <i>Lupinus exaltatus</i>	41
5.5.2.2. Inoculación y condiciones de cultivos	41
5.5.2.3. Análisis estadístico	42
<b>6. RESULTADOS</b>	43

6.1. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> de la Sección <i>Liseola</i> a partir de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco	43
6.2. Determinación de la población y tipo de apareamiento de las especies de <i>F. verticillioides</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz	50
6.3. Evaluación de la capacidad productora de fumonisinas de las cepas de <i>F. verticillioides</i> aisladas	51
6.4. Análisis de las condiciones climáticas registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003	55
6.4.1. Temperaturas	55
6.4.2. Precipitación pluvial	56
6.4.3. Humedad relativa (HR)	56
6.5. Valoración del efecto del antioxidante BHA y del extracto de alcaloides del <i>Lupinus exaltatus</i> sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> y la producción de Fumonisinas	57
6.5.1. Efecto del antioxidante BHA	57
6.5.2. Efecto del extracto de alcaloides de <i>Lupinus exaltatus</i>	61
<b>7. DISCUSIÓN</b>	66
7.1. Aislamiento e identificación de las especies de <i>Fusarium</i> de la Sección <i>Liseola</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco	66
7.2. Determinación de la población y tipo de apareamiento de las especies de <i>F. verticillioides</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz	69
7.3. Evaluación de la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de <i>F. verticillioides</i> aisladas	70
7.4. Análisis de las condiciones climáticas registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003	72
7.5. Valoración del efecto del antioxidante BHA y del extracto de alcaloides del <i>Lupinus exaltatus</i> sobre el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> y la producción de fumonisinas	73
7.5.1. Efecto del antioxidante BHA.	73
7.5.2. Efecto del extracto de alcaloides de <i>Lupinus exaltatus</i>	75
<b>8. CONCLUSIONES</b>	77
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	78
<b>10. ANEXOS</b>	102

## DEDICATORIAS

### A DIOS

Por ese Amor que solo Él nos sabe dar.

*Por quien soy participe de este mundo y al que contribuiré con los conocimientos adquiridos. Por permitirme llegar a ésta, una de mis metas... gracias.*

### A mis Padres

Vita Gómez Zarate †

Ricardo Figueroa Bejarano †

*Con profundo amor, cariño y respeto me supieron guiar en la vida para seguir adelante.*

### A mis Hermanos

Angélica, Manuel, Libo †, Osbelia, Roberto, Nena y Esther

*Con mucho cariño, admiración y respeto, por que a base de sacrificios me motivaron a superarme y con su ayuda fue posible lograr esta meta anhelada.*

### A mis Hijos

Marina Ivon

Ivan

*A Ellos con todo mi CORAZÓN*

*Por ese amor incondicional que me dan a cada instante sin saber ellos el gran apoyo que recibo y por esas palabras mágicas de "tú puedes mami" por la paciencia para sacrificar su tiempo por el mío, con su apoyo y confianza me dieron su luz y esperanza para llegar a la meta.*

## AGRADECIMIENTOS

### **Directora de tesis**

Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez

*Por creer en mí y por darme la mano cuando más lo necesité. Por su incansable labor de guiar y transmitir conocimientos con un único fin: "la superación". Por su apoyo incondicional dado en todas las instancias de este trabajo. Por dedicar su tiempo y conocimientos para enriquecer mi formación académica. Por tantos momentos compartidos y, por sobre todo, su amistad.*

### **Asesores**

Dra. Esther Albarran

Dra. María Marta Reynoso

Dr. Mario Ruíz

*Por su apoyo en la realización de esta tesis. Por estimular el pensamiento crítico en mí para con este trabajo científico, realizando valiosas aportaciones al mismo.*

### **A la Dra. María Marta Reynoso**

*Por permanecer a mi lado brindando desinteresadamente sus conocimientos y realizar una supervisión constante de todas las actividades contenidas en esta tesis. Por facilitar la realización de las mismas a través de una dedicación admirable. En especial, por transmitirme la emoción que significa trabajar para la investigación.*

### **Honorable Jurado**

Dr. Carlos Bucio

Dr. Roberto Lezama

*Por su disponibilidad para formar parte de mi jurado. Por sus comentarios, sugerencias y apreciaciones que en todo momento contribuyeron a elevar la calidad de este trabajo.*

### **Dr. Agustín Ramírez Álvarez, Jefe del Departamento de Salud Pública**

*Con todo cariño y respeto. Por haberme recibido en este maravilloso Departamento y transmitirme (día a día) sentimientos de pertenencia a esta Institución. Por ser ejemplo de dedicación y amor al trabajo.*

**Dr. Federico Gabriel Antonio Rojo**

*Mil gracias por tu apoyo incondicional, por ser una gran persona y sobre todo por tu amistad.*

**Instituciones, Centros y Departamentos**

Universidad de Colima.

Universidad de Guanajuato.

**Universidad de Guadalajara a través de su Postgrado Interinstitucional de Ciencias Pecuarias (PICP).**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA-UDG)**

*Gracias por abrir sus puertas y recibir a todos aquellos que queremos seguir adelante.*

**Departamentos de Salud Pública, Producción Animal, Medicina Veterinaria, Botánica y Zoología.**

En las personas de: Dr. Mario Ruíz, Dr. Pablo Macedonio, MVZ Carlos Juárez,

Dra. Patricia Landeros, QFB Cecilia Jiménez, Secre. Ana Luz Torres, Dr. David Ávila.

*A todas aquellas personas que participaron directa o indirectamente. En especial a Lupita, Miriam, Enrique, Elba y Magally.*

## INDICE DE ABREVIATURAS

<i>A</i> = <i>Aspergillus</i>	$\mu\text{g}$ = microgramo
AHC= Agar Hojas de Clavel	$\mu\text{L}$ = microlitro
AHM = Agar Harina de Maíz	g = gramo
APG= Agar Papa Glucosado	h= hora
BHA= hydroxianisol butilado	mmol= milimol
CUCBA= Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias	mL= mililitro
DAS= diacetoxiscirpenol	mm = milímetro
DON= deoxinivalenol	min= minutos
ELEM= Leucoencefalomalacia equina	nd= no detectado
<i>F</i> = <i>Fusarium</i>	rpm= revoluciones por minuto
FA= Fumonisina A	spp= especie sin clasificar
FB <sub>1</sub> = Fumonisina B <sub>1</sub>	v = volúmen
FB <sub>2</sub> = Fumonisina B <sub>2</sub>	w = peso
FBs= Fumonisinas	°C = grados centígrados
FC= Fumonisina C	MA = locus de apareamiento
FDA=Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de Norte América	EE.UU= Estados Unidos de Norte América
FUSA = Fusarenona	WHO= Organización Mundial de la Salud
<i>G</i> = <i>Gibberella</i>	$a_w$ = Actividad de agua
HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución	ppm= partes por millón ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
HR = Humedad relativa	ppb= partes por billón ( $\text{ng g}^{-1}$ )
IARC = Agencia Internacional de la Investigación del Cáncer	
<i>L</i> = <i>Lupinus</i>	
OPA= O-phthadialdehído	
PP= propylparabeno	
PPE= Edema pulmonar porcino	
REP= Relación de Eficiencia Proteica	
TCA= Acido Tricloroacético	
UDG= Universidad de Guadalajara	

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Poblaciones de apareamiento del complejo <i>Gibberella fujikuroi</i> y su correspondiente anamorfo y teleomorfo.	9
2	Composición química proximal en base seca de <i>Lupinus silvestres</i>	24
3	Porcentaje del contenido de alcaloides principales en relación con el contenido total de alcaloides.	27
4	Diseño de siembra por bloques al azar con cuatro repeticiones de los diferentes híbridos de maíz en las parcelas experimentales del CUCBA.	34
5	Características diagnósticas de las especies de <i>Fusarium</i> Sección <i>Liseola</i> .	36
6	Tratamientos utilizados para la valoración del efecto fungicida de los extractos de alcaloides de <i>Lupinus exaltatus</i> y del antioxidante BHA sobre una cepa de <i>F. verticillioides</i> productora de altos niveles de fumonisinas.	42
7	Incidencia de <i>Fusarium</i> (Sección <i>Liseola</i> ) en muestras de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco.	44
8	Caracterización morfológica y cultural de las cepas de <i>Fusarium</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz.	46
9	Caracterización de las cepas de <i>F. verticillioides</i> , población de apareamiento A, aisladas de maíz. Población y tipo de apareamiento y producción de fumonisinas.	52
10	Temperaturas máximas, promedio y mínimas registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera-verano 2003.	55
11	Precipitación pluvial (mm) registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera-verano 2003.	56
12	Humedad relativa (%) registrada en el área de estudio durante el cultivo primavera-verano 2003.	57

Tabla		Página
13	Efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la velocidad de crecimiento y la fase lag de <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivado en agar harina de maíz a 25°C.	58
14	Efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la producción de fumonisinas por la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 sobre agar harina de maíz a 25°C.	60
15	Efecto del extracto de <i>Lupinus exaltatus</i> y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la velocidad de crecimiento y la fase lag de <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivado en agar harina de maíz a 25°C.	62
16	Efecto del extracto de <i>Lupinus exaltatus</i> y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la producción de fumonisinas por la cepa de <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivado en agar harina de maíz a 25°C	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	a,c,d,e,f, podredumbre de la mazorca; b y g, podredumbre del tallo causados por especies de <i>Fusarium</i> (Munkvold y Desjardins, 1997).	4
2	Ciclo de enfermedad de <i>Fusarium verticillioides</i> en maíz (Munkvold y Desjardins, 1997).	7
3	Estructura química de las Fumonisinias de la serie A, B, y C.	13
4	Plantas de <i>Lupinus</i>	22
5	Estructuras de algunos alcaloides quinolizidínicos (Wink, 1993, Muzquiz <i>et al.</i> , 1994)	26
6	Contaminación de granos de maíz con especies de <i>Fusarium</i> en el medio Nash – Snyder.	43
7	Crecimiento de especies de <i>Fusarium</i> en el medio a) Agar Hojas de Clavel (AHC) y b) Agar Papa Glucosado (APG).	45
8	<i>Fusarium verticillioides</i> (a-e) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a y c, Microconidióforos: monofiálides; b, cadenas de microconidios; d, microconidios; e, macroconidios; f, Características macroscópicas en APG.	47
9	<i>Fusarium proliferatum</i> . (a-d) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Microconidióforos: polifiálides; b, microconidios; c, macroconidios; d, microconidióforos: monofiálides; e, Características macroscópicas en APG.	48
10	<i>Fusarium subglutinans</i> . (a-c) Características microscópicas (10X y 40X) en AHC: a, Falsas cabezas de microconidios; b y c, Microconidióforos: polifiálides; d, Características macroscópicas en APG.	48
11	A). Formación de peritecios en el medio Agar Zanahoria 4X. B) Peritecios fértiles con cirros, resultantes del cruzamiento de las cepas A-0149 (MATA-1) x A-0999 (MATA-2) (20X); C) Ascosporas y ascosporas (40X).	50

Figura		Página
12	Producción de FBs por cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> , población de apareamiento A (n= 60) aisladas de diferentes híbridos de maíz. Límite de detección para FBs: <math><1 \mu\text{g g}^{-1}</math>.	54
13	Efecto del antioxidante (BHA) sobre el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 bajo diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) a 25°C cultivado en Agar Harina de Maíz (AHM). A: 0.995 $a_w$ ; B: 0.97 $a_w$ ; C: 0.955 $a_w$ .	59
14	Efecto del extracto de <i>Lupinus exaltatus</i> sobre <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 en medio de cultivo Agar Harina de Maíz (AHM).	62
15	Efecto del extracto de <i>Lupinus exaltatus</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> bajo diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) a 25°C cultivado en Agar Harina de Maíz (AHM). A: 0.995 $a_w$ ; B: 0.97 $a_w$ ; C: 0.955 $a_w$ .	64

## LISTA DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Medios de cultivos	102
2	Análisis de varianza y Prueba de Tukey de la producción de FBs por cepas de <i>F. verticillioides</i> aisladas de diferentes híbridos de maíz.	104
3	Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25° C.	105
4	Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.97$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.	106
5	Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.955$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.	107
6	Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la fase lag de la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.	108
7	Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.97$ ) sobre la fase lag de la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.	109
8	Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.955$ ) sobre la fase lag de la cepa <i>Fusarium verticillioides</i> UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.	110

- 9 Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la producción de fumonisinas de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C. 111
- 10 Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.97$ ) sobre la producción de fumonisinas de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C. 112
- 11 Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.955$ ) sobre la producción de fumonisinas de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C. 113
- 12 Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus* y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25° C. 114

## RESUMEN

Las especies de *Fusarium* (Sección *Liseola*) pueden causar podredumbres de raíz, tallo y mazorca, y algunas de estas especies son capaces de producir fumonisinas. Estas toxinas han sido relacionadas con el cáncer esofágico de humanos y son responsables de varias enfermedades animales, como leucoencefalomalacia equina y edema pulmonar porcino. Diferentes estrategias han sido desarrolladas con el objetivo de prevenir el ingreso de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en los alimentos destinados al consumo humano y animal. En la última década, se ha producido un notable incremento en las investigaciones sobre el uso de extractos obtenidos de plantas con actividad fungicida. Los objetivos del presente trabajo fueron: (i) evaluar la incidencia de especies de *Fusarium* en diferentes híbridos de maíz cultivados en parcelas experimentales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara (Estado de Jalisco, México) durante la cosecha 2003; (ii) determinar la capacidad de las cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas para producir fumonisinas (iii) determinar el efecto del antioxidante BHA (0, 0.5, 1, 10 y 20 mmol L<sup>-1</sup>) y de los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* (0, 1.0, 5.0, 10 y 20 mg mL<sup>-1</sup>) sobre la fase lag, la velocidad de crecimiento micelial y la producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* en medio de cultivo a base de maíz, bajo condiciones de incubación a 25°C y diferentes actividades de agua ( $a_w$ ). Los resultados se contrastaron mediante ANOVA y prueba de Tukey utilizando el programa Sigma Stat Versión 2.03 para Windows. En todos los híbridos de maíz, *Fusarium verticillioides* fue la especie predominante (44-80%), seguida por *F. subglutinans* (13-37%) y *F. proliferatum* (2-16%). Todas las cepas correspondientes a *F. verticillioides* fueron fértiles y pertenecieron a la población de apareamiento A (*G. moniliformis*), estando únicamente presente el tipo de apareamiento MATA-2. Las 50 cepas seleccionadas de *F. verticillioides* fueron capaces de producir fumonisinas en un rango de 107.5 hasta 7190 µg g<sup>-1</sup>. El antioxidante BHA inhibió significativamente ( $P < 0.050$ ) el crecimiento micelial, aumentó la fase lag y disminuyó la producción de fumonisinas de *F. verticillioides* al aumentar la concentración de BHA en las diferentes  $a_w$ . Se observó inhibición total a partir de la concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Los extractos de alcaloides del *Lupinus exaltatus* fueron capaces de reducir significativamente el crecimiento micelial cuando la concentración fue superior a 5 mg L<sup>-1</sup>, con una fase lag extensa. En concentraciones de 5 a 20 mg L<sup>-1</sup>, la producción de fumonisinas fue menor respecto al tratamiento control. Los resultados sugieren que el antioxidante BHA y los extractos de alcaloides del *Lupinus exaltatus* poseen el potencial para controlar el crecimiento y la producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* a diferentes actividades de agua en medios a base maíz.

**Palabras clave:** *Fusarium verticillioides*, fumonisinas, control, antioxidantes, *Lupinus exaltatus*

## ABSTRACT

*Fusarium* species (section *Liseola*) cause root rot, stalk rot and ear rot, and some of this species are able to produce fumonisins. These toxins have been related to oesophageal cancer and are responsible for several animal diseases, like, leukoencephalomalacia in horses and pulmonary oedema in swine. Different strategies have been used in order to prevent the entry of *F. verticillioides* and fumonisins into human and animal food chain. Over the last decade, there has been an elevated interest in research about use the extracts of plant origin with fungicide activity. The aims of the present study were: (i) to evaluate prevalence of *Fusarium* species in different maize hybrids cultivated in experimental plots of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara (Jalisco State, Mexico) during 2003 harvest season; (ii) to determine the *Fusarium verticillioides* strains ability to produce fumonisins; (iii) to determine the efficacy of antioxidant BHA (0, 0.5, 1, 10 y 20 mmol L<sup>-1</sup>) and alkaloid extracts from *Lupinus exaltatus* (0, 1.0, 5.0, 10 y 20 mg mL<sup>-1</sup>) on the lag phase, growth rate and fumonisin production on a maize-based media at 25°C, and under different water activity conditions ( $a_w$ ). Results were contrasted with ANOVA and Tukey's test used software Sigma Stat Versión 2.03 for Windows. *Fusarium verticillioides* was the dominant *Fusarium* species in the all maize hybrids evaluated (44-80%), followed by *F. subglutinans* (13-37%) and *F. proliferatum* (2 -16%). All of the *F. verticillioides* strains tested were fertile and belonged to mating population A (= *G. moniliformis*), and only MATA-2 mating type was found. All 50 strains of *F. verticillioides* tested produced fumonisins at levels ranging from 107.5 to 7190 µg g<sup>-1</sup>. Antioxidant BHA inhibited significantly ( $P < 0.05$ ) the mycelial growth, increased lag phase, and depressed fumonisins production of *F. verticillioides* when increased the BHA dose in all  $a_w$  treatment used. In the presence of concentrations 5 and 10 mM L<sup>-1</sup> the antioxidant BHA, mycelial growth and fumonisins production were completely inhibited, regardless of  $a_w$ . Alkaloid extracts from *Lupinus exaltatus* were able to significantly reduce the mycelial growth at levels above to 5 mg L<sup>-1</sup>, and resulted in longest lag phase. Lower levels of fumonisins production were observed in presence of alkaloid extracts (5 to 20 mg L<sup>-1</sup>). These results suggest that this antioxidant and alkaloid extract from *Lupinus exaltatus* have potential for control of growth and fumonisin production by *F. verticillioides* over a range of water availability conditions on maize-based media.

**Palabras clave:** *Fusarium verticillioides*, fumonisins, control, antioxidants,  
*Lupinus exaltatus*

# 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los alimentos destinados tanto para consumo humano y animal ha cobrado gran importancia a nivel mundial debido a los efectos que causan. Entre los contaminantes naturales se destacan las micotoxinas producidas por hongos, las cuales ocasionan pérdidas económicas en la producción y calidad de los granos, y producción animal. Todo esto aunado al costo que representa el diseño de programas de monitoreo y el establecimiento de parámetros que determinen los niveles máximos permitidos con el objeto de reducir al mínimo los riesgos para la salud humana y animal (Mannon y Johnson, 1985).

Las principales especies fúngicas implicadas en la producción de micotoxinas en el maíz pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. El género *Fusarium* es considerado como el hongo micotoxicogénico más frecuentemente asociado al maíz recién cosechado. Aunque las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* han sido consideradas como hongos de almacenamiento, ambas también han sido aisladas en el estado de cosecha (Moss, 1996).

El maíz es el cultivo de mayor importancia en México, por ser la base de la alimentación, y es considerado el sustrato ideal de especies de hongos como *Fusarium verticillioides*, principal productor de fumonisinas, micotoxinas responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además de otros trastornos como inmunosupresión y efectos nocivos a los parámetros productivos de los animales (Norred *et al.*, 1996).

Para el control de hongos en campo se comercializan numerosos plaguicidas químicos muy efectivos en su mayoría para insectos y hongos fitopatógenos, pero que producen graves daños al medio ambiente, contaminando suelos y cursos de aguas (Ristaino y Thomas, 1997).

En los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de nuevas tecnologías que posibiliten el uso de prácticas de producción agrícola sustentables dirigidas hacia la explotación racional de los recursos naturales, tendientes a reducir el uso de plaguicidas sintéticos para el control de hongos. Entre las alternativas para el manejo agronómico se

propone la aplicación de sustancias de origen vegetal con actividad fungicida como lo son los alcaloides de *Lupinus*, los cuales han demostrado un efecto inhibitor de especies de *Fusarium* en cultivos de papaya (Zamora *et al.*, 2002), sin embargo no existe información de su aplicación en cultivos de maíz.

El presente estudio tiene como finalidad valorar el nivel de contaminación por especies de *Fusarium* Sección *Liseola* en diversos híbridos de maíz cosechados en parcelas experimentales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), determinando la diversidad de las poblaciones biológicas presentes en campo y la capacidad productora de fumonisinas de las cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas.

Además, se pretende evaluar el efecto de los extractos de *Lupinus exaltatus* sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides* y la producción de fumonisinas, como medida de control alternativa de origen vegetal para reducir el desmedido uso de plaguicidas sintéticos que han ocasionado la acumulación de residuos tóxicos en el medio ambiente, además de que se ha desarrollado resistencia a los químicos por los hongos fitopatógenos.

#### **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:**

1. ¿Los híbridos de maíz que se cultivan en las parcelas experimentales del CUCBA (estado de Jalisco) presentan contaminación con especies de *Fusarium* de la sección *Liseola*?
2. ¿Los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* son efectivos como inhibidores del crecimiento de *Fusarium verticillioides* y de la producción de fumonisinas?

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Contaminación fúngica del maíz

El maíz es el cultivo de mayor importancia en México, representa el 43% de la superficie cultivada y es el alimento básico para la población, correspondiendo al estado de Jalisco el primer lugar en producción, en el año 2002 se obtuvo 3'029,144 toneladas en una superficie de 651,077 hectáreas. Si bien en México el 72% del total de producción de maíz se destina para el consumo humano, es considerado junto con el sorgo uno de los principales cereales que aportan la energía a la dieta de los animales (SAGARPA, 2003).

Durante el período de implantación, el cultivo del maíz se encuentra expuesto al ataque de diversos organismos como los insectos y hongos. Las pérdidas ocasionadas por microorganismos patógenos pueden ser totales obligando a la resiembra, o afectar sensiblemente al desarrollo de las plantas al verse alterada su masa radicular (Aldrich y Leng, 1974). Los hongos colonizan la mazorca a través del canal de los estilos, se extienden dentro de la misma o sobre la seda, e infectan granos aislados o grupos localizados en áreas de la mazorca. Luego las hifas se distribuyen sistemáticamente en hojas, tallos, raíces y granos de maíz, por lo que los hongos son considerados endófitos (Desjardins *et al.*, 1997). Son transmitidos de semilla a semilla, distribuyéndose sobre el pericarpio de granos ilesos, lejos del haz vascular. En los granos asociados con toxicidad, el embrión y el endosperma están totalmente invadidos, esto indica que las semillas sirven como unidad de dispersión efectiva desde la cual puede llevarse a cabo la infección de la planta (Bacon y Williamson, 1992).

El maíz es considerado el sustrato ideal para el desarrollo de las especies de *Fusarium*, las cuales pueden causar enfermedades de plántulas, podredumbre del tallo, raíz y mazorca, así como daño en el maíz almacenado aunque también puede aislarse de granos asintomáticos (Nelson, 1992). La podredumbre de la raíz y el tallo constituye una de las principales enfermedades del maíz en México, la cual es causada principalmente por *Fusarium verticillioides* (= *Gibberella fujikuroi*, población de apareamiento A, teleomorfo, *Gibberella*

*moniliformis* Wineland) que prevalece en zonas cálidas y secas, y por *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) y *F. culmorum* (Figura 1).

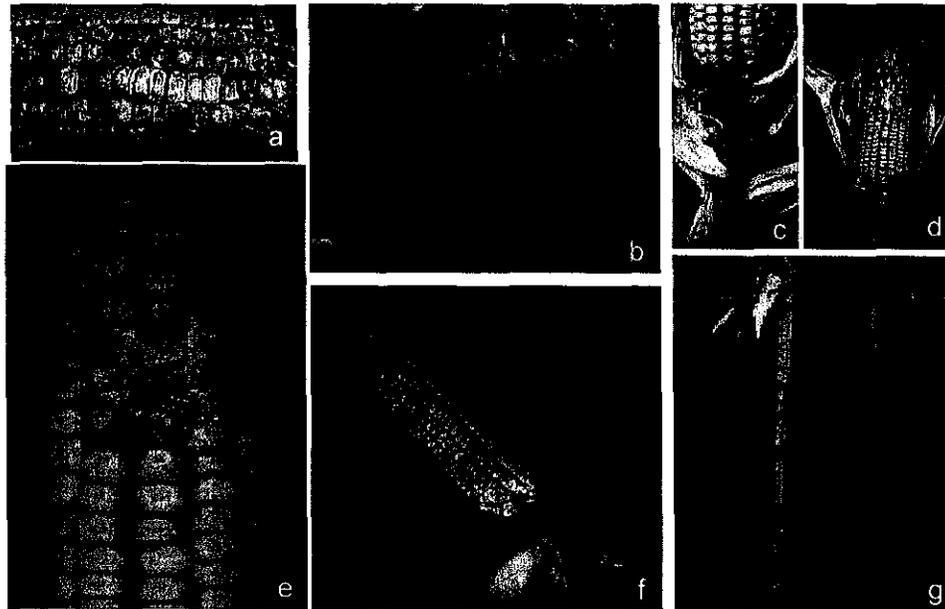


Figura 1. a, c, d, e, f, podredumbre de la mazorca; b y g, podredumbre del tallo causados por especies de *Fusarium* (Munkvold y Desjardins, 1997).

La podredumbre de la mazorca y granos es más frecuente cuando las condiciones meteorológicas, cálidas y húmedas se presentan luego de la polinización. Dicha enfermedad es causada por *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. verticillioides*, éste último, posiblemente sea el patógeno más común de la mazorca de maíz, tanto en ambientes cálidos, húmedos y secos (Nelson, 1992).

La podredumbre de la mazorca constituye un problema en todo el mundo, esto se traduce en la reducción de los rendimientos y en la acumulación de diferentes metabolitos tóxicos que transforman los granos en inadecuados para el consumo humano y animal (Bukovcakova *et al.*, 1991; Chelkowski *et al.*, 1987; Perkowski *et al.*, 1991a, 1991b; Scott *et al.*, 1985).

## **2.2. Taxonomía del género *Fusarium***

Los estudios taxonómicos del género *Fusarium* tienen dos inconvenientes: la falta de estabilidad de las especies en los medios comunes de laboratorio y el uso de diferentes sistemas empleados para su clasificación en distintos países. Los sistemas taxonómicos usados hasta el presente están basados sobre variantes de dos escuelas micológicas, la de Wollenweber y Reinking (1935) en la cual se reconocían 65 taxones y la de Snyder y Hansen (1940, 1941, 1945) que aceptaban solo 9 especies.

Todas las especies de *Fusarium* tienen una característica taxonómica en común: la producción de macroconidios de diversas formas, generalmente con una sola célula basal en forma de pie, cuando los mismos se producen en esporodoquios. Este criterio, combinado con otras características primarias o secundarias, constituye la base para la taxonomía clásica del género.

Para la separación del género *Fusarium*, Nelson *et al.* (1983) se basaron en características primarias y secundarias. Las primeras contemplan la forma del macroconidio, la presencia o ausencia de microconidios, forma del microconidio, si crecen o no en cadenas y el tipo de microconidióforo. Las características secundarias se basan en la presencia o ausencia de clamidosporas, la configuración y posición de las mismas, la presencia o ausencia de esclerocios y esporodoquios. La morfología de la colonia, la pigmentación y la velocidad de crecimiento son de utilidad si se usan procedimientos estandarizados. Basándose en dichas características Nelson *et al.* (1983) dividieron el género en 12 secciones entre las cuales se encuentra la Sección *Liseola*.

## **2.3. Sección *Liseola***

Las especies de *Fusarium* que taxonómicamente se ubican en la Sección *Liseola* son importantes como patógenas de distintas plantas de interés económico como arroz (Sun y Snyder, 1981), maíz (Leslie *et al.*, 1990; Reyes, 2001; Reynoso *et al.*, 2004), sorgo (Jardine y Leslie, 1992), espárragos (Elmer y Ferrandino, 1992), entre otros. Los metabolitos tóxicos

producidos por estas especies son química y biosintéticamente diversos e incluyen compuestos tales como fumonisinas (Chulze *et al.*, 1996, 1998; Gelderblom *et al.*, 1988; Ramírez *et al.*, 1996; Reyes, 2001; Reynoso *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2001), moniliformina (Marasas *et al.*, 1986), fusaproliferina (Bottalico, 1998; Logrieco *et al.*, 1996; Reynoso *et al.*, 2004), beauvericina (Bottalico, 1998; Logrieco *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 1996; Reynoso *et al.*, 2004) y otras toxinas que aún permanecen sin identificarse (Leslie *et al.*, 1996).

*Fusarium verticillioides* presenta una distribución mundial. Se encuentra en zonas de clima templado, extendiéndose a zonas de clima tropical y sub-tropical. Ha sido aislado en países de América Central, Argentina, Alemania, Australia, Brasil, Canadá, China, Egipto, Estados Unidos, Filipinas, Hong Kong, India, Indonesia, Israel, Italia, Jamaica, Japón, Libia, Nepal, Nigeria, Nueva Zelanda, Perú, Sudáfrica, Sur de Taiwán, Turquía, Zimbabwe. Raramente se ha encontrado en zonas de temperaturas frías, aunque ha sido informado en Rusia (Bacon y Nelson, 1994).

#### **2.4. Ciclo biológico de *Fusarium verticillioides***

Se puede desarrollar una planta enferma a partir de una semilla infectada asintomática que puede causar declinamiento o muerte de la planta antes de alcanzar el estado reproductivo. *F. verticillioides* puede infectar las raíces de la planta a partir de su presencia en residuos de plantas y suelo. Puede permanecer en el suelo dentro de fragmentos de tallos enterrados a 30 cm de la superficie, con humedad de 5 a 35%, y temperatura de 5 a 10°C durante doce meses (Bacon y Nelson, 1994). No produce clamidosporas, pero puede producir hifas engrosadas que aparentemente prolongan su supervivencia (Kommendahl y Windels, 1981). Los peritecios se forman a principios de otoño y liberan las ascosporas en la primavera durante condiciones cálidas y húmedas y, son diseminadas por el viento hasta los tallos y mazorcas. Las ascosporas germinan y pueden penetrar directamente o a través de heridas e iniciar la infección primaria (Figura 2).

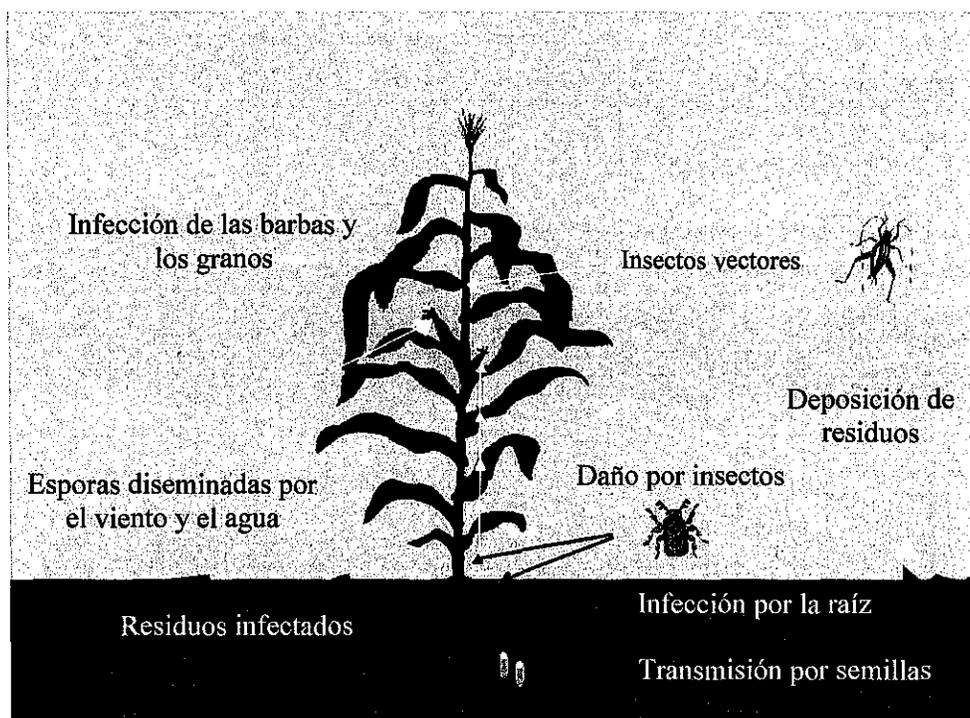


Figura 2. Ciclo de enfermedad de *Fusarium verticillioides* en maíz (Munkvold y Desjardins, 1997).

Existe otra vía de infección a través de la dispersión por el viento de las esporas en la superficie de las hojas, desde donde serán lavadas hacia las vainas foliares y tallo y desde allí la infección secundaria podrá progresar hacia el tallo, hojas y la mazorca a través del canal de los estilos (Bacon y Nelson, 1994). El estado fisiológico de las vainas foliares también pueden afectar la susceptibilidad (Headrick y Pataki, 1990). Otros factores, tales como daño causados por otros hongos patógenos, insectos, aves o granizo juegan un papel importante en la infección de las plantas de maíz por *F. verticillioides*. Generalmente, la infección por este hongo ocurre debido a que las esporas transmitidas por el viento y el agua llegan a los sitios dañados de las mazorcas y tallos, aunque algunos insectos también pueden actuar como vectores (Davis *et al.*, 1989).

*Fusarium verticillioides* es un hongo endofito en maíz y permanece en la planta asintomáticamente. El hongo puede localizarse por debajo del tejido vascular de cada semilla y dispersarse a toda la mazorca (McGee, 1998). Esta fase del ciclo de la enfermedad ha sido asociada principalmente con la enfermedad de la plántula; el papel de la transmisión a través de la semilla en la podredumbre del tallo y grano no es claro, pero en algunos casos las cepas aisladas de semillas también pueden encontrarse en toda la planta (Kommendahl y Windels, 1981; McGee, 1998). *Fusarium verticillioides* puede permanecer viable en la semilla del maíz por 8 años, debido a su localización sistémica lo que provee condiciones favorables para mantener su virulencia y viabilidad por años. A partir del ciclo de infección de *F. verticillioides* en maíz se puede apreciar que la contaminación fúngica comienza en el campo y se traslada al cereal almacenado.

## **2.5. Complejo *Gibberella fujikuroi***

Las especies de la sección *Liseola* que incluyen los anamorfos *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenweber y Reinking) Nelson, Tousson y Marasas, *F. anthophilum* (A. Braun) Wollenweber y *F. globosum* Rheeder, Marasas y Nelson, tienen como teleomorfo a *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & Kimura. *Gibberella fujikuroi* se define como un complejo de especies que desde el punto de vista taxonómico es controversial, por lo que los taxónomos aún discuten en cuanto al número de especies dentro de la Sección *Liseola* y sobre los criterios morfológicos usados para distinguirlas.

El uso del concepto de especie con carácter diagnóstico es una forma de evitar las dificultades en la identificación cuando los organismos son morfológicamente similares (Leslie y Mansuetus, 1995; Leslie y Klein, 1996). Las especies biológicas son grupos de poblaciones que se cruzan sexualmente y que están aisladas reproductivamente de otros grupos. Dos poblaciones pertenecen a la misma especie biológica si son capaces de intercambiar información genética entre ellas y, dos individuos son miembros de la misma especie biológica si entre ellos pueden cruzarse y producir una progenie fértil. El apareamiento, por lo tanto, es una herramienta útil para definir las especies biológicas en el complejo *G. fujikuroi*.

Hasta la fecha se han descrito 9 poblaciones de apareamiento designadas con las letras A a I en el complejo *G. fujikuroi*. La tabla 1 resume las poblaciones de apareamiento conocidas y sus correspondientes anamorfos asociados.

Tabla 1. Poblaciones de apareamiento del complejo *Gibberella fujikuroi* y su correspondiente anamorfo y teleomorfo.

Poblaciones de apareamiento	Anamorfo	Teleomorfo
A	<i>F. verticillioides</i>	<i>G. moniliformis</i>
B	<i>F. sacchari</i>	<i>G. sacchari</i>
C	<i>F. fujikuroi</i>	<i>G. fujikuroi</i>
D	<i>F. proliferatum</i>	<i>G. intermedia</i>
E	<i>F. subglutinans</i>	<i>G. subglutinans</i>
F	<i>F. thapsinum</i>	<i>G. thapsina</i>
G	<i>F. nygamai</i>	<i>G. nygamai</i>
H	<i>F. circinatum</i>	<i>G. circinata</i>
I	<i>F. konzum</i>	<i>G. konza</i>

Leslie y Summerell, 2006

La identificación de las poblaciones de apareamiento a la cual pertenecen las cepas aisladas en el campo es de importancia desde el punto de vista micotoxicológico y fitopatológico (Leslie, 1991). Las poblaciones de apareamiento conocidas dentro del complejo *G. fujikuroi* son todas heterotálicas típicas. El tipo de apareamiento es dimítico, es decir, está controlado por un único locus, llamado "locus de apareamiento" (locus *MAT*) con 2 alelos idiomórficos (*MAT-1* y *MAT-2*). Dicho mecanismo es común para la mayoría de los Ascomycetes (Coppin *et al.*, 1997; Pöggeler, 2001; Yun *et al.*, 2000).

Uno de los mejores métodos para distinguir las especies biológicas del complejo *G. fujikuroi* es por medio de los cruzamientos sexuales en agar zanahoria con cepas testigos fértiles (Klittich y Leslie, 1988). Los resultados obtenidos son claros pero el método requiere demasiado tiempo, de 4 a 6 semanas desde la inoculación hasta el final del análisis. Los

cruzamientos sexuales pueden ocurrir solamente si las cepas parentales llevan alelos de tipo apareamiento opuestos (Glass y Kulda, 1992), por lo tanto, un cruzamiento fértil indica que las cepas aisladas pueden comportarse como parentales masculinas y que pertenecen a la especie biológica evaluada.

Las especies biológicas pueden diferenciarse además teniendo en cuenta otros criterios, uno de ellos es la producción diferencial de metabolitos secundarios (Leslie *et al.*, 1992a). Los miembros de la población de apareamiento A, anamorfo *F. verticillioides*, son capaces de sintetizar niveles altos de fumonisinas, mientras que los miembros de la población F, anamorfo *F. thapsinum*, no son productores de dicha micotoxina. Los miembros de las poblaciones D y G son capaces de sintetizar cantidades significantes de fumonisinas, mientras que los miembros de las poblaciones B y E son productores de bajos niveles o no productores de la misma (Leslie *et al.*, 1992b).

Los miembros de las poblaciones B, C, D, E y F son productores de altos niveles de moniliformina, mientras que los miembros de las poblaciones A no son productores de dicha toxina. En cuanto a la producción de beauvericina, las poblaciones A, B, C, D, E son altos productores y los miembros de la población F no la producen. Los miembros de la población D y E son buenos productores de fusaproliferina, mientras que los miembros de las poblaciones A, B, C y F no son buenos productores (Logrieco *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 1996).

Además puede considerarse para diferenciar algunas poblaciones de apareamiento, la preferencia de huésped. En maíz, por ejemplo, la población aislada más frecuentemente es la A, le siguen en orden de importancia las poblaciones D y E, mientras que las poblaciones B y F se aíslan en menor frecuencia (Desjardins *et al.*, 1994; Leslie, 1995; Moretti *et al.*, 1995; Kedera *et al.*, 1999). En sorgo predomina la población F y menos frecuentemente las poblaciones D y B (Leslie *et al.*, 1995; Mansuetus *et al.*, 1997). Como se puede observar, este criterio puede llevar a resultados ambiguos dado que, una población puede ser aislada con alta frecuencia en otros huéspedes además de su huésped primario.

## 2.6. Micotoxinas

Los hongos filamentosos son capaces de secretar enzimas que desdoblan compuestos macromoleculares complejos y utilizarlos para su crecimiento y metabolismo. Pueden absorber nutrientes de bajo peso molecular así como producir y secretar metabolitos secundarios los cuales son compuestos de bajo peso molecular, que no están asociados al proceso de crecimiento (Betina, 1989). En condiciones de laboratorio, dichos compuestos son generalmente producidos en niveles altos durante la fase estacionaria del crecimiento, y su formación está asociada con un proceso de diferenciación morfológica (Moss, 1996).

Existe un debate continuo sobre la naturaleza del metabolismo secundario y el papel que dichos metabolitos tienen en la biología de los hongos productores, pero muchos de los metabolitos secundarios tiene actividad biológica y pueden ser tóxicos para microorganismos (antibióticos), plantas (fitotoxinas) o animales (micotoxinas) (Vining, 1992).

Las micotoxinas se definen como compuestos orgánicos, biológicamente activos y de amplio espectro que pueden traer aparejado problemas de intoxicaciones agudas y crónicas, con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos entre otros (Hesseltine, 1985). Estos compuestos son considerados metabolitos secundarios porque no cumplen un papel en la fisiología del organismo que los producen y se sintetizan después de la fase exponencial del crecimiento del hongo. Se han identificado más de 300 compuestos micotóxicos diferentes, producidos por aproximadamente 350 especies de hongos (Betina, 1989).

Las micotoxinas presentan estructuras químicas diferentes y pueden ser clasificadas en término de su camino biosintético. Esto se debe a que el metabolismo primario y secundario están conectados por un número relativamente pequeño de intermediarios metabólicos simples, tales como: Acetil-CoA, ácido mevalónico, aminoácidos y ácido shikímico (Betina, 1989).

Uno de los principales problemas de la presencia de micotoxinas en productos vegetales son las pérdidas económicas que originan. La Organización para la Alimentación y la Agricultura

de las Naciones Unidas estima que un 25% de la producción agrícola destinada a alimentos es afectada por micotoxinas cada año (Mannon y Johnson, 1985).

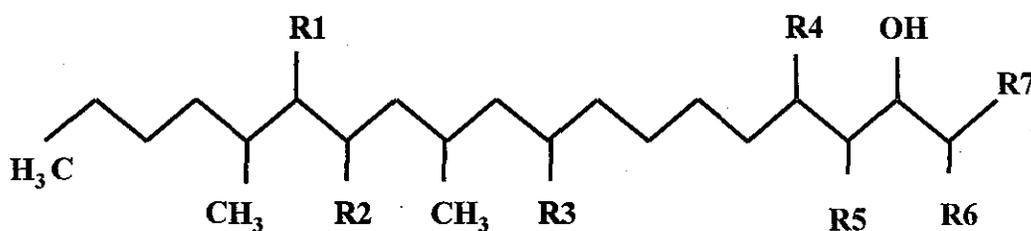
Los principales grupos de micotoxinas del género *Fusarium* aisladas de granos de cereales son: tricotecenos, incluyendo a toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS), deoxinivalenol (DON), fusarenona X (FUSA) y nivalenol (NIV); zearalenona (ZEN) y fumonisinas (FBs). Además, también se han detectado otras micotoxinas como moniliformina (MON), beauvericina (BEA) y fusaproliferina (FUS) (Bottalico, 1998). El interés por las especies de *Fusarium* toxicogénicas es cada vez mayor debido al descubrimiento de nuevos metabolitos tóxicos que tienen importancia en la salud pública. Dichos metabolitos están asociados con importantes enfermedades en animales de granja y en humanos (Nelson *et al.*, 1993).

### 2.6.1. Fumonisinias

Las fumonisinas (FBs) son una familia de toxinas aisladas por primera vez a partir de cultivos de *F. verticillioides* MRC 826 en maíz (Gelderblom *et al.*, 1988). El aislamiento y caracterización de dicha micotoxina se inició cuando en Nueva Caledonia (Oceanía) ocurrió una mortandad de numerosos caballos, los cuales presentaban síntomas de leucoencefalomalacia. Por otro lado, también se presentó una elevada incidencia de cáncer esofágico en humanos en Sudáfrica. El alimento ingerido por los caballos estaba contaminado con *F. verticillioides*. Dos grupos independientes, uno en Sudáfrica y otro en Nueva Caledonia, aislaron fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), la más abundante de las fumonisinas (Bottalico, 1998; Plattner *et al.*, 1990; Reynoso *et al.*, 2004; Shephard *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 2001) a partir de dicho alimento (Bezuidenhout *et al.*, 1988).

Químicamente dichas toxinas son una serie de amino-polioles de cadena larga (20 carbonos) esterificados en los carbonos 14 y 15 con dos grupos de ácidos tricarbóxicos. Hasta la fecha se han identificado 28 análogos de las FBs, que se pueden separar en 4 grupos principales, identificados como fumonisinas de la serie A, B, C y P (Figura 3), solo la serie B y C son importantes desde el punto de vista de la contaminación natural (Pittet, 1998). La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) es la más abundante de dichas micotoxinas presentes en cultivos de maíz y

subproductos naturalmente contaminados, destinados tanto al consumo humano como animal y representa aproximadamente el 70% o más del total de FBs producidas *in vivo* e *in vitro*. Fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) representa el 15 al 25%, mientras que FB<sub>3</sub> generalmente representa el 3 al 8% de las FBs totales en maíz y subproductos, arroz y en medio líquido (Branham y Plattner, 1993).



Serie	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
FB <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FB <sub>4</sub>	TCA	TCA	H	H	H	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
FA <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FA <sub>2</sub>	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FA <sub>3</sub>	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
FC <sub>1</sub>	TCA	TCA	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	H

Figura 3. Estructura química de algunas de las fumonisinas de la serie A, B, y C.

Quince especies de *Fusarium* han sido reportadas como productoras de fumonisinas, ocho de las cuales pertenecen a la Sección *Liseola*: *F. verticillioides*, población de apareamiento A (MP-A) (Chulze *et al.*, 1996, 1998; Gelderblom *et al.*, 1998; Magnoli *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 1991, Reynoso *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 1990; Visconti y Doko, 1994), *F. sacchari* MP-B; *F. fujikuroi* MP-C; *F. proliferatum* MP-D; *F. subglutinans* MP-E; *F. subglutinans* sensu lato, aislado de semillas de teosinte; *F. thapsinum* MP-F; *F. anthophilum*; y *F. globosum* (Leslie y Summerell, 2006). Especies relacionadas con la Sección *Liseola*

recientemente descritas, también son productoras de FBs, ellas son: *F. dlamini*, *F. napiforme*, y *F. nygamai* MP-G.

### 2.6.2. Efectos Biológicos de las Fumonisinias

De las fumonisinias descritas, solo la FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> parecen tener significancia toxicológica ya que, tanto FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, FA<sub>1</sub> y FA<sub>2</sub> cuando se encuentran en condiciones naturales se presentan en bajas concentraciones. Se ha demostrado que FB<sub>1</sub> causa leucoencefalomalacia equina (ELEM), edema pulmonar en cerdos (PPE), hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad en ratas, inmunosupresión y riesgo de cáncer esofágico en humanos (Chu y Li, 1994; Haschek-Hock, 1999; Kellerman *et al.*, 1990; Marasas, 1995; Rheeder *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1992; Voss *et al.*, 1993).

La leucoencefalomalacia equina (ELEM), es una enfermedad neurotóxica, caracterizada por una necrosis multifocal de la materia blanca de uno de los hemisferios bajos del cerebro. Es una de las micotoxicosis más comunes relacionadas con las FBs. El síndrome se asocia al consumo de alimentos contaminados con FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, producidas especialmente por *F. verticillioides*. El examen histopatológico de los animales intoxicados revela frecuentemente la presencia de lesiones hepáticas y renales como también focos hemorrágicos en los hemisferios cerebrales y en otras partes del sistema nervioso central como bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal (Marasas *et al.*, 1988). Ante la falta de recomendaciones, miembros del Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, a través del Laboratorio de Diagnóstico recomiendan no destinar a equinos, alimentos con un contenido de FB<sub>1</sub> superior a 5 ppm (FDA, 2000a).

El síndrome de edema pulmonar porcino (PPE), es una enfermedad inusual en esta especie animal, se caracteriza por dificultad respiratoria, postración y eventual muerte del animal. Las necropsias de los animales afectados se caracterizan por presentar un severo edema de pulmón e hidrotórax (Harrison *et al.*, 1990; Norred y Voss, 1994). El PPE está asociado al consumo de maíz y principalmente los desperdicios constituidos por granos rotos, restos de tallos, paja y otros residuos, contaminados con *F. verticillioides* y FBs. Según Ross (1994), la morbilidad de

la enfermedad varía entre 5 y 50% con una mortalidad mayor al 50%, y el curso clínico agudo varía entre 1 y 2 días. Otros órganos susceptibles a la acción de las FBs en cerdos son hígado y páncreas. Si bien todavía no hay una regulación oficial para FBs, el Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, a través del Laboratorio de Diagnóstico recomienda no destinar a los cerdos alimentos con un contenido de FB<sub>1</sub> superior a 10 ppm (FDA, 2000a).

El consumo de dietas contaminadas con *F. verticillioides* en pollos de engorda, se asocia a la producción de cambios funcionales en las aves como: necrosis hepática multifocal, hiperplasia biliar, reducción en el peso corporal, de hígado y bazo, anormalidades esqueléticas (arqueo de patas), alteración en los parámetros bioquímicos y elevada mortalidad (Espada *et al.*, 1994). En pavos se han observado alteraciones en el miocardio. El Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, recomienda no destinar para el consumo de aves de corral alimentos con un contenido de FB<sub>1</sub> superior a 50 ppm (FDA, 2000a).

Debido al elevado índice de cáncer de esófago en la población de Transkei, Sudáfrica, se estudió la relación entre consumo de maíz y la presencia de *F. verticillioides*. Además este cereal constituye el alimento básico (90%) de la población de esa zona. Varios estudios mostraron que FB<sub>1</sub> podría ser responsable del cáncer esofágico, junto a otros factores predisponentes como el hábito de fumar, el consumo de alcohol, la dieta rica en maíz y las deficiencias nutricionales (Franceschi *et al.*, 1990). La concentración natural máxima asociada con cáncer esofágico es de 10,500 ng g<sup>-1</sup> (ppb) en maíz "sano" y, entre 600 y 63,200 ng g<sup>-1</sup> en maíz visiblemente "mohoso" (Hopmans y Murphy, 1992). Los niveles de fumonisinas en alimentos de animales asociados con brotes de leucoencefalomalacia equina se encuentran entre 1,300 y 150,000 ng g<sup>-1</sup> de FB<sub>1</sub>, 100 y 23,000 ng g<sup>-1</sup> de FB<sub>2</sub>, mientras que los niveles asociados con el edema pulmonar porcino son 105,000 a 155,000 ng g<sup>-1</sup> de FB<sub>1</sub> (Haschek *et al.*, 1992).

La Agencia Internacional de la Investigación del Cáncer (IARC) estableció que: a) hay *evidencia insuficiente* de la carcinogenicidad en humanos de las toxinas derivadas de *F. verticillioides*, b) hay *evidencia suficiente* de la carcinogenicidad en animales de experimentación de material de cultivo de *F. verticillioides*, c) hay *evidencia limitada* de la carcinogenicidad de FB<sub>1</sub> en animales de experimentación. De acuerdo a lo mencionado

anteriormente, las toxinas derivadas de *F. verticillioides* son consideradas como 2B, “posibles carcinógenos para humanos” (IARC, 1993).

## **2.7. Factores que influyen en la contaminación del maíz por *Fusarium* y fumonisinas**

La infección del maíz con especies de *Fusarium* y la contaminación por fumonisinas son generalmente influenciadas por diversos factores incluyendo las condiciones ambientales (clima, temperatura y humedad), infestación por insectos y manejo pre y post-cosecha. Estos factores no ocurren independientemente, en la mayoría de los casos son interacciones complejas.

### **2.7.1. Factores ambientales**

Reportes a nivel mundial mostraron alta contaminación por fumonisinas en regiones con climas secos y calurosos (Shephard *et al.*, 1996) y cuando las condiciones fueron favorables para la infección por *Fusarium* (Marasas *et al.*, 2001). En una misma localidad la contaminación por fumonisinas no es siempre la misma de un año a otro. Henning *et al.* (2000) encontraron en Argentina una marcada diferencia en la contaminación por fumonisinas en maíz de la misma variedad durante dos años consecutivos de cultivo, debido a que las condiciones fueron diferentes en ambas estaciones.

Estudios realizados en Brasil en diferentes regiones y condiciones climáticas (precipitación pluvial 92.8 mm en la región sur; 202 mm en el norte), mostraron mayores niveles de fumonisinas en maíz cosechado en la región con mayor precipitación pluvial (Ono *et al.*, 1999). El estrés hídrico durante el periodo que precede a la cosecha de maíz, debido a las oscilaciones drásticas en la precipitación pluvial y en la humedad relativa crea condiciones favorables para la producción de fumonisinas (Visconti 1996). Shelby *et al.* (1994) sugieren que el clima seco durante o antes de la polinización del maíz, puede ser un factor importante para la producción de fumonisinas, por lo que éstos estudios llevan a la conclusión que los patrones de precipitación pluvial o el estrés a la planta del maíz durante las últimas etapas del

cultivo tienen gran influencia sobre la contaminación por el hongo y la consecuente producción de fumonisinas.

Por otra parte, la temperatura y las condiciones de humedad durante la estación del cultivo, así como durante el almacenamiento son factores que pueden afectar la infección por especies de *Fusarium* y la síntesis de fumonisinas. La actividad de agua ( $a_w$ ), que representa la disponibilidad de agua para el crecimiento del hongo juega un papel importante. Velluti *et al.*, (2000) estudiaron *in vitro* la competencia fúngica en el maíz y encontraron que el porcentaje de crecimiento de *F. verticillioides* fue mayor a 25°C mientras que a 15°C fue menor. Scott (1993) sugirió que la mejor temperatura para la producción de fumonisinas es de 20°C, mientras que Marín *et al.* (1999b) encontraron mayor producción de fumonisinas a 30°C y a una  $a_w$  de 0.98. Sin embargo, Alberts *et al.* (1990) mostraron que el promedio de FB<sub>1</sub> obtenido en campo a 25°C (9.5 g Kg<sup>-1</sup>) fue significativamente mayor a 20°C (8.7 g Kg<sup>-1</sup>) y a 30°C (0.6 g Kg<sup>-1</sup>). Munkvold y Desjardins (1997) reportaron que *F. verticillioides* generalmente crece en granos cuando el contenido de humedad es mayor de 18 - 20%.

Los estudios de laboratorio han establecido que el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de *F. verticillioides* es de 22.5 - 27.5°C con un máximo de 32 - 35°C y una temperatura mínima de 2.5 - 5°C (Bacon y Nelson 1994).

### 2.7.2. Prácticas agronómicas

Se ha reportado que las siembras tardías de maíz cosechados en condiciones húmedas favorecen las enfermedades causadas por *F. verticillioides* y la prevalencia de este hongo se incrementa considerablemente con estaciones de lluvias tardías. El monocultivo de maíz u otro cereal en el mismo campo o en campos cercanos favorece la infección del hongo al incrementarse en inóculo fúngico y la población de insectos que atacan al maíz (Bilgrami y Choudhary, 1998).

Lipps y Deep (1991) encontraron que la rotación de cultivos de maíz/cultivo no hospedero de *Fusarium* fueron mejores que la siembra intensiva del maíz. El control de malezas puede

disminuir la infección por el hongo en campo ya que ayuda a eliminar plantas en las cuales puede encontrarse *Fusarium*.

### **2.7.3. Características del maíz**

El tipo del material genético del maíz y características del grano, tales como, color, tipo de endosperma, composición química y estado de desarrollo pueden influir en la contaminación por *Fusarium* y sobre la producción de fumonisinas. Maíz de madurez tardía, en el cual el contenido de humedad disminuye lentamente a menos de 30% son más susceptibles a la enfermedad por éste género (Manninger, 1979). Es considerado que materiales de maíz con mazorca de tipo vertical y punta cerrada, pericarpio delgado y propenso a grano quebrado son más susceptibles a la infección por *Fusarium* (Riley y Norred, 1999).

Las fumonisinas se encuentran más concentradas en el pericarpio y germen del grano que en el endosperma por lo que remover estas partes con procesos mecánicos puede reducir significativamente la toxina del maíz (FDA, 2000b). Aun cuando el color del grano parece no tener influencia en la contaminación por fumonisinas, las investigaciones realizadas por Shephard *et al.*, (1996) reportaron que en algunos años los niveles de fumonisinas fueron significativamente menores en el maíz amarillo que en el blanco, pero una situación contraria fue observada en otros períodos.

Hennigen *et al.*, (2000) compararon la contaminación de variedades de maíz del endosperma tipo cristalino, con tipo dentado, sin encontrar diferencia significativas. Por otra parte, la edad del grano puede tener influencia en la producción de fumonisinas. Warfield y Gilchrist (1999) encontraron altas concentraciones de fumonisinas en el grano de maíz de estado dentado y niveles significativamente menores en granos de estado inmaduro, sugiriendo que la producción de la toxina inicia durante el desarrollo de la mazorca y se incrementa cuando el grano se acerca a la madurez fisiológica.

#### 2.7.4. Operaciones post-cosecha

El manejo y proceso post-cosecha (separar, limpiar, descascarillar, molienda, fermentación y cocinado) afectan en forma positiva o negativa la infección fúngica y la producción de fumonisinas en el maíz. Cantidades importantes de fumonisinas (>74%) pudieron ser removidas mediante el lavado simple del maíz. La inmersión en agua del grano y la remoción de la fracción flotante puede ser una medida efectiva (Shetty y Bhat, 1999), estos autores también encontraron una remoción cercana al 86% al adicionar sal al agua durante dicho proceso. En contraste, la fermentación del maíz no permitió la reducción de los niveles de fumonisinas (Shepard *et al.*, 1996; Desjardins *et al.*, 2000).

La molienda puede influir en la contaminación por fumonisinas en el maíz. La molienda húmeda mostró una distribución en las diferentes fracciones del maíz de la siguiente manera: baja concentración o no detectada en el almidón, y mayor en las fracciones de fibra, germen y agua de lavado, esto indica que los alimentos a base de maíz derivados de la fécula o del almidón contienen baja contaminación por fumonisinas. Después de la molienda seca, los niveles de fumonisinas se encuentran menores en el grano fragmentado y altos en el germen, salvado y en las fracciones finas (Bolger *et al.*, 2001).

Con respecto al cocinado se ha observado que las fumonisinas son bastante estables al calor y el cocinado ordinario no reduce substancialmente la toxina (Alberts *et al.*, 1990; Scott, 1993). La remoción significativa de fumonisinas puede ocurrir solo cuando la temperatura es mayor a 150°C durante el cocinado (Bolger *et al.*, 2001). Aunque algunos métodos de procesamiento pueden reducir favorablemente los niveles de fumonisinas en los productos a base de maíz, es importante considerar que su eficiencia dependerá de diversos factores incluyendo el contenido de humedad del producto, el grado de contaminación y distribución de la toxina en el producto y la presencia de aditivos (Charmley y Prelusky, 1995; Bolger *et al.*, 2001).

## 2.8. Prevención y control de la contaminación con fumonisinas

Cualquiera que sea la estrategia empleada, se debe considerar las tres fases de producción: pre-cosecha, cosecha y post-cosecha, a fin de minimizar los riesgos en la salud de los consumidores, tanto humanos como animales.

El desarrollo de variedades resistentes ofrece un gran potencial a la hora de minimizar el riesgo de contaminación del maíz por fumonisinas. Identificar los factores de resistencia del huésped permitirá mejorar genéticamente al mismo, como una importante vía de prevención, ya que este tipo de contaminación representa un problema complejo y requiere la integración de distintos métodos de prevención (Headrick y Pataky, 1990).

El daño producido por insectos al cultivo también influye sobre la acumulación de fumonisinas ya que pueden facilitar la vía de ingreso de los hongos productores de micotoxinas. El control químico con fungicidas puede contribuir a minimizar o reducir potencialmente la producción de micotoxinas. Sin embargo, los fungicidas son incapaces de controlar eficientemente la producción de algunas potentes micotoxinas producidas por especies de *Fusarium*, siendo conflictivos los resultados obtenidos en distintos ensayos realizados tanto en el laboratorio como a campo (D'Mello *et al.*, 1998).

El control de la cosecha incluye la optimización del tiempo, la cosecha debería realizarse cuando el cultivo está completamente crecido y lo más seco posible. La remoción de las partes visiblemente contaminadas a través de la limpieza y la segregación es una opción simple, muy efectiva y de bajo costo (Dickens y Whitaker, 1975).

El almacenamiento es la fase más crítica. La acumulación de humedad y calor favorece el crecimiento fúngico que lleva a la formación de las micotoxinas. El control post-cosecha se enfoca hacia un almacenamiento óptimo: el secado apropiado es esencial para prevenir la proliferación fúngica y la formación de micotoxinas. Se debe tener en cuenta la presencia de insectos, ya que su actividad metabólica aumenta la disponibilidad de agua para los hongos durante el almacenamiento. El manejo integrado de los cultivos observando cada una de las

fases de producción del alimento puede ayudar a minimizar los riesgos en la salud de los consumidores asociados con la contaminación por micotoxinas (Bennett *et al.*, 1996).

El uso de antioxidantes han demostrado algunos efectos sobre la germinación de conidios, crecimiento y producción de micotoxinas de especies aflatoxicogénicas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Thompson, 1991). Además, Thompson (1991, 1994) y Thompson *et al.*, (1993) demostraron que los antioxidantes también podían inhibir el crecimiento y la producción de moniliformina por *F. verticillioides* y especies de *Penicillium*. Estudios recientes *in vitro* e *in situ* han demostrado que diferentes antioxidantes, tales como propilparabeno (PP) e hidroxianisol butilado (BHA) controlan el crecimiento y producción de FBs por *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en diferentes condiciones de temperatura y  $a_w$  (Etcheverry *et al.*, 2002; Reynoso *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003).

Entre las estrategias que permite el control del crecimiento de hongos patógenos a nivel de cultivo se encuentran también, el uso de extractos vegetales, los cuales poseen características idóneas para inhibir el desarrollo y reproducción de especies productoras de micotoxinas. En el caso de los hongos fitopatógenos, existe información de aproximadamente 400 especies de plantas con propiedad fungicida, y se estima que esta propiedad es una característica que se presenta frecuentemente en algunos metabolitos secundarios (Grainge y Ahmed, 1988). Investigaciones recientes indican que extractos de plantas que contienen aceites esenciales muestran mayor actividad fungicida (Carpinella *et al.*, 2003; Montes-Belmont, 1996; Wilkinson *et al.*, 2003). Sin embargo, en los últimos años se han realizado estudios con la intención de evaluar la actividad fungicida de otros metabolitos secundarios como los alcaloides, principalmente derivados de plantas del género *Lupinus* aunque, hasta el momento son pocos los estudios reportados.

## **2.9. Género *Lupinus* (lupinos)**

El género *Lupinus* pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Genisteas* (Takhtajan, 1987) y ha sido cultivado y usado drante siglos en amplias zonas geográficas para la alimentación animal y humana (Gladstones, 1974). Son leguminosas que

se caracterizan por ser plantas anuales o perennes, herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas, con flores vistosas de color azul o violáceo (Figura 4). No se conoce el número exacto de especies del género *Lupinus*, algunos se consideran hasta 500. El número de nombres botánicos para este género es superior a 1,700; la mayoría de las especies son originarias del continente Americano y solo 12 de la costa del mediterráneo. Estas especies son muy dinámicas y ocupan hábitats desde el nivel del mar hasta la tundra Alpina arriba de los 4000 msnm (Planchuelo, 1994; Petterson, 1998).



Figura 4. Plantas de *Lupinus*

México se caracteriza por tener una riqueza extraordinaria de especies nativas del género *Lupinus*, hasta el momento se han reportado aproximadamente 110 especies distribuidas en 26 estados, desde el nivel del mar hasta los 4,000 m, distribuyéndose desde baja California hasta Chiapas, de las especies más abundantes se encuentran, *L. exaltatus*, *L. campestris*, *L. elegans*, *L. hartwegii*, *L. mexicanis*, *L. montanus* (Bermúdez et al., 1999). En el estado de Jalisco crecen aproximadamente 15 especies de *Lupinus* distribuidos en su mayoría en la Sierra Madre Occidental y Sierra Volcánica Transversal (Ruíz et al., 1999).

*Lupinus exaltatus* se localiza en zonas abiertas en bosques de pinoencino y es la especie más abundantemente en el estado de Jalisco; comúnmente se encuentra como maleza en zonas perturbadas o cultivadas, así como al borde de los caminos en las montañas de la Sierra Volcánica Transversal entre los 1,800 - 2,800 msnm. Su época de floración es en agosto y enero (McVaugh, 1987).

El principal uso de los lupinos actualmente es para consumo animal utilizado como fuente de proteínas y energía. Un buen ejemplo es Australia, donde el total de la producción de alimentos balanceados principalmente para cerdos, pollos y bovinos es de 7.85 millones de toneladas de los cuales 1.36 son leguminosas y de estas 1.13 son *Lupinus*, además se tiene estimado un consumo de 350,000 toneladas anuales de *Lupinus* como forraje para ovinos. En México principalmente *L. angustifolius* y *L. albus* son las especies más utilizadas para este propósito (Edwards y van Barneveld, 1998).

*Lupinus albus* (lupino blanco) es la especie mayormente cultivada, sus semillas se destinan principalmente a la alimentación animal, aunque en algunos países se utiliza para consumo humano en productos tanto para niños como para ancianos, en panes, galletas y espaguetis, enriquecidos con proteína y fibra de harina de lupinos (Rayas *et al.*, 1996; Egaña *et al.*, 1992) también se ha utilizado como análogo de leche de yogurt (Camacho, 1986), así como en dulces de chocolate hiperproteicos para deportistas a partir de semillas tostada y aislado de proteína de lupinos (Wittig *et al.*, 1993).

La única especie utilizada de América es *L. mutabilis* que fue domesticada por pobladores del período pre-inca hace más de 1500 años y ha contribuido significativamente al suministro de proteínas en la región andina de Perú, Bolivia y Ecuador y junto con el maíz, papa y quinona fue la base de la dieta de estos pobladores (Manzanares y Estrella, 1985).

### **2.9.1. Composición química y valor nutritivo de los lupinos silvestres**

Los lupinos se caracterizan por su alto contenido de proteínas en su semilla (36 – 40%), aunque las especies domesticadas se caracterizan por su alto porcentaje de alcaloides (2 – 4%), comparado con 0.05% de las domesticadas, lo que permite su utilización directa para el consumo humano y animal. La tabla 2 muestra la composición química de las principales especies silvestres del occidente de Mexico (Petterson, 1998).

Tabla 2. Composición química proximal en base seca de lupinos silvestres (%).

Componente	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>	<i>L. stipulatus</i>	<i>L. reflexus</i>
Proteínas (Nx 6.25)	42.94	40.66	40.09	36.70
Extracto etéreo	9.16	9.64	11.41	10.21
Cenizas	3.52	3.93	3.40	3.76
ELN <sup>1</sup>	33.46	31.24	34.48	34.51
Fibra Cruda	10.92	14.53	10.60	14.81

<sup>1</sup> Extracto libre de nitrógeno

Los lupinos son deficientes en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína, por lo que llegan a presentar bajos valores de Relación de Eficiencia Proteica (REP) (0.48-0.99), pero al suplementarla con metionina alcanza valores de 3.05 en comparación con la caseína (3.09), sin embargo sus proteínas son una fuente rica de triptófano y contiene buen balance del resto de aminoácidos esenciales con un alto grado de digestibilidad. En cuanto a los carbohidratos, se tiene reportado que la cáscara y el cotiledón presentan diferentes tipos, mientras que en la cascara predominan principalmente los estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas), en los cotiledones los de reserva como son principalmente (galactosa, arabinosa y ácido urónico (Petterson, 1998).

Desde el punto de vista nutritivo, las semillas de los lupinos presentan un buen potencial alimentario ya que las variedades cultivadas contienen altas concentraciones de proteína (35 - 45%) y de aceites (6 - 20%), similares a los de la soya (*Glycine max* L. Merr), con la ventaja de que los lupinos pueden crecer en suelos con condiciones desfavorables para la soya, lo que hace que éstos sean un recurso valioso para la alimentación de monogástricos y rumiantes en los sistemas productivos intensivos, por lo que podrían ser económicamente competitivos con la soya (Hanq, 1993).

### 2.9.2. Alcaloides de los *Lupinus*

En los lupinos se han detectado más de 100 alcaloides quinolizidínicos (AQ), entre los principales están la lupanina, espateína, 13-hidroxi-lupanina, angustifolina y anagirina. En contenido de alcaloides entre las especies de *Lupinus* es variable y está determinado por factores tales como, especie, cultivar, etapa fenológica, condiciones climáticas, edáficas, entre otros. En semillas, el contenido total de alcaloides varía desde 0.02% en las variedades dulces y domésticas; hasta un 5% en especies silvestres (Kinghorn *et al.*, 1980; Mankinen *et al.*, 1975; Hatzol *et al.*, 1983).

La estructura base de estos alcaloides es su anillo quinolizidínico, que pueden ser bicíclicos, tricíclicos o alifáticos (Figura 5), y se encuentran como base terciaria y como N-óxidos (Wink, 1983). Przybylak *et al.* (2005) determinaron la composición de alcaloides en algunos de las especies de *Lupinus* de México (Tabla 3).

Es importante señalar que el conocimiento del tipo y concentración de alcaloides en los lupinos silvestres mexicanos representa una alternativa para elegir las especies más adecuadas para obtener un alcaloide con una actividad biológica específica.

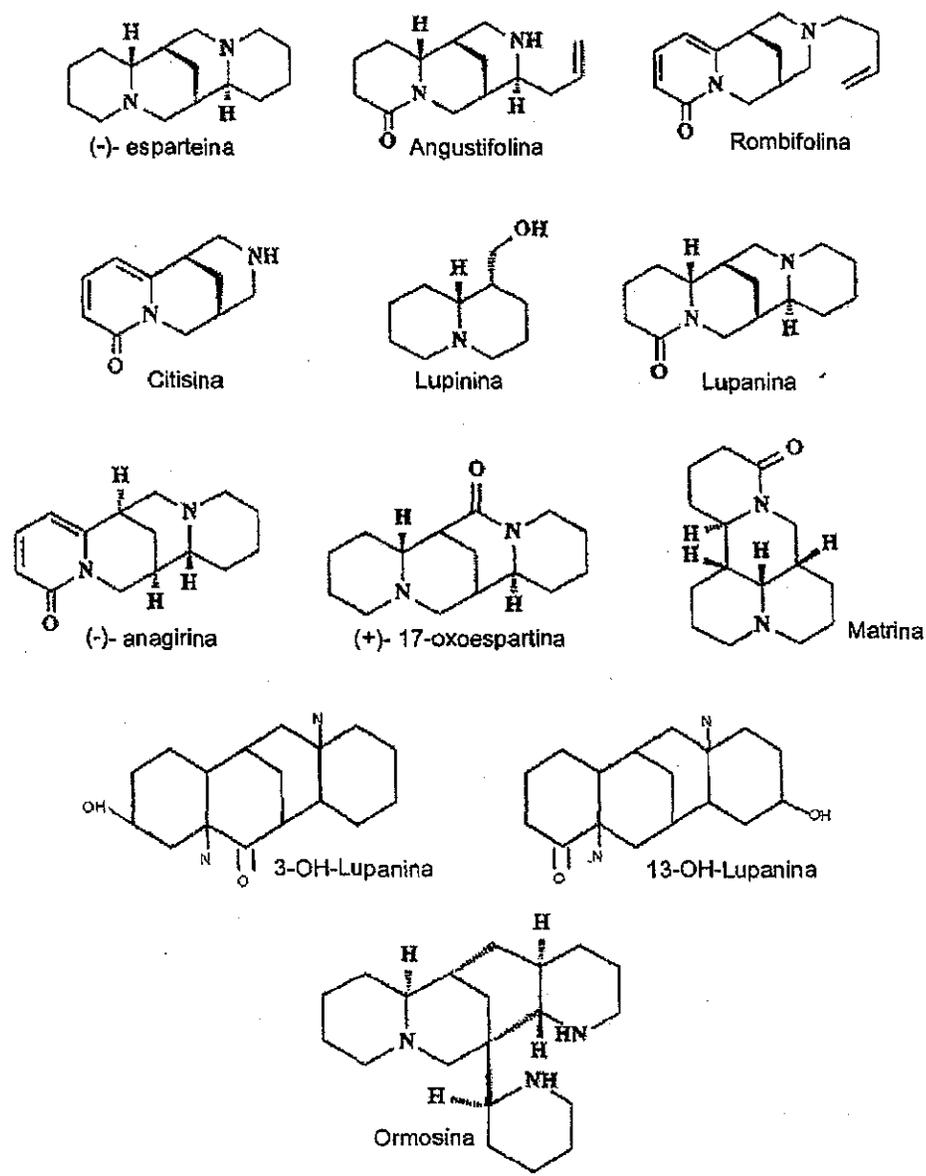


Figura 5. Estructuras de algunos alcaloides quinolizidínicos  
(Wink, 1993; Muzquiz *et al.*, 1994)

Tabla 3. Porcentaje del contenido de alcaloides principales en relación con el contenido total de alcaloides.

Alcaloides mayoritarios	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. montanus</i>
Lupanina	47.3	62.2	18.7
Epiafialina	11.9	-	-
$\alpha$ -isolupanina	10.6	18.6	-
3 $\beta$ -hidroxylupanina	7.1	7.7	1.1
Afilina	5.4	-	-
11,12-dehidrolupanina	1.1	-	-
5,6-dehidro- $\alpha$ -isolupanina	1.2	-	-
Afilidina	-	1.5	-
Esparteína	-	-	16.8
13-hidroxylupanina	-	-	24.6
Tetrahidrorombifolina	-	-	13.6
13 $\alpha$ -angeloyloxylupanina	-	-	11.6
13 $\alpha$ -tigloyloxylupanina	-	-	8.0
Alcaloides minoritarios	<1% (9)	<1% (15)	<1% (5)
Contenido total de alcaloides	2.7	3.5	2.6

### 2.9.3. Actividad biológica del género *Lupinus*

Estos alcaloides juegan un papel importante en la defensa de la planta contra microorganismos patógenos (virus, bacterias y hongos). Se ha propuesto que el mecanismo de acción de los alcaloides quinolizidínicos es el siguiente (Schmeller *et al.*, 1994):

- Se unen a receptores acetilcolínicos- nicotínicos (específicamente lupanina)
- Se unen receptores acetilcolínicos-muscarínicos (específicamente esparteína)
- Inhiben los canales de sodio-potasio.

A través de diversos estudios se ha podido comprobar que los alcaloides presentan las siguientes propiedades biológicas (De la Cuadra *et al.*, 1992, 1994; Stobiecki *et al.*, 1992; Peretiatkowics *et al.*, 1994; Wink, 1993; Zamora *et al.*, 2002):

- Son tóxicos para varias especies de insectos
- Inhiben la multiplicación viral, el crecimiento de bacterias y hongos patógenos
- Presentan propiedades amebicidas
- Tienen actividad alelopática
- Incrementan el rendimiento de otros cultivos

Además se ha detectado una actividad farmacológica como antirrítmico, depresiva del sistema nervioso central, hipotensivas, hipoglicémicas y antiinflamatorias (Szczawinska *et al.*, 1994; Muzquiz *et al.*, 1994).

En humanos se han reportado casos de intoxicación accidental por ingerir el agua utilizada para desamargado de las semillas de lupinos, manifestando el síndrome anticolinérgico por 48 h, desapareciendo espontáneamente estos síntomas (Márquez *et al.*, 1991).

Otro alcaloide quinolizidínico de importancia es la anarginina, debido a que tiene propiedades teratogénicas causantes de malformación o muerte embrionaria (Keeler, 1984). En EU especies de *L. laxiflorus*, *L. caudatus*, *L. sericeus* y *L. nootkatensis* han sido relacionados con el “síndrome del becerro encorvado”; defecto caracterizado por artrogriposis, espina dorsal curva y paladar hendido. Sin embargo, en pruebas epizootiológicas se creía que la anarginina era responsable del defecto congénito, posteriormente Keeler y Panter (1989) propusieron que la anarginina puede ser metabolizada en el rumen del bovino al alcaloide de amodendrina, que se sabe que es teratogénico. Esto es debido a que se ha observado en estudios que un extracto de anarginina de *L. caudatus*, mostró teratogenicidad en bovinos (Panter y Keeler, 1993).

Para evitar el efecto tóxico de los alcaloides, se han desarrollado métodos que permiten eliminarlos o disminuirlos a niveles inocuos, utilizando tratamientos químicos, físicos y biológicos (Santana *et al.*, 1999).

Con el mismo propósito se han desarrollado variedades mejoradas genéticamente de las especies cultivadas. Sin embargo el desarrollo de estas variedades ha ocasionado que estos cultivos sean más dependientes de pesticidas químicos, representando problemas económicos y ambientales, por lo que diversos autores han realizado estudios para extraer y utilizar los alcaloides como pesticidas biológicos o en farmacología (Peretiatkowics *et al.*, 1994). Actualmente se han desarrollado y patentado métodos para extraer y recuperar los alcaloides (Gulewics, Polish patent 152748) en lugar de eliminarlos, ya que estos extractos presentan actividad biológica: son tóxicos para varias especies de insectos, inhiben la multiplicación viral, el crecimiento de bacterias y hongos patógenos, incrementan el rendimiento de otros cultivos y además presentan actividad farmacológica (propiedades amebicidas, antiarrítmicos, depresoras del sistema nervioso central, hipotensivas, hipoglicémicas y antiinflamatorias) (Peretiatkowics *et al.*, 1994; Muzquiz *et al.*, 1989), lo que significa que podrían ser utilizados como pesticidas, herbicidas y fertilizantes biológicos o ser útiles como fungicidas (Stobiecki *et al.*, 1992).

Los extractos de alcaloides de los lupinos han sido evaluados previamente, sin embargo son pocos los estudios relacionados con su uso como fungicidas. Alcaloides, tales como, gramina y esparteína a concentraciones de 20, 30 y 40 mM inhibieron el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *F. avenaceum*, *F. solani* y *Pythium aphanidermatum*, sin embargo, la lupanina a las mismas concentraciones no mostró actividad inhibitoria sobre dichos hongos fitopatógenos (De la Cuadra *et al.*, 1992; 1994).

Zamora *et al.* (2002) encontraron inhibición del crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, cuando los extractos de lupanina obtenida de *Lupinus montanus* se agregaron en niveles de 450 ppm. Por otra parte, Arias *et al.* (2002) analizaron el efecto fungicida de extractos de alcaloides modificados de lupinos (tioanálogos de lupanina, (+) -2-thinosparteína) y de lupanina, sobre cepas de *Fusarium* spp., aisladas de plantas de *Agave tequilana* Weber. Los resultados mostraron reducción del crecimiento del hongo por los extractos modificados, sin embargo fue en menor proporción que la observada por efecto de los extractos ricos en lupanina. Sin embargo no se tienen estudios sobre el uso de extractos de alcaloides de *Lupinus* sobre especies de *Fusarium* aisladas del maíz.

### 3. HIPÓTESIS

1. Existe alta contaminación por especies de *Fusarium* (Sección *Liseola*) en los híbridos de maíz cosechados en el estado de Jalisco.
2. Los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus*, inhiben el crecimiento y la producción de fumonisinas por especies de *Fusarium verticillioides* aisladas de maíz.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES:

1. Estudiar la contaminación por especies de *Fusarium* (Sección *Liseola*) de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco durante el ciclo primavera-verano 2003.
2. Evaluar la capacidad fungicida de extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas de *Fusarium verticillioides*.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1. Evaluar el porcentaje de infección de las especies de *Fusarium* en diferentes híbridos de maíz cosechados en las parcelas experimentales del CUCBA.
  - 1.2. Determinar la frecuencia de distribución de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* en los híbridos de maíz estudiados.
  - 1.3. Determinar la población y tipo de apareamiento de las cepas de *F. verticillioides* aisladas.
  - 1.4. Determinar la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de *F. verticillioides* aisladas.
  - 1.5. Analizar las condiciones climáticas registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003.
- 
- 2.1. Evaluar *in vitro* la capacidad fungicida de los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de *Fusarium verticillioides*.
  - 2.2. Comparar el efecto fungicida de los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* con el uso del antioxidante butilhidroxianisol (BHA) para el control del crecimiento y producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Área de Micotoxicología del Laboratorio de Residuos Tóxicos II, Departamento de Salud Pública con el apoyo del Laboratorio de Botánica del Departamento de Botánica y Zoología y el Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

### **Etapas del estudio:**

5.1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* aisladas de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco.

5.2. Caracterización biológica de las especies de *F. verticillioides* aisladas de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco.

5.3. Evaluación de la capacidad productora de fumonisinas de las cepas de *F. verticillioides* aisladas.

5.4. Análisis de las condiciones climáticas (temperaturas máximas, mínimas y promedio; precipitación pluvial y humedad relativa) registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003.

5.5. Valoración del efecto fungicida del antioxidante BHA y de los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* sobre una cepa de *F. verticillioides* UDG 271 productora de altos niveles de fumonisinas.

## **5.1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* aisladas de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco**

### **5.1.1. Muestreo**

Diferentes híbridos de maíz se sembraron bajo un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones durante el ciclo agrícola 2003 en las estaciones experimentales del CUCBA, localizadas en el Km 15 de la carretera a Nogales, Latitud N 20° 44' 39'', longitud W 103° 30' 55'' y Altitud 1,598 msnm. En cada repetición, las parcelas de cada híbrido constaron de 4 surcos de 8 m de longitud con una separación entre los mismos de 0.70 m y una densidad de siembra de 5 plantas / m lineal. Las muestras de maíz de cada una de las parcelas se obtuvieron con una intensidad de muestreo del 0.7% (Delp *et al.*, 1986). A fin de unificar el método de recolección, las mazorcas se extrajeron de los surcos internos. Se consideró granos a cosecha cuando estos alcanzaron la madurez fisiológica. Las mazorcas de cada híbrido fueron desgranadas para obtener las submuestras (4 repeticiones de cada híbrido). Del total de híbridos sembrados (13), se eligieron al azar siete (54%) siendo evaluadas para determinar la presencia de especies de *Fusarium* Sección *Liseola* (Tabla 4).

### **5.1.2. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* de diferentes híbridos de maíz**

De cada una de las submuestras se tomaron cien granos, los cuales fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 1 minuto. Los granos se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en el medio de Nash - Snyder, selectivo para el aislamiento de especies de *Fusarium* (Nelson *et al.*, 1983). Las muestras se incubaron a 24°C durante 7 - 10 días bajo ciclos de 12h / 12h de luz blanca y luz negra, respectivamente. Se observaron macroscópicamente las colonias desarrolladas y se determinó el porcentaje de infección con especies de *Fusarium*. Las colonias que pertenecían al género *Fusarium* fueron transferidas al medio Agar hojas de clavel (AHC) e incubadas durante 7 días a 24°C bajo ciclos de 12h / 12h de luz blanca y luz negra, para su posterior identificación.

Tabla 4. Diseño de siembra por bloques al azar con cuatro repeticiones de los diferentes híbridos de maíz en las parcelas experimentales del CUCBA.

**4 PARCELAS**

		<b>REPETICIONES</b>			
		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
1.	Lucero 805	Lucero 802	P30G54	<b>UDG 600</b>	surcos
2.	<b>Lucero 801</b>	HV 313	<b>Lince</b>	Lucero 805	
3.	P30G54	Alsa 038W	HV 313	<b>Lucero 807</b>	
4.	<b>UDG 600</b>	<b>Lucero 807</b>	<b>Lucero 801</b>	<b>Lince</b>	
5.	<b>Lucero 807</b>	P30G54	Lucero 802	HV 313	
6.	<b>Lucero 901</b>	Lucero 805	<b>Lucero 901</b>	P30G54	
7.	<b>Lucero 808</b>	<b>Lince</b>	<b>Alsa 036W</b>	Alsa 039W	
8.	Alsa 038W	<b>UDG 600</b>	<b>Lucero 807</b>	<b>Lucero 808</b>	
9.	<b>Alsa 036W</b>	Alsa 039W	<b>Lucero 808</b>	<b>Lucero 801</b>	
10.	Lucero 802	<b>Lucero 801</b>	<b>UDG 600</b>	<b>Lucero 901</b>	
11.	Alsa 039W	<b>Alsa 036W</b>	Alsa 039W	Lucero 802	
12.	HV 313	<b>Lucero 808</b>	Alsa 038W	Alsa 038W	
13.	<b>Lince</b>	<b>Lucero 901</b>	Lucero 805	<b>Alsa 036W</b>	

**Nota:** los híbridos “en negrita” son los 7 híbridos que se utilizaron en el presente estudio (4 repeticiones de cada uno).

A partir del medio AHC se realizaron aislamientos monospóricos, para lo cual se tomó una pequeña cantidad del micelio fúngico y se realizó una suspensión en 10 mL de agua destilada estéril. Luego de homogeneizar dicha suspensión se la transfirió a una placa de Petri con agar agua (1.5%), se diseminó por rotación y se descartó. Las placas se incubaron inclinadas durante 16 a 18 h a 24°C para permitir la germinación de las esporas. Posteriormente se procedió a la obtención de conidios germinados bajo lupa (40X) mediante aguja histológica. Un conidio se transfirió a AHC en placas de Petri de 6 cm de Ø y, otro a tubos de ensayos con Agar Papa Glucosado (APG). Los cultivos se incubaron durante dos semanas con ciclos alternativos 12h / 12h de luz blanca y luz negra a 24°C (Anexo 1). La identificación de las cepas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nelson *et al.* (1983).

Para la identificación de las especies de *Fusarium* se observaron las características microscópicas luego del desarrollo de las cepas en AHC, y las características culturales en APG. El medio AHC favorece la esporulación sobre el desarrollo micelial, produciéndose conidios y conidióforos en abundancia, uniformes en tamaño y forma, reduciendo así la variación fenotípica. Las principales características de las especies pertenecientes a la Sección *Liseola* que se tuvieron en cuenta para la clasificación se detallan en la tabla 5.

Las especies de *Fusarium* aisladas e identificadas fueron mantenidas en medio Agar Jugo V8 (Nelson *et al.*, 1983) y liofilizadas, conservadas a 4° C a fin de evitar mutaciones o cambios en las características de las cepas. Todas las cepas están depositadas en el Centro de Cultivos del Laboratorio de Toxicología, Depto de Salud Pública, Universidad de Guadalajara, bajo la nominación UDG.

Tabla 5. Características diagnósticas de las especies de *Fusarium* Sección *Liseola*.

Características	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. anthophilum</i>	<i>F. globosum</i>
Macroconidios	Forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas. Paredes finas.	Leve forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.	Forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.	Leve forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.	Leve forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas.
Macroconidióforos	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas.
Microconidios	Unicelulares, ovales a ovoides con base truncada en falsas cabezas y cadenas.	Unicelulares, ovales a ovoides, piriformes a napiformes. En falsas cabezas y cadenas.	Unicelulares, fusiformes a ovales. En falsas cabezas.	Unicelulares, ovales a ovoides, piriformes a napiformes. En falsas cabezas.	Unicelulares, forma de clava a elipsoidales, en cadena o falsas cabezas. Globosos en grupos, nunca en cadena.
Microconidióforos	Monofiálides largas ramificadas y no ramificadas.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.	Monofiálides ramificadas y no ramificadas y polifiálides.
Clamidosporas	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Agar papa Glucosado	Micelio aéreo blanco a naranja pálido, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a naranja pálido, marrón a púrpura.	Micelio aéreo blanco, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.	Micelio aéreo blanco a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.	Micelio aéreo blanco a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.	Colonia flocosa, micelio blanco. Reverso incoloro a púrpura.

## 5.2. Determinación de la población y tipo de apareamiento de las especies de *F. verticillioides* aisladas de diferentes híbridos de maíz

### 5.2.1. Cepas

Se eligieron 60 cepas de *F. verticillioides* aisladas de los diferentes híbridos de maíz para la determinación de la población y tipo de apareamiento. Dichas cepas se utilizaron como

parentales masculinas, mientras que como cepas parentales femeninas se utilizaron las siguientes: M-0999 (*MATA-2*) y M-0149 (*MATA-1*); M-6992 (*MATD-2*) y M-6993 (*MATD-1*); M-3693 (*MATE-2*) y M-3696 (*MATE-1*); M-6561 (*MATF-2*) y M-6562 (*MATF-1*); M-2370 (*MATG-2*) y M-1564 (*MATG-1*).

Las cepas parentales testigos fueron gentilmente cedidas por la Dra. Sofia N. Chulze, del Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

### **5.2.2. Cruzamientos sexuales**

Se realizaron los cruzamientos sexuales siguiendo la metodología propuesta por Klittich y Leslie (1988). Para iniciar los cruzamientos, la cepa femenina obtenida por aislamiento monospórico, se inoculó en agar zanahoria, mientras que la cepa masculina se inoculó simultáneamente sobre AHC. Luego de 7 días, los conidios de la cepa masculina se resuspendieron en 2 mL de una solución de Tween 20 al 2.5% y 1 mL de dicha suspensión se distribuyó sobre la cepa parental femenina con una espátula de vidrio. Las placas se incubaron durante 4 semanas a 24°C, bajo ciclos de 12h / 12h de luz blanca y luz negra. Un cruzamiento se consideró positivo cuando en tres repeticiones se obtuvieron formación de peritecios con ascos y ascosporas, y liberación de las ascosporas a través de un cirro.

### **5.3. Evaluación de la capacidad productiva de fumonisinas de las cepas de *F. verticillioides* aisladas y caracterizadas**

#### **5.3.1. Cepas**

Se evaluó la capacidad toxicogénica de 60 cepas de *F. verticillioides* elegidas al azar, aisladas según lo descrito en el punto 5.1.2.

Para evaluar la capacidad de las cepas de *F. verticillioides* para producir FBs se colocaron 100 g de maíz amarillo en frascos Erlenmeyer de 250 mL, se hidrataron con 35 mL de agua

destilada y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 minutos (dos días consecutivos). Posteriormente se inoculó el maíz con 1 mL de una suspensión de conidios en agua destilada estéril ( $1 \times 10^7$  esporas mL<sup>-1</sup>) de la cepa en estudio, desarrollada previamente durante 7 días en el medio de cultivo AHC. Las muestras se incubaron a 25°C durante 28 días en oscuridad. Luego del período de incubación las muestras se secaron a 60°C durante 48 horas, se molieron y se almacenaron a 4°C hasta el análisis por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### 5.3.2. Extracción y cuantificación de fumonisinas

A partir de 15 g de cada muestra de maíz inoculadas con *F. verticillioides*, se le adicionó 50 mL de acetonitrilo – agua (1:1, v v<sup>-1</sup>) para la extracción de FBs. Se agitó el extracto 30 minutos en un agitador rotatorio y luego se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4. Los extractos se guardaron a 4°C hasta el momento del análisis por HPLC.

Para la detección y cuantificación de las FBs se siguió la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) modificada por Doko *et al.* (1995). Una alícuota de 50 µL de cada extracto se derivatizó adicionándole 200 µL de una solución de O-ptaldialdehído (OPA). La solución derivatizante se preparó disolviendo 40 mg de OPA en 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de Na 0,1M y 50 µL de 2-mercaptoetanol. Las FBs derivatizadas (20 µL de la solución) se analizaron usando un sistema de detección de fluorescencia/HPLC fase reversa. El sistema HPLC consiste de una bomba Hewlett Packard 1100, conectado a un detector de fluorescencia Hewlett Packard 1100 y a una computadora Hewlett Packard (ChemStation Rev. A.10.01). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa de C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm, 5µm de tamaño de partícula; Supelcosil LC-ABZ, Supelco) conectada a una precolumna (C<sub>18</sub>, 20 x 4.6 mm, 5µm de tamaño de partícula, Phenomenex® SecurityGuard). Como fase móvil se usó metanol - fosfato de sodio dihidrogenado 0.1M (3:1, v v<sup>-1</sup>), el pH de la solución se ajustó a 3.35 con ácido ortofosfórico. El flujo de la fase móvil fue de 1.5 mL min<sup>-1</sup>. El rango de excitación y emisión usados fueron 335 y 440 nm, respectivamente.

Las soluciones testigos fueron preparadas disolviendo FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> puras adquiridas de SIGMA en acetonitrilo:agua (1:1, v v<sup>-1</sup>) en concentraciones de 2.5, 5 y 10 µg mL<sup>-1</sup> de FB<sub>1</sub> y 1.25, 2.5 y 5 µg mL<sup>-1</sup> para FB<sub>2</sub>. El límite de detección de la técnica fue de 1 µg g<sup>-1</sup> y el porcentaje de recuperación de dichas toxinas del 85%. La cuantificación de las FBs se basó en las alturas de los picos comparados con la altura de los picos de las soluciones testigos de referencia de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>. Los tiempos de retención típicos para dichas FBs fueron 3.1 y 6.6 minutos respectivamente.

### **5.3.3. Análisis estadístico**

Se usó el programa estadístico Sigma Stat Versión 2.03 para Windows para el análisis de los datos. Se aplicó el test de Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias significativas entre las medias de la concentración de fumonisinas producidas por las cepas de *F. verticillioides* aisladas de los diferentes híbridos de maíz. Dichos datos de producción de FBs se transformaron en *raíz cuadrada* (Sqrt) a fin de pasar la prueba de normalidad (Anexo 2).

### **5.4. Análisis de las condiciones climáticas registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003**

Se obtuvieron los registros de los archivos de la estación meteorológica (Base Aérea Militar No. 5) cercana a la localidad estudiada y se analizaron los valores registrados de temperaturas máximas, mínimas y promedio; así como la precipitación pluvial y humedad relativa de mayo a diciembre de 2003. Los datos se organizaron y se presentan en tablas.

### **5.5. Valoración del efecto del antioxidante BHA y de los extractos de alcaloides de *L. exaltatus* sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y la producción de fumonisinas (FBs)**

#### **5.5.1. Efecto del antioxidante BHA**

Se utilizó una cepa de *F. verticillioides* (UDG 271) productora de altos niveles de FBs aislada según el punto 5.1.2.

### 5.5.1.1. Inoculación y condiciones de cultivos

Se utilizó el medio de cultivo Agar Harina de Maíz (AHM) para evaluar la capacidad fungicida del antioxidante BHA. La  $a_w$  (actividad de agua) del medio de cultivo se ajustó a 0.995, 0.97 y 0.955 por la adición de una concentración adecuada de glicerol previo a la esterilización del mismo (Dallyn, 1978).

El antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) se preparó en una solución de etanol al 95%, la cual se agregó al medio del cultivo por el método de placa vertida. Se evaluaron cinco concentraciones del antioxidante (0, 0.5, 1.0, 10 y 20 mmol L<sup>-1</sup>) y un control de etanol al 95% (cuatro repeticiones por tratamiento).

Una vez preparado el medio de cultivo las placas se conservaron a 4°C durante 48 h a fin de permitir que alcancen el equilibrio deseado. La  $a_w$  de los diferentes medios de cultivo fue confirmada con el Aqualab Series 3 (Labcell, Basigstoke) una vez que el mismo solidificó

Las placas de AHM se inocularon centralmente con un disco de micelio de 8 mm de la cepa *F. verticillioides* ensayada, tomado del margen de un cultivo de 7 días de la cepa crecida en el medio AHC y se incubaron a 25°C en la oscuridad. Las placas con la misma  $a_w$  se colocaron en bolsas plásticas a fin de mantener una Humedad Relativa (HR) constante dentro de los mismos a lo largo del período de incubación.

La velocidad de crecimiento radial se determinó midiendo el diámetro de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo, diariamente en 2 direcciones hasta que la misma llegó a las márgenes de la placa, aproximadamente 15 días. Los radios de las colonias desarrolladas en el medio AHM en cada tratamiento fueron graficados versus el tiempo, y la fase lag (h) y la velocidad de crecimiento micelial se determinó por regresión lineal utilizando el programa Microsoft Office Excel (2003) para cada una de las repeticiones (Marín *et al.*, 1996). Al final del período de incubación (28 días) se analizó el contenido de FBs en todos los tratamientos

evaluados según la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) modificada por Doko *et al.* (1995), tal cual se describe en el punto 5.3.2.

#### **5.5.1.2. Análisis estadístico**

Para analizar los datos del efecto del antioxidante BHA sobre la fase lag, velocidad de crecimiento e inhibición de la producción de FBs de la cepa de *F. verticillioides* UDG 271 a distintos niveles de  $a_w$  se usó el programa estadístico Sigma Stat Versión 2.03 para Windows. En todos los casos se realizó el test de Tukey a fin de determinar las diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos evaluados.

#### **5.5.2. Efecto del extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus***

##### **5.5.2.1. Extracción de los alcaloides de *L. exaltatus***

Se obtuvo harina a partir de las semillas de *L. exaltatus* en un molino Ciclotec y se degradaron con hexano (1:2 w v<sup>-1</sup>) durante 36 h a una temperatura de 4°C, luego se secó durante 24 h a temperatura ambiente. La extracción del alcaloide se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Wink (1993), 10 g de muestra de harina se homogeneizó en 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) en licuadora durante 5 min y se centrifugó a 6,000 rpm (10 min.). Se tomaron 25 mL del sobrenadante y se decantó con una solución NaOH 6 N y diclorometano (3 veces). Los extractos una vez obtenidos se concentraron en un rotaevaporador a 40°C.

##### **5.5.2.2. Inoculación y condiciones de cultivos**

El extracto de *Lupinus* se disolvió en agua y se agregó al medio del cultivo por el método de placa vertida antes de su esterilización. Se evaluaron cinco concentraciones del extracto 0, 1.0, 5.0, 10 y 20 mg mL<sup>-1</sup> (Tabla 6). Al final del período de incubación (28 días) se analizó el contenido de FBs en todos los tratamientos evaluados.

A partir de cada uno de los tratamientos con el extracto de los alcaloides de *L. exaltatus*, las FBs se extrajeron y cuantificaron según la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) modificada por Doko *et al.* (1995).

Tabla 6. Tratamientos utilizados para la valoración del efecto fungicida de los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* y del antioxidante BHA sobre una cepa de *F. verticillioides* productora de altos niveles de fumonisinas.

Tratamiento	$a_w$	Extracto de <i>L. exaltatus</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	Tratamiento	$a_w$	BHA (mmol L <sup>-1</sup> )
1	0.995	0	16	0.995	0
2		0.5	17		0.5
3		1.0	18		1.0
4		10	19		5.0
5		20	20		10.0
6	0.97	0	21	0.97	0
7		0.5	22		0.5
8		1.0	23		1.0
9		10	24		5.0
10		20	25		10.0
11	0.955	0	26	0.955	0
12		0.5	27		0.5
13		1.0	28		1.0
14		10	29		5.0
15		20	30		10.0

### 5.5.2.3. Análisis estadístico

Para analizar los datos del efecto del alcaloide de *L. exaltatus* sobre la fase lag, velocidad de crecimiento e inhibición de la producción de FBs de la cepa de *F. verticillioides* UDG 271 a distintos niveles de  $a_w$  se usó el programa estadístico Sigma Stat Versión 2.03 para Windows. En todos los casos se realizó el test de Tukey a fin de determinar diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos evaluados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* a partir de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco

La evaluación del grado de contaminación con especies de *Fusarium*, de las muestras de los siete híbridos de maíz cosechados en la localidad estudiada (Centro de Producción de Semillas del CUCBA), mostró un porcentaje de infección promedio en el medio Nash-Snyder del 52% (rango 39 – 63%) considerando granos dañados y asintomáticos (Tabla 7, Figura 6).



Figura 6. Contaminación de granos de maíz con especies de *Fusarium* en el medio Nash – Snyder.

Los híbridos evaluados, Lucero 901 y Alsa 036W, mostraron una mayor contaminación con especies de *Fusarium* (ambas 63%), mientras que el híbrido UDG-600 mostró el menor porcentaje de infección (39%).

Tabla 7. Incidencia de *Fusarium* (Sección *Liseola*) en muestras de diferentes híbridos cosechados en una localidad del estado de Jalisco.

Híbrido	Infección con		Distribución de las especies <sup>a</sup>		
	<i>Fusarium</i> spp. (%) <sup>a</sup> (número) <sup>b</sup>	<i>F. verticillioides</i> (%) <sup>a</sup> (número) <sup>b</sup>	<i>F. subglutinans</i> (%) <sup>a</sup> (número) <sup>b</sup>	<i>F. proliferatum</i> (%) <sup>a</sup> (número) <sup>b</sup>	Otros <sup>b</sup> (%) <sup>a</sup> (número) <sup>b,c</sup>
Lince	60 (45)	80 (36)	13 (6)	2 (1)	5 (2)
UDG 600	39 (40)	68 (27)	23 (9)	2 (1)	7 (3)
Alsa 036W	63 (43)	65 (28)	16 (7)	14 (6)	5 (2)
Lucero 801	60 (54)	74 (40)	15 (8)	11 (6)	-
Lucero 807	40 (27)	63 (17)	22 (6)	11(3)	4 (1)
Lucero 808	42 (32)	44 (14)	37 (12)	16 (5)	3 (1)
Lucero 901	63 (68)	59 (40)	26 (18)	9 (6)	6 (4)
Total de cepas	309	202	66	28	13

<sup>a</sup> Los datos son expresados en porcentaje, son la media de 4 submuestras evaluadas.

<sup>b</sup> Número total de cepas aisladas

<sup>c</sup> Especies de *Fusarium* no pertenecientes a la sección *Liseola*, incluyen *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. semitectum*.

La identificación de las especies de *Fusarium* se realizó mediante la observación microscópica de los cultivos desarrollados en AHC a 10X y 40X, y de las características macroscópicas (culturales) en el medio APG (Figura 7).

La tabla 8 muestra las características morfológicas y culturales de las cepas de *Fusarium* aisladas de diferentes híbridos de maíz. La evaluación de las colonias en APG de la mayoría de las cepas aisladas mostró un micelio aéreo blanco a naranja pálido, lavanda a púrpura, reverso incoloro a naranja pálido, marrón a púrpura.

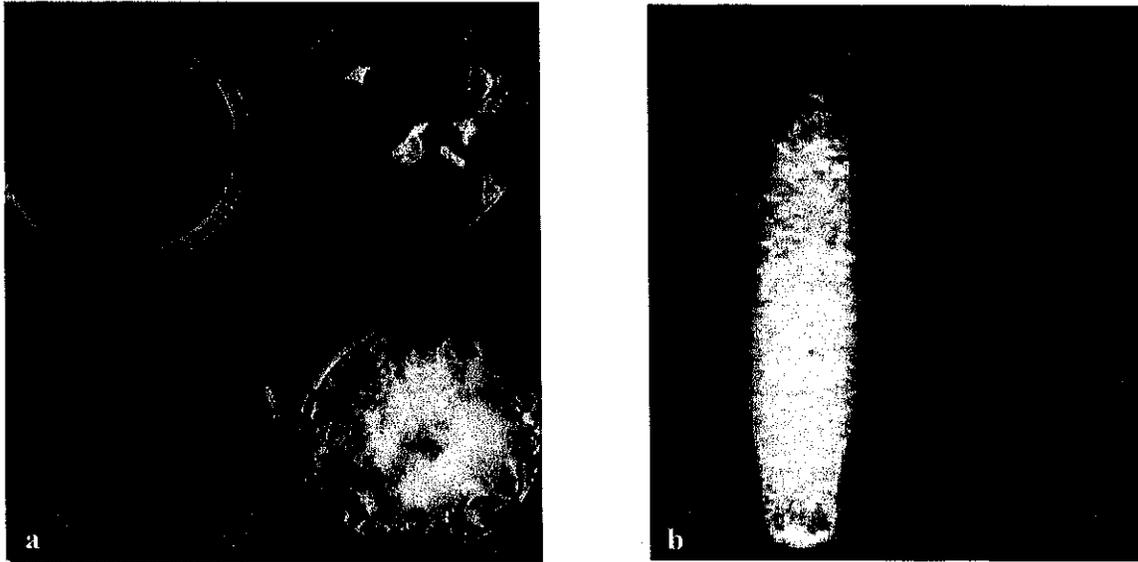


Figura 7. Crecimiento de especies de *Fusarium* en el medio a) Agar Hojas de Clavel (AHC) y b) Agar Papa Glucosado (APG).

La observación microscópica (10X) de las colonias demostró que un 74% (230 cepas) de las mismas presentaban microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas de microconidios, mientras que el 21% (66 cepas) de los cultivos presentaron sólo falsas cabezas de microconidios. Las características microscópicas (40X) se observaron en preparados en fresco y revelaron la presencia de un micelio hialino, septado, microconidios unicelulares, ovales a ovoides con base truncada, macroconidios en forma de hoz a rectos, con la superficie dorsal y ventral casi paralelas y de paredes finas, y múltiples conidióforos ramificados y no ramificados. Del total de cepas que presentaban microconidios dispuestos en falsas cabezas y cadenas de microconidios, el 65% (202 cepas) de ellas presentaron sólo monofiálides, mientras que el 9% (28 cepas) restante presentaron monofiálides y polifiálides. De acuerdo con éstas características dichas cepas se clasificaron como *F. verticillioides* (Figura 8) y *F. proliferatum* (Figura 9) pertenecientes a la sección *Liseola*, respectivamente, según la clave taxonómica propuesta por Nelson *et al.* (1983).

Tabla 8. Caracterización morfológica y cultural de las cepas de *Fusarium* aisladas de diferentes híbridos de maíz.

Especie	AHC (10X)		AHC (40X)			APG
	falsas cabezas de microconidios	Cadenas de microconidios	monofiálides	polifiálides	clamidosporas	Color de la colonia
<i>F. verticillioides</i>	+	+	+	-	-	Micelio aéreo blanco a naranja pálido, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a naranja pálido, marrón a púrpura.
<i>F. proliferatum</i>	+	+	+	+	-	Micelio aéreo blanco, lavanda a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.
<i>F. subglutinans</i>	+	-	+	+	-	Micelio aéreo blanco a púrpura. Reverso incoloro a púrpura.

Con respecto a aquellas cepas que sólo presentaban falsas cabezas de microconidios pero que no formaron cadenas de microconidios en AHC, la observación microscópica en 40X reveló la presencia de monofiálides y polifiálides, además de las otras características descritas para las otras dos especies, por lo que, se las clasificó como *F. subglutinans* de acuerdo a Nelson *et al.* (1983) (Figura 10).

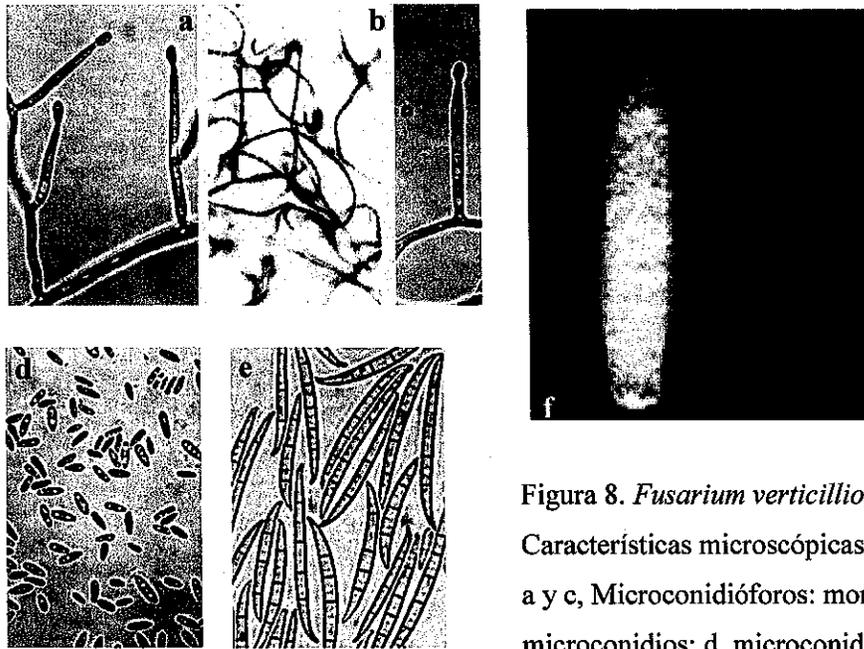


Figura 8. *Fusarium verticillioides*. (a-e)

Características microscópicas (10X y 40X) en AHC:  
a y c, Microconidióforos: monofiálides; b, cadenas de  
microconidios; d, microconidios; e, macroconidios,  
f, Características macroscópicas en APG.

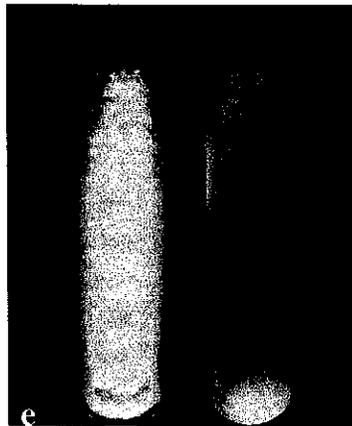
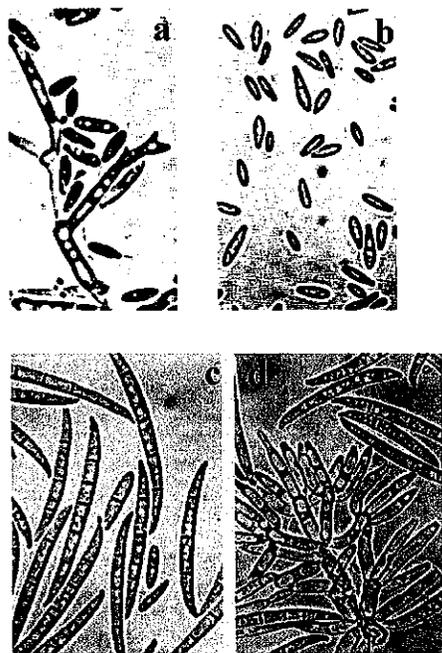


Figura 9. *Fusarium proliferatum*. (a-d)  
 Características microscópicas (10X y 40X) en AHC:  
 a, Microconidióforos: polifiálides; b, microconidios;  
 c, macroconidios; d, microconidióforos: monofiálides;  
 e, Características macroscópicas en APG.

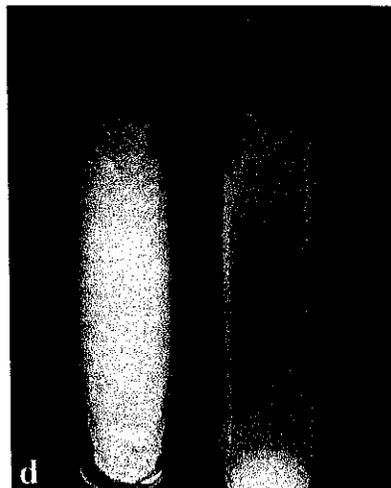
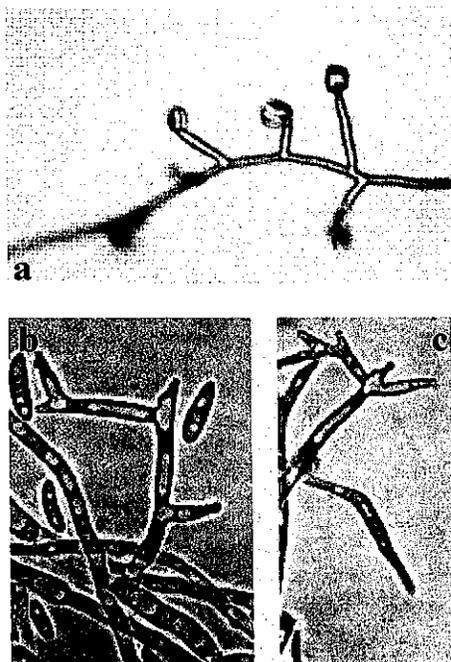


Figura 10. *Fusarium subglutinans*. (a-c)  
 Características microscópicas (10X y 40X) en AHC:  
 a, Falsas cabezas de microconidios;  
 b y c, Microconidióforos: polifiálides;  
 d, Características macroscópicas en APG.

*F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, fue la especie predominante en todos los híbridos evaluados con un porcentaje promedio del 65% (rango 44 – 80%), seguida por *F. subglutinans* (Wallenweber and Reinking) Nelson, Tousson and Marasas (13 – 37%) y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (2 – 16%) (Tabla 7).

Cabe señalar que también se aislaron otras especies de *Fusarium* no pertenecientes a la sección *Liseola* (5%), que por sus características morfológicas se clasificaron principalmente como *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. semitectum*.

La correcta identificación de las especies que forman parte del complejo *G. fujikuroi* es esencial para muchos análisis. Dentro del género *Fusarium* han sido aplicados conceptos de especie desde el punto de vista morfológico, biológico y filogenético. Los esquemas de clasificación corrientes están basados exclusivamente en el concepto morfológico de especie, derivados de características tanto culturales de aislados monospóricos desarrollados en medios de cultivo especiales, como de características morfológicas distintivas, sin embargo, la naturaleza subjetiva de este concepto genera conflictos en los sistemas taxonómicos de este género. Por lo tanto, en el presente estudio, se consideró importante profundizar los estudios de las cepas de *F. verticillioides* aisladas de los diferentes híbridos de maíz, a través de la caracterización sexual de las mismas, considerando que el género *Fusarium*, desde el punto de vista taxonómico es controversial, y que aún, los taxónomos discuten en cuanto al número de especies dentro de la Sección *Liseola* y sobre los criterios morfológicos usados para distinguirlas. Por otro lado, se ha demostrado que la caracterización de las especies de *Fusarium* a nivel de especie biológica dentro del complejo *G. fujikuroi* delimitaría a las especies en base al aislamiento reproductivo (Reynoso *et al.*, 2006).

## 6.2. Determinación de la población y tipo de apareamiento de las especies de *F. verticillioides* aisladas de diferentes híbridos de maíz

Del total de cepas aisladas a partir de 7 híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco, y previamente caracterizadas morfológicamente, se eligieron al azar 60 cepas de *F. verticillioides* para determinarles la población y tipo de apareamiento (Tabla 9; Figura 11).

Todas las cepas evaluadas produjeron peritecios fértiles con las cepas parentales testigos de la población de apareamiento A, detectándose un solo tipo de apareamiento, *MATA-2*.

Los resultados obtenidos indican que todas las cepas de *F. verticillioides* evaluadas pertenecen a la población de apareamiento A y por lo tanto, pueden ser clasificadas como *Gibberella moniliformis* (estado sexual o teleomorfo) dentro del complejo de *Gibberella fujikuroi*.

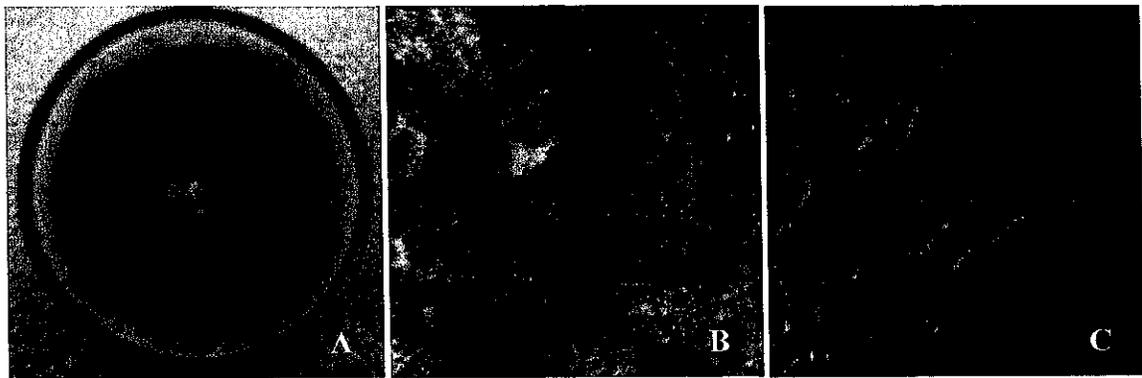


Figura 11 A). Formación de peritecios en el medio Agar Zanahoria 4X. B) Peritecios fértiles con cirros, resultantes del cruzamiento de las cepas A-0149 (*MATA-1*) x A-0999 (*MATA-2*) (20X); C) Ascospores y ascosporas (40X).

### 6.3. Evaluación de la capacidad productora de fumonisinas de las cepas de *F. verticillioides* aisladas

Las 60 cepas de *F. verticillioides* (= *G. moniliformis*) previamente caracterizadas de acuerdo a sus características morfológicas y población de apareamiento, fueron evaluadas para determinarles su capacidad de producir fumonisinas (Tabla 9).

Las 60 cepas de *F. verticillioides* (= *G. moniliformis*) elegidas al azar, fueron capaces de producir FBs en niveles que variaron entre 107.5 y 7,190  $\mu\text{g g}^{-1}$  (media= 1,744.2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Todas las cepas ensayadas produjeron FB<sub>1</sub>, mientras que solo una no produjo FB<sub>2</sub>.

Fumonisina B<sub>1</sub> representó el 75% de las FBs totales. Los niveles de FB<sub>1</sub>, variaron entre 59.3 y 4,861  $\mu\text{g g}^{-1}$  (media = 1,309.7  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), mientras que los de FB<sub>2</sub> variaron entre 22.8 y 2,328.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (media = 441.9  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Tabla 9).

Las cepas de *F. verticillioides* que produjeron los más altos niveles de FBs fueron las cepas UDG 330 (7,190  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y UDG 271 (4,955.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), aisladas de los híbridos Lucero 807 y Alsa 036W, respectivamente. La cepa UDG 271 se utilizó para los ensayos de valoración del efecto fungicida del extracto de *Lupinus* y del antioxidante BHA.

Tabla 9. Caracterización de las cepas de *F. verticillioides*, población de apareamiento A, aisladas de maíz. Población y tipo de apareamiento y producción de fumonisinas.

Híbrido	Cepa		Concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			MT
			FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB totales	
UDG 600	UDG 163	<i>F. verticillioides</i>	1261.5	385.2	1646.7	MATA-2
	UDG 169	<i>F. verticillioides</i>	1005.6	nd	1005.6	MATA-2
LUCERO 901	UDG 193	<i>F. verticillioides</i>	845.5	272	1117.5	MATA-2
	UDG 200	<i>F. verticillioides</i>	153.6	22.8	176.4	MATA-2
	UDG 209	<i>F. verticillioides</i>	744	152	896	MATA-2
	UDG 211	<i>F. verticillioides</i>	520.8	140.1	660.9	MATA-2
	UDG 299	<i>F. verticillioides</i>	1135	395	1530	MATA-2
	UDG 313	<i>F. verticillioides</i>	573.5	160.5	734	MATA-2
	UDG 320	<i>F. verticillioides</i>	1478.5	793	2271.5	MATA-2
	UDG 323	<i>F. verticillioides</i>	2539	1206	3745	MATA-2
	UDG 324	<i>F. verticillioides</i>	2120	390	2510	MATA-2
	UDG 326	<i>F. verticillioides</i>	1276	186	1462	MATA-2
	UDG 327	<i>F. verticillioides</i>	1200	436	1636	MATA-2
	UDG 329	<i>F. verticillioides</i>	1134.4	91.6	1226	MATA-2
LUCERO 808	UDG 351	<i>F. verticillioides</i>	450.3	136.9	587.2	MATA-2
	UDG 355	<i>F. verticillioides</i>	890.5	365	1255.5	MATA-2
	UDG 356	<i>F. verticillioides</i>	2332	893	3225	MATA-2
	UDG 357	<i>F. verticillioides</i>	850	345	1195	MATA-2
	UDG 359	<i>F. verticillioides</i>	387.5	134	521.5	MATA-2
	UDG 360	<i>F. verticillioides</i>	1187.5	825.5	2013	MATA-2
	UDG 361	<i>F. verticillioides</i>	1848	120.5	1968.5	MATA-2
	UDG 362	<i>F. verticillioides</i>	388	121.5	509.5	MATA-2
LUCERO 807	UDG 330	<i>F. verticillioides</i>	4861.5	2328.5	7190	MATA-2
	UDG 331	<i>F. verticillioides</i>	1358	456.5	1814.5	MATA-2
	UDG 332	<i>F. verticillioides</i>	1048.5	373.5	1422	MATA-2
	UDG 335	<i>F. verticillioides</i>	1289	575	1864	MATA-2
	UDG 337	<i>F. verticillioides</i>	1545	1378	2923	MATA-2

LUCERO 801	UDG 220	<i>F. verticillioides</i>	395.5	105	500.5	MATA-2
	UDG 221	<i>F. verticillioides</i>	792.7	82	874.7	MATA-2
	UDG 224	<i>F. verticillioides</i>	1140	575	1715	MATA-2
	UDG 227	<i>F. verticillioides</i>	1453	345	1798	MATA-2
	UDG 230	<i>F. verticillioides</i>	1657	277.5	1934.5	MATA-2
	UDG 231	<i>F. verticillioides</i>	1280.5	605	1885.5	MATA-2
	UDG 241	<i>F. verticillioides</i>	1156	38.5	1194.5	MATA-2
	UDG 245	<i>F. verticillioides</i>	453.1	67.8	520.9	MATA-2
	UDG 248	<i>F. verticillioides</i>	862	213	1075	MATA-2
UDG 249	<i>F. verticillioides</i>	420.9	46.9	467.8	MATA-2	
ALSA 036W	UDG 250	<i>F. verticillioides</i>	966.5	290.5	1257	MATA-2
	UDG 257	<i>F. verticillioides</i>	1327	460	1787	MATA-2
	UDG 263	<i>F. verticillioides</i>	2275.5	815.5	3091	MATA-2
	UDG 267	<i>F. verticillioides</i>	3679	1089	4768	MATA-2
	UDG 271	<i>F. verticillioides</i>	3997	958.5	4955.5	MATA-2
	UDG 278	<i>F. verticillioides</i>	2661.5	1090.5	3752	MATA-2
	UDG 282	<i>F. verticillioides</i>	2175	1062	3237	MATA-2
	UDG 283	<i>F. verticillioides</i>	760.5	156	916.5	MATA-2
	UDG 285	<i>F. verticillioides</i>	542.3	135.3	677.6	MATA-2
	UDG 287	<i>F. verticillioides</i>	59.3	48.2	107.5	MATA-2
UDG 288	<i>F. verticillioides</i>	1616.2	426.7	2042.9	MATA-2	
LINCE	UDG 370	<i>F. verticillioides</i>	957	319	1276	MATA-2
	UDG 371	<i>F. verticillioides</i>	1672.5	415.5	2088	MATA-2
	UDG 373	<i>F. verticillioides</i>	1256	176.7	1432.7	MATA-2
	UDG 379	<i>F. verticillioides</i>	3771	1534	5305	MATA-2
	UDG 390	<i>F. verticillioides</i>	2583.5	916.5	3500	MATA-2
	UDG 392	<i>F. verticillioides</i>	325.3	88.5	413.8	MATA-2
	UDG 394	<i>F. verticillioides</i>	658.5	196	854.5	MATA-2
	UDG 395	<i>F. verticillioides</i>	428	96.5	524.5	MATA-2
	UDG 397	<i>F. verticillioides</i>	219.2	42.2	261.4	MATA-2
	UDG 405	<i>F. verticillioides</i>	509.8	188.9	698.7	MATA-2
UDG 406	<i>F. verticillioides</i>	1261.4	288.8	1550.2	MATA-2	
UDG 408	<i>F. verticillioides</i>	844	240.5	1084.5	MATA-2	

nd: No detectado; Límite de detección de FBs:  $< 1 \mu\text{g g}^{-1}$ ; MT: población y tipo de apareamiento.

Las cepas de *F. verticillioides* productoras de FBs ensayadas se distribuyeron en 3 grupos: productoras de niveles bajos ( $< 500 \mu\text{g g}^{-1}$ ) donde se ubicaron el 12% de las cepas; productoras de niveles intermedios ( $500 - 2000 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y productoras de niveles altos ( $> 2000 \mu\text{g g}^{-1}$ ) donde se ubicaron el 65% y el 23% de las cepas, respectivamente (Figura 12).

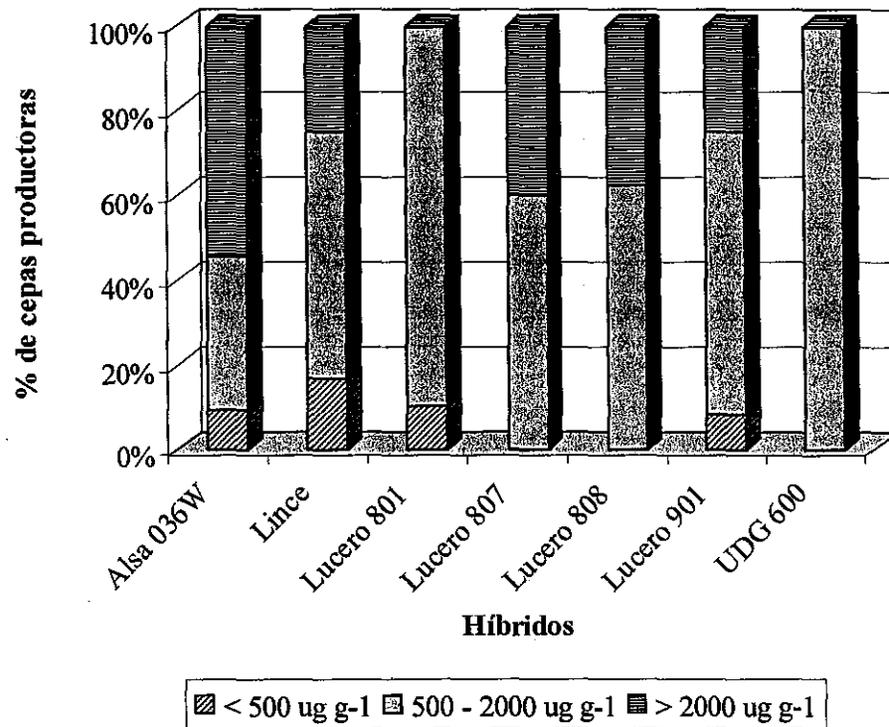


Figura 12. Producción de FBs por cepas de *Fusarium verticillioides*, población de apareamiento A (n= 60) aisladas de diferentes híbridos de maíz. Límite de detección para FBs:  $< 1 \mu\text{g g}^{-1}$ .

En general, las cepas aisladas del híbrido Lucero 807 produjeron los más altos niveles de FBs (media=  $3,042.7 \mu\text{g g}^{-1}$ ) aunque no se observaron diferencias significativas entre la producción de dicha toxina y los híbridos a partir de los cuales se aislaron las cepas de *F. verticillioides* ( $P=<0.050$ ) (Anexo 2).

## 6.4. Análisis de las condiciones climáticas registradas durante el cultivo de maíz correspondiente al ciclo primavera-verano 2003

### 6.4.1. Temperatura

La tabla 10 muestra las temperaturas registradas por la estación meteorológica Tipo "B" adscrita a la Base Aérea Militar No. 5 de Zapopan, Jalisco, cercana a las parcelas experimentales del CUCBA, se incluyen los promedios de las máximas y mínimas y el promedio global.

Las temperaturas promedio durante el periodo considerado tuvieron una oscilación normal, observándose los máximos durante los meses de primavera, 25 y 23°C en mayo y junio respectivamente y los mínimos se observaron en invierno siendo de 15°C durante el mes de diciembre.

Tabla 10. Temperaturas máximas, promedio y mínimas registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera – verano de 2003

	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Máximas	26.3	26.1	26.3	26.5	25.6	26.6	25.7	23.0
Normal*	33.4	30.8	27.6	27.4	27.4	27.5	26.3	24.9
Promedio	25.0	23.0	21.0	21.0	21.0	20.0	19.0	15.0
Normal*	23.9	23.4	21.5	21.4	21.5	20.6	18.4	17.0
Mínimas	15.0	17.0	16.0	16.0	17.0	15.0	11.0	5.0
Normal*	14.5	16.0	15.5	15.5	15.7	13.8	10.5	9.1

\* valores obtenidos a partir del registro de 40 años

### 6.4.2. Precipitación pluvial

El análisis de la precipitación pluvial se presenta en la tabla 11, reportándose los niveles máximos, mínimos y totales durante los meses de mayo a diciembre. Las precipitaciones se comportaron por abajo de la normal en los meses de mayo, agosto, octubre y diciembre, y por arriba de la normal en los meses de junio, julio, septiembre y noviembre dando como resultado una diferencia de 243 mm de precipitación por arriba de la normal.

Tabla 11. Precipitación pluvial (mm) registradas en el área de estudio durante el cultivo primavera –verano de 2003

Mm	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Máxima	1	55	60	43.2	51	26.3	16.3	0
Mínima	INAP	INAP	INAP	INAP	INAP	INAP	0	0
Precipitación Total	1	252	393	185	285	38	16	0
Normal*	28	174	255	222	151	64	15	18

\* valores obtenidos a partir del registro de 40 años. INAP: inapreciable en la escala

### 6.4.3. Humedad relativa

El registro de la Humedad Relativa (HR) reportada por la estación meteorológica se presenta en la tabla 12. La HR máxima durante el periodo considerado muestra que durante los meses de primavera y verano se presentó como humedad máxima 100%. A partir del mes de octubre se presentó ligera disminución del valor de este elemento climatológico.

Respecto a la HR mínima registrada, revela que la estación seca terminó en el mes de mayo, siendo la estación húmeda del mes de junio hasta del mes de octubre, donde osciló entre los 18 a 46%.

La humedad relativa promedio muestra un comportamiento análogo a la HR mínima, siendo los meses de junio a octubre los que presentan la mayor cantidad de humedad en el ambiente.

Tabla 12. Humedad relativa (%) registrada en el área de estudio durante el cultivo primavera – verano de 2003

	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Máximas	92	100	100	100	100	94	92	84
Normal*	92	98	98	96	99	98	98	96
Promedio	37	64	74	77	81	70	61	47
Normal*	53	64	67	71	68	66	56	65
Mínimas	6	18	16	39	46	45	34	22
Normal*	24	36	44	42	40	40	29	31

\* valores obtenidos a partir del registro de 40 años

En términos generales, la humedad observada en el periodo comprendido de junio a octubre se mantuvo por encima de la normal, por lo que se consideran los meses de mayor humedad y los meses de noviembre y diciembre los más secos.

## 6.5. Valoración del antioxidante BHA y de los extractos de alcaloides de *L. exaltatus* sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y la producción de fumonisinas (FBs)

### 6.5.1. Efecto del antioxidante BHA

En la figura 13 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos con el antioxidante BHA sobre la velocidad de crecimiento ( $\text{mm d}^{-1}$ ) de la cepa *F. verticillioides* UDG 271 a distintos niveles de  $a_w$ . Dicho parámetro decreció a medida que disminuyó la  $a_w$  en todos los tratamientos evaluados.

El incremento en la dosis de BHA de 0.5 a 1.0  $\text{mmol L}^{-1}$  aumentó la fase lag de 33 a 57 h a una  $a_w=0.995$ , y de 28 a 89 h a una  $a_w=0.955$ . No se observó crecimiento durante los 28 días de incubación en las concentraciones más altas de BHA (5 y 10  $\text{mmol L}^{-1}$ ) (Tabla 13).

En el tratamiento control y con alcohol etílico (EtOH al 95%), *F. verticillioides* mostró similar velocidad de crecimiento, de 12.1, 7.7 y 5.3 mm d<sup>-1</sup> y 11.8, 7.5 y 5.1 mm d<sup>-1</sup> respectivamente a niveles de  $a_w$  de 0.995, 0.97 y 0.955. En las concentraciones de 0.5 y 1.0 mmol L<sup>-1</sup>, la velocidad de crecimiento disminuyó marcadamente en todas las  $a_w$  evaluadas cuando se las compara con el tratamiento control.

El efecto del antioxidante BHA a diferentes  $a_w$  a 25° C sobre la inhibición de la producción de FBs por la cepa *F. verticillioides* UDG 271 se muestra en la tabla 14. El nivel de  $a_w$  óptimo para la producción de FBs fue 0.995, mientras que a niveles de 0.97 y 0.955 la producción de dicha micotoxina disminuyó un 60 y 80%, respectivamente.

Tabla 13. Efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la velocidad de crecimiento y la fase lag de *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivado en agar harina de maíz a 25°C.

Tratamiento	Concentración (mmol L <sup>-1</sup> )	Velocidad de crecimiento (mm d <sup>-1</sup> )			Fase lag (h)		
		Actividad de agua ( $a_w$ )					
		0.995	0.97	0.955	0.995	0.97	0.955
Control		12.1 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
EtOH 95%		11.8 <sup>a</sup>	7.5 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
BHA	0.5	4.7 <sup>b</sup>	2.9 <sup>b</sup>	1.7 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>
BHA	1.0	2.4 <sup>c</sup>	1.7 <sup>c</sup>	0.8 <sup>c</sup>	57 <sup>c</sup>	67 <sup>c</sup>	89 <sup>c</sup>
BHA	5.0	-	-	-	-	-	-
BHA	10.0	-	-	-	-	-	-

Las medias con la misma letra en cada columna no son diferentes significativamente ( $P < 0.050$ ), prueba de Tukey.

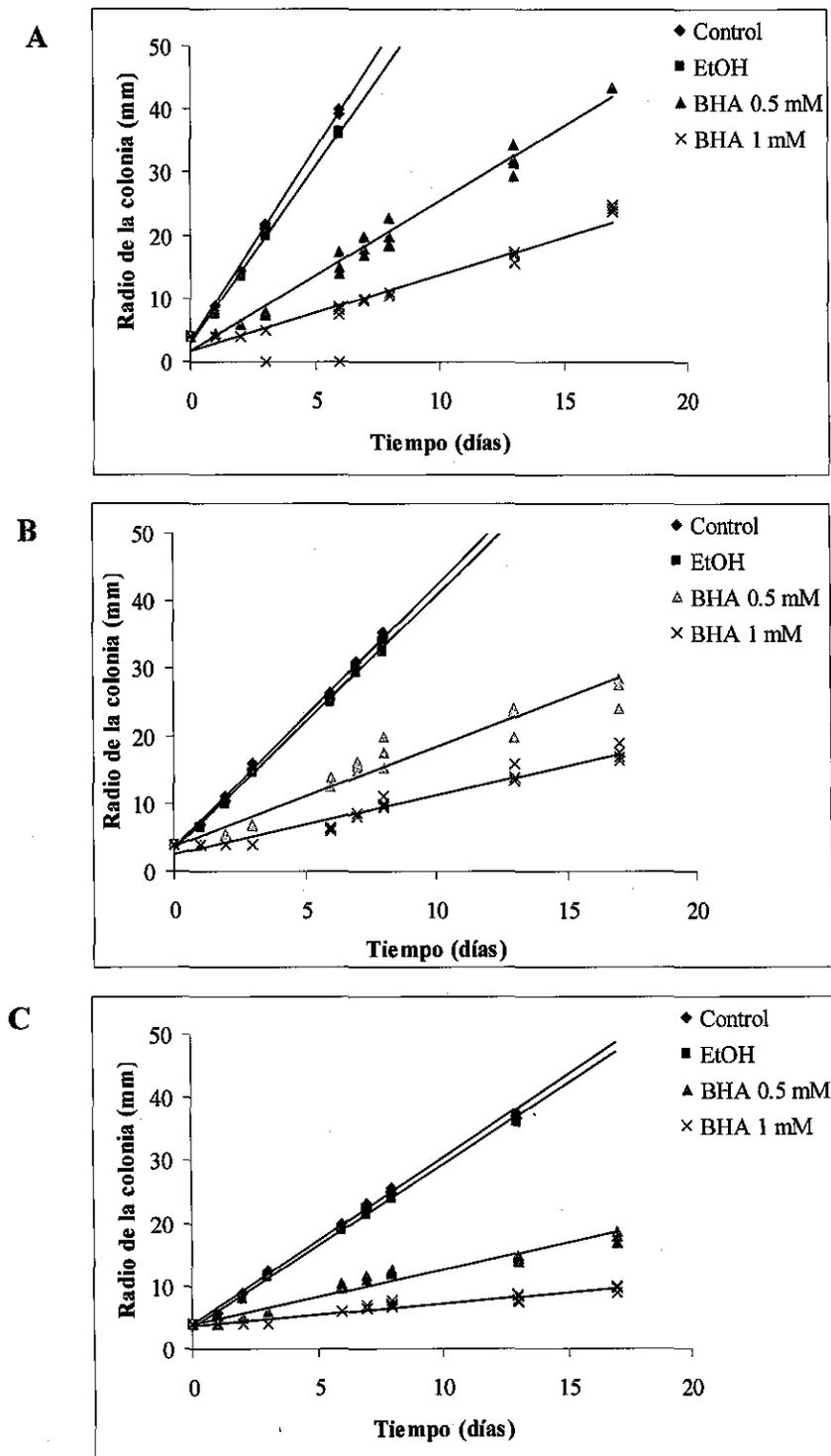


Figura 13. Efecto del antioxidante (BHA) sobre el crecimiento de *F. verticillioides* UDG 271 bajo diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) a 25°C cultivado en Agar Harina de Maíz (AHM). A: 0.995  $a_w$ ; B: 0.97  $a_w$ ; C: 0.955  $a_w$ .

Tabla 14. Efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la producción de fumonisinas por la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 sobre agar harina de maíz a 25°C.

Tratamiento	Concentración de fumonisinas totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
	Media $\pm$ S.D.		
	0.995 $a_w$	0.97 $a_w$	0.955 $a_w$
Control	29.2 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	9.7 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	5.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
EtOH 95%	29.7 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	10.6 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
BHA 0.5 mmol L <sup>-1</sup>	6.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	4.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
BHA 1 mmol L <sup>-1</sup>	5.5 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	2.2 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>
BHA 10 mmol L <sup>-1</sup>	nd	nd	nd
BHA 20 mmol L <sup>-1</sup>	nd	nd	nd

nd: no detectado. Las medias con la misma letra en cada columna no son diferentes significativamente ( $P < 0.050$ ), prueba de Tukey. S.D.: desviación estándar.

En el tratamiento control y en el que se le adicionó sólo alcohol etílico al 95% mostraron similar producción de FBs en todos los niveles de  $a_w$  evaluadas, mientras que el antioxidante BHA inhibió completamente la producción de la micotoxina en concentraciones de 10 y 20 mmol L<sup>-1</sup>, independiente de la  $a_w$ .

A una  $a_w = 0.955$  los niveles de FBs producidos por la cepa de *F. verticillioides* fueron muy bajos y variaron entre 2.2 y 5.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ . En el presente estudio en los tratamientos control y al que se le adicionó sólo alcohol etílico al 95% a 0.995 y 0.97 de  $a_w$  se produjeron FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, mientras que en los tratamientos restantes sólo se produjo FB<sub>1</sub>.

### 6.5.2. Efecto del extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus*

La tabla 15 muestra los resultados del efecto de los diferentes tratamientos con extracto de *Lupinus exaltatus* sobre la velocidad de crecimiento ( $\text{mm d}^{-1}$ ) de la cepa de *Fusarium verticillioides* UDG 271 a distintos niveles de  $a_w$  (Figura 14). Se observó disminución del crecimiento micelial del hongo conforme disminuía la  $a_w$ .

Los tratamientos control y en el que se adicionó  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  del extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus* a  $a_w = 0.995$ , mostraron una velocidad de crecimiento micelial similar estadísticamente ( $P < 0.050$ ), con valores de  $12.0 \text{ mm d}^{-1}$  y  $11.5 \text{ mm d}^{-1}$  respectivamente. A partir del tratamiento con  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  del extracto, se observó disminución significativa ( $P > 0.050$ ), directamente proporcional con los niveles del extracto evaluados.

El comportamiento de la velocidad de crecimiento de *Fusarium verticillioides* en la  $a_w$  0.97 mostró un comportamiento similar que el anterior. Todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente ( $P > 0.050$ ) a la actividad de agua ( $a_w$ ) 0.955. La figura 15 muestra las gráficas que permiten observar el comportamiento del crecimiento de *Fusarium verticillioides* con los diferentes tratamientos y en las tres actividades de agua ( $a_w$ ) evaluadas.

La fase lag incrementó significativamente en las diferentes  $a_w$  0.995, 0.97 y 0.955 en todos los tratamientos que incluyeron el extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus*, observándose un aumento de 10 a 43 horas ( $a_w$  0.995), correspondiendo el menor tiempo al grupo control, el cual fue similar estadísticamente con los tratamientos que incluyeron las tres primeras concentraciones del extracto de alcaloides, y diferente significativamente al que incluyó  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ; mientras que aumentó de 12 a 49 horas en la  $a_w$  0.97, correspondiendo el menor tiempo al control (12 h) y el mayor al tratamiento con  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  del extracto (49 h) y fue de 17 a 56 horas en la  $a_w$  0.955 correspondiendo en forma similar que en las otras actividades de agua el menor tiempo al control y el mayor tiempo de fase lag al que incluyó  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ .

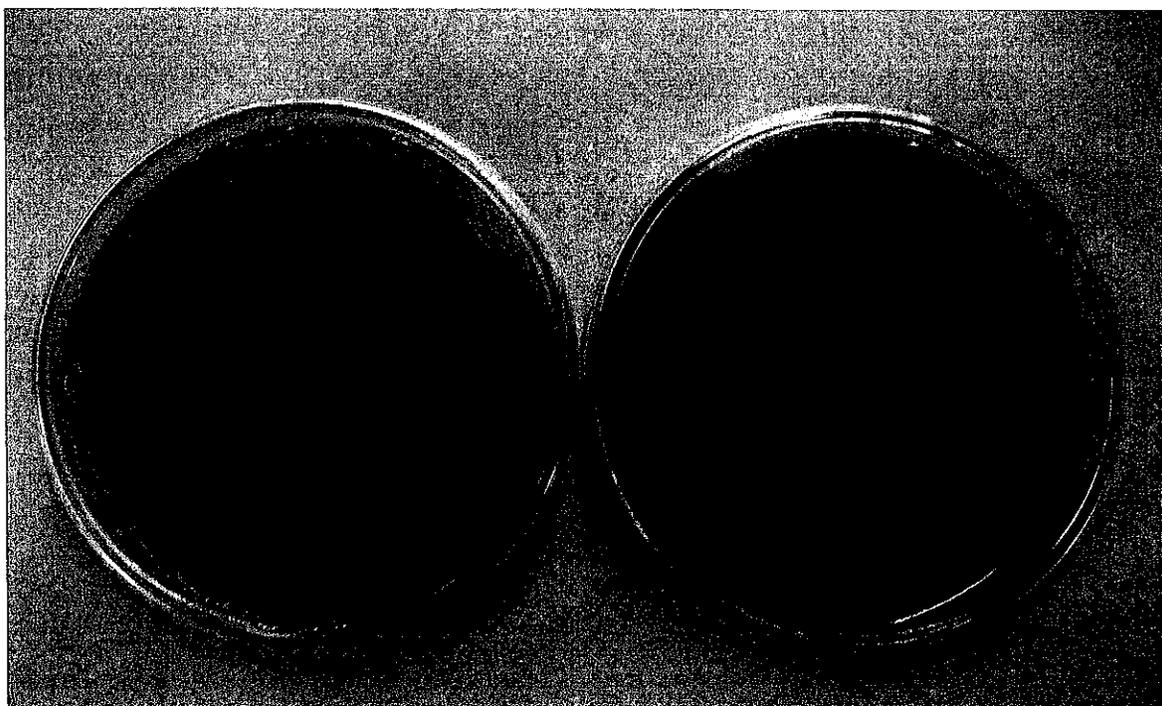


Figura 14. Efecto del extracto de *Lupinus exaltatus* sobre *Fusarium verticillioides* UDG 271 en medio de cultivo Agar Harina de Maíz (AHM).

Tabla 15. Efecto del extracto de *Lupinus exaltatus* y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la velocidad de crecimiento y la fase lag de *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivado en agar harina de maíz a 25°C.

Tratamiento	Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )	Velocidad de crecimiento (mm d <sup>-1</sup> )			Fase lag (h)		
		Actividad de agua ( $a_w$ )					
		0.995	0.97	0.955	0.995	0.97	0.955
Control		12.0 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>
Extracto *	1.0	11.5 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	3.9 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	23 <sup>a</sup>
Extracto *	5.0	9.8 <sup>b</sup>	5.1 <sup>b</sup>	2.8 <sup>c</sup>	12 <sup>a</sup>	21 <sup>b</sup>	28 <sup>a</sup>
Extracto *	10.0	7.2 <sup>c</sup>	4.2 <sup>c</sup>	2.1 <sup>d</sup>	12 <sup>a</sup>	26 <sup>c</sup>	39 <sup>b</sup>
Extracto *	20.0	4.2 <sup>d</sup>	2.4 <sup>d</sup>	1.4 <sup>e</sup>	43 <sup>b</sup>	49 <sup>d</sup>	56 <sup>c</sup>

\* Extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus*.

Las medias con diferente letra indica que los tratamientos son diferentes significativamente ( $P < 0.050$ ), prueba de Tukey.

El efecto de los extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus* a diferentes  $a_w$  0.995, 0.97 y 0.955, a una temperatura de 25°C sobre la producción de FBs por la cepa *F. verticillioides* UDG 271 se muestra en la tabla 16. El nivel óptimo para la producción de FBs fue en la  $a_w$  0.995, mientras que a niveles de 0.97 y 0.955 la producción de dicha micotoxina disminuyó un 52 a 85%, respectivamente.

En todas las actividades acuosas ensayadas, la producción de fumonisinas disminuyó significativamente ( $P < 0.050$ ) cuando se evaluaron concentraciones de alcaloides de 5.0 a 20 mg mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, a una actividad acuosa de 0.97 y una concentración de 1.0 mg mL<sup>-1</sup> de alcaloides, se observó estimulación de la producción de fumonisinas (37.9 µg g<sup>-1</sup> comparado con 24.7 µg g<sup>-1</sup> en el tratamiento control).

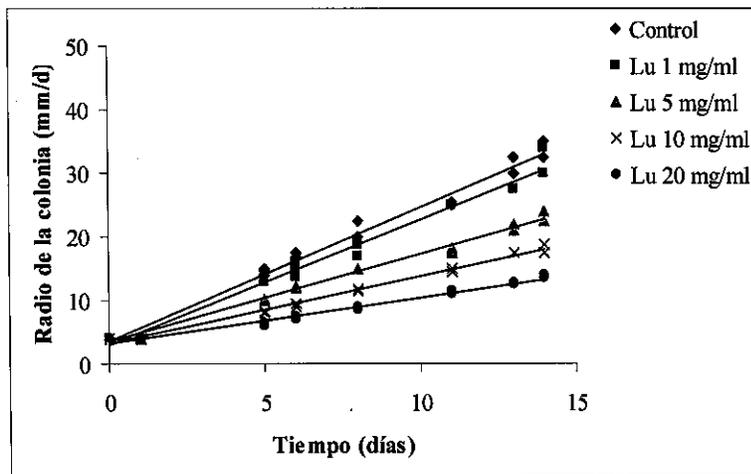
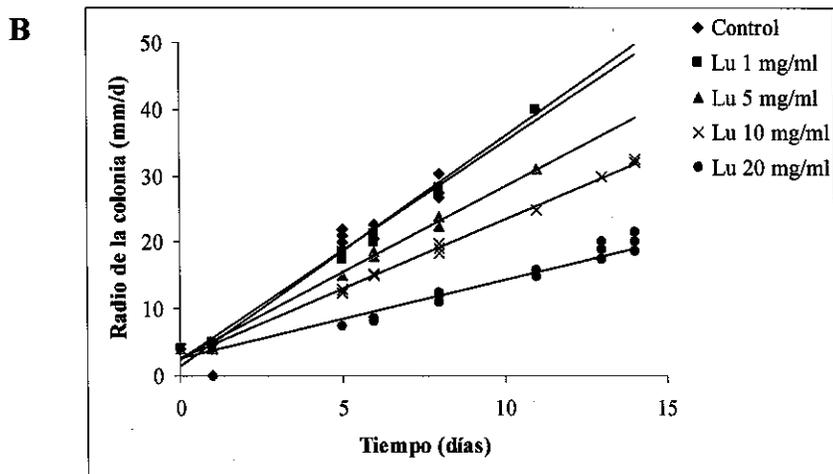
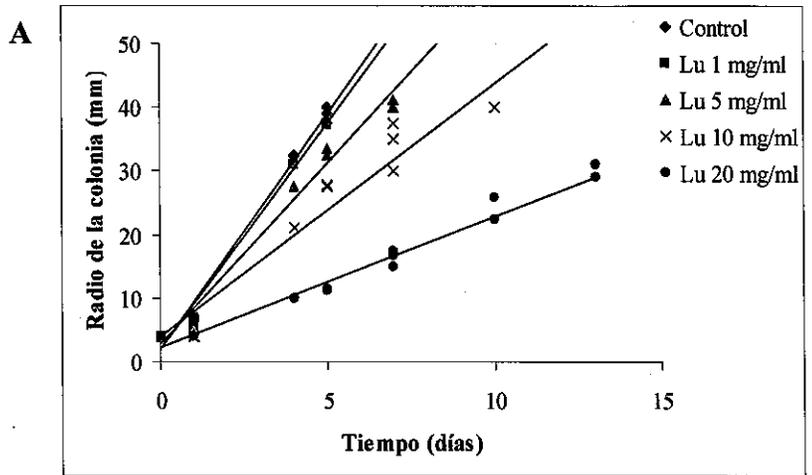


Figura 15. Efecto del extracto de *Lupinus exaltatus* sobre el crecimiento de *F. verticillioides* bajo diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) a 25° C cultivado en Agar Harina de Maíz (AHM). A: 0.995  $a_w$ ; B: 0.97  $a_w$ ; C: 0.955  $a_w$ .

Tabla 16. Efecto del extracto de *Lupinus exaltatus* y la actividad de agua sobre la producción de fumonisinas por la cepa de *Fusarium verticillioides* UDG 271 sobre agar harina de maíz a 25°C.

Tratamiento	Concentración de fumonisinas totales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
	Media $\pm$ S.D.		
	0.995 $a_w$	0.97 $a_w$	0.955 $a_w$
Control	51.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Extracto 1 mg m L <sup>-1</sup>	46.6 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	37.9 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	6.7 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
Extracto 5 mg m L <sup>-1</sup>	11.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	15.2 $\pm$ 0.5 <sup>c,f</sup>	4.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Extracto 10 mg m L <sup>-1</sup>	7.9 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	11.9 $\pm$ 0.9 <sup>d,f,g</sup>	5.0 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
Extracto 20 mg m L <sup>-1</sup>	9.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 0.1 <sup>e,g</sup>	5.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>

$a_w$ : actividad de agua

Las medias con diferente letra en cada columna son significativamente ( $P < 0.050$ ), prueba de Tukey. S.D.; desviación estándar.

En el presente estudio todos los tratamientos que incluyeron los extractos de *Lupinus exaltatus* y el control produjeron FB<sub>1</sub> en todas las actividades acuosas, mientras que en la  $a_w$  0.955 no hubo producción de FB<sub>2</sub> en todos los tratamientos, así como en las concentraciones 5.0, 10.0 y 20.0 mg mL<sup>-1</sup> de los extractos de *Lupinus exaltatus* en las diferentes  $a_w$ .

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Aislamiento e identificación de las especies de *Fusarium* de la sección *Liseola* aisladas de diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco

México es una región en la cual no se ha investigado ampliamente la incidencia de las especies de *Fusarium* en maíz a pesar de la gran importancia de dicho cereal en este país. Los resultados del presente estudio muestran que los diferentes híbridos de maíz cosechados en una localidad del estado de Jalisco presentaron un alto porcentaje de infección con especies de *Fusarium*. *F. verticillioides* fue la especie predominante en todas las muestras evaluadas, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*.

La incidencia y prevalencia de las especies de *Fusarium* aisladas de maíz en diferentes regiones geográficas y años de siembra depende principalmente de las condiciones ambientales (Bottalico, 1998). La alta incidencia de *F. verticillioides*, coincide con los pocos estudios realizados en México. Desjardins *et al.* (1994) evaluaron la incidencia de especie de *Fusarium* a partir de mazorcas de maíz colectadas en 1992 en el estado de Nuevo León (noreste de México); en dicho estudio *F. verticillioides* fue obtenido de 34 de las 55 mazorcas analizadas y no se encontró ninguna otra especie perteneciente al género. Reyes (2001) analizó muestras de 3 variedades de maíz cosechadas en el estado de Jalisco (Huejotitán y Ameca) y también encontró que la incidencia de *F. verticillioides* (porcentaje de aislamiento promedio: 90%) fue elevada en ambas localidades independientemente de la variedad de maíz y del daño visual de las mazorcas. Por otro lado, Cortez-Rocha *et al.* (2003) reportaron que *Fusarium* es el género más frecuentemente aislado de maíz (67 – 70%) en el estado de Sonora (norte de México), siendo *F. verticillioides* la especie de mayor prevalencia. Más recientemente, Sánchez-Rangel *et al.* (2005) demostraron también que *F. verticillioides* fue la especie más frecuente en muestras de maíz del Noroeste y Centro de México (80%).

Existen diversos estudios realizados en el mundo donde se demuestra que la especie predominante en maíz es *F. verticillioides*. Chulze *et al.* (1996) analizaron muestras de maíz cosechado en Córdoba, Argentina (cosecha 1993/1994) y se aisló a *F. verticillioides* como

especie prevalente (porcentaje de aislamiento promedio: 70%). Sydenham *et al.* (1993) analizaron 17 muestras de maíz de dos diferentes distritos de Buenos Aires (Argentina) e identificaron a *F. verticillioides* como principal contaminante (14 muestras) y en segundo lugar a *F. proliferatum* (3 muestras). González *et al.* (1995) a partir de maíz a cosecha aislaron a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* con porcentajes medios de 80% y 20%, respectivamente. En muestras de maíz a cosecha recolectadas en el norte de Argentina (provincia de Jujuy) se aisló con mayor frecuencia *F. subglutinans* (30 – 95%), seguida por *F. verticillioides* (12 – 50%) y *F. proliferatum* (10 – 12%) (Torres *et al.* 2001), mientras que Reynoso *et al.* (2004) analizaron 11 muestras de maíz provenientes de la zona núcleo maicera de Argentina y aislaron a *F. verticillioides* como especie predominante, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*.

Es importante señalar que en distintas regiones geográficas, con condiciones climáticas y tipos de cultivares diferentes, la distribución de las especies de *Fusarium* de la Sección *Liseola* puede variar. Se ha demostrado además que *F. verticillioides* tiene una distribución cosmopolita, no sólo en climas húmedos y templados, sino también en regiones tropicales y subtropicales. Ha sido aislado en América Central, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Estados Unidos, India, Italia, Jamaica, Japón, Nueva Zelanda, entre otros. En cambio, sólo se ha detectado en baja frecuencia en regiones con temperaturas frías, excepcionalmente se ha aislado en Rusia e Islandia (Bacon y Nelson, 1994), Alemania, Austria y Polonia (Lew *et al.*, 1990; Logrieco *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, son indicativos de la posible presencia de micotoxinas, principalmente fumonisinas, ya que la especie predominante en todas las muestras de maíz analizadas fue *F. verticillioides*. Sin embargo, la alta incidencia de *F. subglutinans* no debería ser desestimado, considerando la potencialidad de dicha especie de producir otras toxinas como moniliformina (MON), fusaproliferina (FUS) y beauvericina (BEA) (Bottalico, 1998; Logrieco *et al.*, 1996; Reynoso *et al.*, 2004).

En la última década se han obtenido importantes avances sobre la biología, taxonomía, patogenicidad y genética de *F. verticillioides* y su asociación con plantas de maíz. El ciclo de

infección propuesto para *F. verticillioides* en maíz (Munkvold y Desjardins, 1997), describe la posibilidad de que esta especie pueda infectar el cultivo en diferentes estadios de su desarrollo y encontrarse asociado a las plantas desde etapas tempranas, llegando inclusive hasta la época reproductiva y cosecha de los frutos. *F. verticillioides* puede llegar al maíz a través de los residuos donde sobrevive como saprófito, a través de la semilla (debido a su naturaleza endofítica), a través de las esporas presentes en el aire (canal de los estilos) ó incluso ser transportados por los insectos. *F. verticillioides* produce en el maíz infecciones asintomáticas y su naturaleza endofita caracteriza verdaderos procesos sistémicos de transmisión vertical entre generaciones sucesivas (Bacon *et al.*, 2001). La utilización de los grupos de compatibilidad vegetativa (GCV) ha demostrado que *F. verticillioides* es transmitido sistémicamente desde las semillas a los granos (Kedera *et al.*, 1992; Munkvold *et al.*, 1997a y b).

La asociación temprana entre el maíz y las especies de *Fusarium*, y en especial con *F. verticillioides*, ha llevado a postular que podría existir un posible beneficio ecológico. *F. verticillioides* ha demostrado tener capacidad de competencia frente a otros microorganismos patógenos. No sólo *F. verticillioides* y *F. proliferatum* pueden ingresar por el canal de los estilos, también podrían utilizar esta vía *F. graminearum* y *F. subglutinans* (Reid *et al.*, 2002). No obstante, las condiciones ambientales determinan la capacidad de colonización de las especies presentes en el maíz (Miller, 1994; Sutton, 1982; Vigier *et al.*, 1997). Asociaciones negativas han sido descritas entre *F. verticillioides* y *F. graminearum* o *F. subglutinans* (Marasas *et al.*, 1979; Rheeder *et al.*, 1990). Así mismo, la capacidad de competir desplazando otras especies ha sido demostrada en experimentos de co-inoculación con *F. graminearum* en el canal de los estilos de las mazorcas de maíz (Reid *et al.*, 1999). Bush *et al.* (2004), analizaron el comportamiento de *F. verticillioides* luego de ocurrida la polinización en 3 híbridos de maíz y su relación con el contenido de humedad de las mazorcas en desarrollo. Los resultados demuestran que la infección por *F. verticillioides* comienza luego de 4 ó 5 semanas posteriores a la polinización. Como característica se observa el aumento de la infección por esta especie a medida que el contenido de humedad alcanzó el 10%. Luego de 14 semanas posteriores a la polinización, el porcentaje de infección de *F. verticillioides* estuvo

entre el 30-60%, siendo también mayor la producción de fumonisinas en las épocas de madurez fisiológica y senescencia del cultivo (Bush *et al.*, 2004).

Como parte de las estrategias tendientes a reducir el impacto negativo dado por la presencia de estos hongos en el cultivo, es necesario desarrollar variedades de maíz resistentes a la infección y practicar la rotación de cultivos. Según Munkvold y Hellmich (2000), la utilización de cultivares transgénicos podría reducir la vulnerabilidad del maíz a las injurias producidas por los insectos y por ende a la presencia de especies de *Fusarium* y sus micotoxinas.

## **7.2. Determinación de la población y tipo de apareamiento de las especies de *F. verticillioides* aisladas de diferentes híbridos de maíz**

Las poblaciones de apareamiento encontradas en este estudio son similares a las detectadas en Estados Unidos (Leslie *et al.*, 1992b; Nelson *et al.*, 1993), Europa (Moretti *et al.* 1995) y Argentina (Chulze *et al.* 1998, Reynoso *et al.*, 2006) donde se aislaron las poblaciones A, E y D, que son las que se encuentran asociadas a maíz tanto a cosecha como a través de los distintos estadios de desarrollo. Desjardins *et al.* (1994) quienes evaluaron muestras de maíz cosechado en el estado de Nuevo León (México) sólo observaron la presencia de la población de apareamiento A entre las cepas de *Fusarium* aisladas, la proporción de los tipos de apareamiento *MATA-1*:*MATA-2* se distribuyeron en una proporción 21:10. Cabe señalar que, hasta el momento, dicho estudio es el único realizado a nivel poblacional en México.

Estudios previos de poblaciones aisladas de Estados Unidos y Europa muestran que los tipos de apareamiento *MATA-1* y *MATA-2* se distribuyen igualmente (Leslie *et al.*, 1992b; Moretti *et al.*, 1995), o que *MATA-1* es significativamente más frecuente que *MATA-2* (60 - 65% y 40 - 35%, respectivamente) (Leslie, 1995; Leslie y Klein, 1996). Reynoso *et al.* (2006) evaluaron cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz cosechado en la zona núcleo maicera de Argentina y encontraron que los tipos de apareamiento *MATA-1* y *MATA-2* se distribuyeron en una proporción 129:74.

Por otro lado, Mansuetus *et al.* (1997); Park *et al.* (1999); Chulze *et al.* (2000) y Srobarova *et al.* (2002) observaron una proporción *MATA-1* menor que *MATA-2* en poblaciones de Tanzania, Corea, Argentina y Eslovaquia, respectivamente.

En el presente estudio sólo se encontró el tipo de *MATA-2*, indicando que todas las cepas de *F. verticillioides* pertenecen a la población de apareamiento A y por lo tanto, pueden ser clasificadas como *Gibberella moniliformis* (estado sexual o teleomorfo) dentro del complejo de *Gibberella fujikuroi*.

### **7.3. Evaluación de la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas de *F. verticillioides* aisladas**

El nivel de la producción de FBs por cepas de *F. verticillioides*, es variable y depende de la constitución genética de las cepas, del ambiente y del sustrato sobre el cual se desarrolla el hongo (Bacon y Nelson, 1994). Se consideran cepas altamente productoras de FBs a aquellas que producen  $> 2000 \mu\text{g g}^{-1}$ , productoras intermedias a las que producen  $500 - 2000 \mu\text{g g}^{-1}$ , y como bajas productoras de FBs  $< 500 \mu\text{g g}^{-1}$  (Nelson *et al.*, 1991). Debido al efecto del sustrato, es importante elegir el adecuado al evaluar la capacidad toxicogénica de una determinada especie fúngica. Holocomb *et al.* (1993) evaluaron la producción de FBs por *F. verticillioides* NRRL-13616 sobre maíz, arroz entero, cacahuate y soya y determinaron que la producción de FBs por dicha cepa era máxima sobre maíz. Por lo tanto, es importante determinar el potencial toxicogénico de las cepas sobre el sustrato a partir del cual se aislaron las mismas.

Leslie *et al.* (1992a) han determinado que las cepas de diferente poblaciones de apareamiento difieren en su capacidad de producir FBs. En el presente estudio, la mayoría de las cepas de *F. verticillioides*, población de apareamiento A, fueron capaces de producir FBs independientemente del híbrido a partir del cual se aislaron las mismas, aunque se encontraron diferencias en cuanto a los niveles producidos. En general, las cepas aisladas del híbrido Lucero 807 produjeron los más altos niveles de FBs en comparación a los otros híbridos. Aunque son numerosos los factores que podrían influir en el comportamiento diferente de las

cepas *in vitro* para producir mayores niveles de toxinas, se puede estimar que parámetros tales como, la región geográfica, el tipo de suelo, el inóculo, las prácticas culturales, la humedad ambiente, juegan un papel importante sobre las características fisiológicas de las cepas. No existen estudios fehacientes que expliquen las diferencias en la capacidad de producción de FBs, solamente se han registrado datos de incidencia natural en diferentes regiones geográficas.

Los resultados del presente trabajo son comparables a los reportados por Desjardins *et al.* (1994) quienes evaluaron la capacidad de producir FBs por cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz cosechado en el noreste de México, donde el 97% de las cepas produjeron FBs en niveles que variaron entre 10 y 9,000  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Reyes (2001) encontró que cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz en el estado de Jalisco (Huejotitán y Ameca) produjeron FBs en niveles que variaron entre 700 y 2,280  $\mu\text{g g}^{-1}$ . En otro estudio realizado por Sánchez-Rangel *et al.* (2005) el 44% de las cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz cultivado en el noroeste y centro del país produjeron FB<sub>1</sub> en niveles que variaron entre 0.1 y 4,047  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Por otro lado, Chulze *et al.* (1996) evaluaron la capacidad toxicogénica de especies de *Fusarium*, población de apareamiento A (4 cepas) y D (7 cepas), aisladas de maíz de Argentina y encontraron que todas fueron productoras de altos niveles de FBs (1,500 - 4,000  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Synderman *et al.* (1993) encontraron cepas de *F. verticillioides* aisladas de Argentina que producían niveles de FB<sub>1</sub> que oscilaban entre 50 - 8,160  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), mientras que, Visconti y Doko (1994) analizaron la capacidad de producir FBs en cepas pertenecientes a la población de apareamiento A aisladas de maíz en Europa, los niveles de dicha micotoxina oscilaron entre 5 y 4,100  $\mu\text{g g}^{-1}$  para FB<sub>1</sub> (media= 1,331  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) y entre 1 y 885  $\mu\text{g g}^{-1}$  (media= 296  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para FB<sub>2</sub>. Srobarova *et al.* (2002) encontraron cepas de *F. verticillioides* aisladas de mazorcas de maíz de Eslovaquia producían niveles de FBs que variaban de 0.1 - 5,645  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Además, la producción de FBs por cepas de *F. verticillioides* en este estudio fue superior a la reportada por Ross *et al.* (1990) en Estados Unidos, los niveles oscilaron entre 960 y 2,350  $\mu\text{g g}^{-1}$  para FB<sub>1</sub> y de 120 y 230  $\mu\text{g g}^{-1}$  para FB<sub>2</sub>.

Por otro lado, los resultados del presente trabajo son inferiores a los encontrados por Reynoso *et al.* (2004) quienes evaluaron la capacidad de producir FBs de cepas de *F. verticillioides*, población de apareamiento A, aisladas de maíz en Argentina. En dicho estudio entre las 203 cepas evaluadas, 193 (95%) fueron capaces de producir la micotoxina en niveles que variaban entre 42 y 20,805  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Una variabilidad similar en la producción de FB<sub>1</sub> ha sido observada por otros autores (Castellá *et al.*, 1999; Fadl Allah, 1998; Leslie *et al.*, 1992a, b; Nelson *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991) entre cepas aisladas de varios sustratos de diferentes regiones (Asia, África, Australia, Egipto, España y Estados Unidos).

#### **7.4. Análisis de las condiciones climáticas registradas durante el cultivo correspondiente al ciclo primavera-verano 2003**

Las temperaturas registradas durante el periodo de estudio, se consideran de clima templado, en virtud de que las temperaturas máximas tanto extremas como promedio, se encontraron por debajo de la normal y las temperaturas mínimas promedio y extremas se registraron por encima de la normal, con excepción del mes de diciembre, que presentó temperaturas menores a la normal.

Se observó que en el periodo de estudio, la precipitación pluvial se mantuvo por arriba de la normal, por lo que se puede considerar al año 2003 como lluvioso, mientras que la humedad relativa presentó valores por encima de los registrados como el promedio de los encontrados durante 40 años previos, a excepción de los meses de mayo y diciembre que fueron ligeramente menores a lo registrado como normal.

Las condiciones climáticas prevalentes durante el cultivo primavera-verano de 2003, pudieron considerarse propicias para el desarrollo de las especies del género *Fusarium*. González (1995) menciona que el género *Fusarium* puede crecer en forma óptima en un rango de temperatura de 20 a 25°C y a una humedad relativa de 65 a 85%.

En el laboratorio se ha establecido que el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de *F. verticillioides* es de 22.5 a 27.5°C con un máximo de 32 a 35°C y una temperatura mínima de 2.5 a 5°C (Bacon y Nelson, 1994).

## **7.5. Valoración del antioxidante BHA y de los extractos de alcaloides de *L. exaltatus* sobre el crecimiento de *F. verticillioides* y la producción de fumonisinas (FBs)**

### **7.5.1. Efecto del antioxidante BHA**

Los resultados del presente estudio muestran que existe un gran potencial para el control del crecimiento de *F. verticillioides* usando un antioxidante (BHA) usado en la industria alimenticia bajo un amplio rango de  $a_w$  y en condiciones *in vitro*. Las concentraciones de BHA  $\geq 5$  mmol L<sup>-1</sup> inhibieron completamente el crecimiento fúngico en todos los valores de  $a_w$  evaluados así como la producción de FBs. Debido a que este antioxidante se usa en la industria alimenticia, podría tener útiles aplicaciones en los diferentes materiales destinados al procesamiento de alimentos para consumo humano.

La fase lag (h) incrementó significativamente en presencia de las diferentes concentraciones de BHA y niveles de  $a_w$ . Marín *et al.* (1996) encontraron que a medida que incrementaba la  $a_w$  y la temperatura desde condiciones óptimas a marginales para el crecimiento de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, la fase lag también aumentaba.

Estudios previos con diferentes antioxidantes, muestran que el BHA y el propilparabeno (PP) en diferentes concentraciones (1 – 20 mmol L<sup>-1</sup>) y a dos temperaturas (18 y 25°C) fueron efectivos para controlar el crecimiento y la producción de FBs de cepas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* a diferentes  $a_w$  y sobre agar harina de maíz o maíz irradiado (Etcheverry *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003). Reynoso *et al.* (2002) mostraron que concentraciones bajas (0.5 y 1.0 mmol L<sup>-1</sup>) de los antioxidantes BHA y PP, solos o combinados con otros antioxidantes, pueden ser más efectivas que concentraciones altas.

Thompson *et al.* (1993) encontraron que el BHA y PP a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  reducía significativamente la germinación de las cepas de *F. verticillioides* productoras de moniliformina sobre PDA. Una inhibición completa del crecimiento micelial sobre PDA se obtuvo con concentraciones de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de BHA y 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de PP.

Estudios realizados por Marín *et al.* (1999a, 2000) muestran que el ácido propiónico al 0.07%, el nivel comercial recomendado, tuvo algunos efectos sobre el crecimiento pero no sobre la producción de FBs por cepas de *F. verticillioides*. Mientras que, para *F. proliferatum*, la concentración de FBs disminuyó muy poco a medida que aumentaba la concentración de dicho ácido en granos de maíz irradiado y natural.

La información obtenida en el presente estudio sugieren que el antioxidante BHA controla el crecimiento y la producción de FBs en una cepa de *F. verticillioides* a diferentes niveles de  $a_w$ . Sin embargo, el control efectivo del crecimiento no necesariamente implica la inhibición de la producción de metabolitos secundarios. En el presente estudio, en todos los tratamientos evaluados se observó una reducción y no una estimulación en la producción de FBs a medida que la concentración del BHA aumentaba, lo cual indicaría que como respuesta al estrés acuático produciría más micotoxina (Reynoso *et al.*, 2002).

Hasta el momento, la información sobre el mecanismo de acción de los antioxidantes sobre las especies de *Fusarium* es limitada. Por ejemplo, Adams y Moss (1995) muestran que el BHA y el PP actuarían principalmente sobre la membrana celular, afectando la traducción de energía y el transporte de sustratos. Sin embargo, debido a que las enzimas hidrolíticas son críticas para la colonización de los cereales por especies de *Fusarium* (Marín *et al.*, 1998) cualquier efecto de los antioxidantes se manifestaría por cambios en la producción de enzimas. Reynoso *et al.* (2002) demostraron una reducción significativa de la actividad de ciertas enzimas involucradas en facilitar la colonización de los granos cuando las cepas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se encontraban en presencia del antioxidante PP, solo o en combinación con otros (BHA, BHT, THBP).

### 7.5.2. Efecto del extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus*

Estudios previos han mostrado que entre las estrategias que permiten el control del crecimiento de hongos patógenos a nivel cultivo se encuentran el uso de extractos vegetales, los cuales poseen características idóneas para inhibir el desarrollo y reproducción de especies productoras de micotoxinas. Muchas especies, hierbas y plantas en general y, sus extractos poseen actividad antimicrobiana, y han sido ensayados sobre varias especies fúngicas.

Los resultados del presente trabajo demuestran que existe un potencial para controlar el crecimiento y producción de fumonisinas por *F. verticillioides* usando extractos de alcaloides de *L. exaltatus* bajo diferentes actividades acuosas. El mayor efecto inhibitorio se observó cuando se sometió a *F. verticillioides* a una concentración de extracto de alcaloides de 20 mg mL<sup>-1</sup>, independientemente de la actividad acuosa ensayada.

Los extractos de alcaloides derivados de *Lupinus* han sido evaluados previamente como agentes fungicidas, sin embargo son pocos los estudios realizados hasta el momento. Zamora *et al.* (2002) evaluaron el comportamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, frente a diferentes concentraciones de extractos de alcaloides de *L. montanus* y frente a lupanina pura. Ellos encontraron que, tanto el extracto de alcaloides como de lupanina inhibían el crecimiento fúngico a concentraciones de 450 ppm.

Por otra parte, Arias *et al.* (2000), analizaron el efecto fungicida de extractos de alcaloides modificados de *Lupinus* (tioanálogos de lupanina, (+) -2-thinosparteina) y de lupanina pura, sobre cepas de *Fusarium* spp., aisladas de plantas de *Agave tequilana* Weber. Los resultados mostraron reducción del crecimiento del hongo por los extractos modificados, sin embargo fue en menor proporción que la observada por efecto de los extractos ricos en lupanina.

Actualmente, se están evaluando otros extractos vegetales que podrían ser utilizados como fungicidas contra especies de *Fusarium* productoras de micotoxinas. Los aceites esenciales derivados de plantas aromáticas (principalmente, *Origanum vulgare* y *Mentha piperita*) han sido probados como controladores del crecimiento y producción de fumonisinas por especies

de *F. verticillioides* (López *et al.*, 2004). En general, los aceites esenciales que contienen alcoholes y fenoles alifáticos muestran una acción significativa contra algunas especies fúngicas, tales como, *Aspergillus aegyptiaceus*, *Penicillium cyclopium* y *Trichoderma viride* (Megalla *et al.* 1980). Velluti *et al.* (2003) evaluaron 37 aceites esenciales sobre el crecimiento y producción de fumonisinas por *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y, encontraron que, principalmente el clavo de olor y el orégano eran los más efectivos sobre estas especies fúngicas a una actividad acuosa de 0.995.

Por otro lado, Tequida *et al.* (2002) evaluaron el efecto fungicida de extractos alcohólicos de plantas silvestres de la región de Sonora (México) sobre diversas especies fúngicas, entre ellas, *F. verticillioides*. Los autores informaron que el crecimiento de *F. verticillioides* se vio afectado por extractos metanólicos de *Larrea tridentata* (87.7%), *Baccharis glutinosa* (53.7%) y *Ambrosia confertiflora* (47.8%); mientras que también se observó una reducción del crecimiento con extractos etanólicos, principalmente de *L. tridentata* (100%) y *A. confertiflora* (50.4%).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede sugerir que los extractos de alcaloides derivados de *Lupinus exaltatus* deberían ser considerados como fungicidas naturales alternativos. Estudios futuros tendrían que enfocarse la efectividad de dicho extracto en granos de maíz y evaluar su efectividad en presencia de la micoflora natural de los granos. Luego de esto se debería evaluar la efectividad de dichos extractos en condiciones de campo.

## 8. CONCLUSIONES

- Se encontró alta incidencia de especies de *Fusarium* en los diferentes híbridos de maíz cosechados en las parcelas experimentales del CUCBA durante el ciclo primavera - verano 2003.
- *Fusarium verticillioides* fue la especie aislada con mayor frecuencia en los diferentes híbridos de maíz estudiados, seguida por *F. subglutinans* y *F. proliferatum*.
- Se caracterizó una población de apareamiento entre las cepas evaluadas: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon = *Gibberella fujikuroi* población de apareamiento A, teleomorfo, *Gibberella moniliformis* Wineland). En dicha población sólo se encontró un tipo de apareamiento: MATA-2.
- Todas las cepas de *Fusarium verticillioides*, población de apareamiento A, evaluadas fueron capaces de producir fumonisinas en niveles relativamente altos.
- El uso del antioxidante BHA fue efectivo para inhibir el crecimiento y la producción de fumonisinas de la cepa *F. verticillioides* UDG 271 a diferentes  $a_w$  en condiciones *in vitro*.
- Los extractos de alcaloides del *Lupinus exaltatus* mostraron efecto inhibitor del crecimiento micelial y sobre la producción de fumonisinas de la cepa *F. verticillioides* UDG 271 a diferentes  $a_w$  en condiciones *in vitro*.
- Los extractos de alcaloides del *Lupinus exaltatus* mostraron efecto fungicida similar al del antioxidante BHA, por lo que pueden ser considerados como alternativa en el control de la contaminación por *Fusarium* en campo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. R., Moss, M. O. (1995). Food Microbiology Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Alberts J. F., Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Van Schalkwyk, D. J., Behrend, Y. (1990). Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium* species associated with ear rot of maize. PhD Thesis. Wisconsin, Madison University.
- Aldrich, S. R., Leng E. R. (1974). Selección de híbridos. En: Producción moderna del maíz. Traducción castellana de la obra Modern Crop Production. Editada por F & W Publishing Corp, Cincinnati, Ohio. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp. 29-39.
- Arias, G. A., García, L. P., Ruíz, L. M., Pineda, J. B., Monteon A. J. (2000). Fungicide effect of Mexican alkaloid lupin extract. En: Proceedings 9<sup>th</sup> International Lupin Conference. Editado por: van Santen, E., Wink, M., Weissmann, S., Romer, P. Germany, pp. 294-296.
- Arias, G. A., López G. P., Ruiz, L. M., Wysocka, W. (2002). Growth inhibition of *Fusarium* by a new lupanine thioanalogue, (+) -2-thionosparteine, and (+) lupanine. En: Proceedings 10<sup>th</sup> International Lupin Conference. Editado por: van Santen, E., Hill, G. D. Laugarvatn, Iceland, pp. 256-257.
- Bacon, C. W., Nelson, P. E. (1994). Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J. Food Prot.* 57: 514-521.
- Bacon, C. W., Williamson, J. W. (1992). Interactions of *F. moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologia*. Eds. Plenum Press New York pages. 65-70.

- Bacon, C. V., Yates, I., Hinton, D. M., Meredith, F. (2001). Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize. *Environ. Health Perspect.* 109: supplement 2.
- Bennet, G. A., Richard, J. L., Eckhoff, S. R. (1996). Distribution of fumonisins in food and feed products from contaminated corn. En: Fumonisin in Food. Editado por: Jackson, L. S., De Vries, J. W., Bellerman, L. B. Plenum Press. New York. USA pp. 317-322.
- Betina, V. (1989). Mycotoxins as Secondary Metabolites. En: Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam. pp. 27-41
- Bermúdez, T. K., Robledo, N., Martínez, J., Tei, A. & Wink, M. (1999). Biodiversity of the genus *Lupinus* in México. En: Lupin, and Ancient Crops for the New Millennium. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Lupins Conference. Editado por: E. van Santen, M., Wink, S., Weissman & P. Roemer. June 20-24. Klink/Müritz, Germany.
- Bezuidenhout, G. C., Gerderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., Vlegaar, R. (1988). Common structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc.* 11:743-745.
- Bilgrami, K. S., Choudhary, A. K. (1998). Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. En: Mycotoxins in agriculture and food safety. Editado por: Sinha, K. K., Bhatnagar, D. Marcel Dekker, New York. pp 01-43.
- Bolger, M., Coker, R. D., Dinovi, M., Gaylor, D., Gelderblom, W., Olsen, M., Paster, N., Riley R. T., Shephard, G., Speijers, G. J. A. (2001). Fumonisin. En: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, Prepared by the 56<sup>th</sup> Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), WHO, Geneva. pp. 103-279.
- Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80: 85-103.

- Branham, B.E., and Plattner R.D. (1993). Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *J. Nat. Prod.* 56:1630-1633.
- Bukovcakova, M., Scorobarova, A., Vozar, Y. (1991). Zearalenona production in wheat cultivars infected with the fungus *Fusarium graminearum*. Schwabe. *Mycotoxin Res.* 7:84-90.
- Bush, B. J., Carson, M. L., Cubeta, M. A., Hagler, W. M., Payne, G. A. (2004). Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* un developing maize kernels. *Phytopathology* 94(1):88-93.
- Camacho, L. (1986). Fermentation characteristics of a yoghurt similated prepared with lupin milk. En: Proc. IV Inter. Lupin Conf. Geraldton, Western Australia. Aug 1986. pp. 15-22.
- Carpinella, C. M., Giorda, M. L., Ferrayol, G.C., Palacios, M. S. (2003). Antifungal effects of diferentes organics extracts from *Melia azederach* L. on phytopatogenic fungi and their isolated active components. *J. Agric. Food Chem.* 51:2506-25011.
- Castellá, G., Bragulat, M. R., Cabañez, F. J. (1999). Fumonisin production by *Fusarium* species isolated from cereals and feeds in Spain. *J. Food Prof.* 62:811-813.
- Charmeley, E. L., Prelusky, D. B. (1995). Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1:421-435.
- Chelkowski, J., Kwasna, H., Zajkowski, P., Visconti, A., Bottalico, A. (1987). *Fusarium sporotrichioides* Sherb. and trichotecenes associated with *Fusarium*-ear rot of corn before harvest. *Mycotoxin Res.* 3:111-113.

- De la Cuadra, C., Tello, J. C. Muzquiz, M., Calvo, R. (1994). Poder fungicida *in vitro* de esparteina y gramina, alkaloides del Lupino amargo. *Botánica* 13:99-101.
- Delp, B. R., Stwell, L. J., Marois, J. (1986). Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytophatology* 76:1299-1305.
- D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijikma, W. T. P., Dujardin, A., Placinta P. M. (1998). Pesticide use and mycotosin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:741-751.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Gordon, T. R. 2000. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycol. Res.* 104:865-872.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Nelson, P. E. (1994). Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1695-1697.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Proctor, R. H. (1997). Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2571-2576.
- Dickens, J. W., Whitaker. T. B. (1975). Efficacy of electronic color sorting and handpicking to remove aflatoxin contaminated kernels from commercial lots of solded *peanuts*. *Peanut Sci.* 2:45-49.
- Doko, B., Rapior, S., Visconti, A., Schjoth, J. (1995). Incidence and levels of fumonisinas contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Food Chem.* 43: 429-434.

- Chu, F. S., Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the people Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:847-852.
- Chulze, S., Ramírez, M. L., Farnochi, M. C., Pascale, M., Visconti, A., March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. *J. Agric F. Chem.* 44:2797-2801.
- Chulze, S., Ramirez, M. L., Pascale, M., Visconti, A. (1998). Fumonisins production by, and mating population of, *Fusarium* Section *Liseola* isolates from maize in Argentina. *Mycol Res.* 102:141-144.
- Chulze, S. N., Ramírez, M. L., Torres, A., Leslie, J. (2000). Genetic variation in *Fusarium* Section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5312-5315.
- Coppin, E., Debuchi, R., Arnaise, S., Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous Ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:411-428.
- Cortez-Rocha, M. O., Ramírez-Asrudillo, W. R., Sanchez-Mariñez, R. I., Rosas-Burgos, E. C., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., Castellón-Campaña, L. G., Tequida-Meneses, M. (2003). Fumonisins and fungal species in corn from Sonora, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70:668-673.
- Dallyn, H. (1978). Effect of Substrate Water Activity on the Growth of Certain Xerophilic Fungi. PhD Thesis, CNNA, Polytechnic of the South Bank, London, UK.
- Davis, R. M., Kegel, F. R. Sills, W. M., Farra, J. J. (1989). *Fusarium* ear rot of corn. *Calif. Agric.* 43:4-5.
- De la Cuadra, C., Tello, J. C. Muzquiz, M., Calvo, R. (1992). Antifungal effect of quinolizidine alkaloids from *Lupinus* spp. 1th European Conference, Francia. pp 341-342.

- Edwards A. C., van Barneveld R. J. (1998). *Lupins* for livestock and fish. Chap. 13 *Lupins* as crop plants. Biology, production and utilization. Editado por: Gladstones J. S., Atkins, C., Hamblin, J. CAB International. UK.
- Egaña J. I., Uauy R., Cassorla, X., Barrera, G., Yañez, E. (1992). Sweet *lupin* protein quality in young men. *J. Nutr.* 122:2341-2347.
- Elmer, W. H., Ferrandino, F. J. (1992). Pathogenicity of *Fusarium* species (Section *Liseola*) to asparagus. *Mycologia* 84:253-257.
- Espada, Y., Ruiz de Gopegui, R., Cuadradas, C. Cabañes F. J. (1994). Fumonisin mycotoxicosis in broilers: weights and serum chemistry modification. *Avian Dis.* 38:454-460.
- Etcheverry, M., Torres, A., Ramírez, M. L., Chulze, S., Magan, N. (2002). *In vitro* control of growth and fumonisin production by *F. verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *J. Appl. Microbiol.* 92:624-632.
- Fadl Allah, E. M. (1998). Occurrence and toxigenicity of *Fusarium moniliforme* from freshly harvested maize ears with special references to fumonisin production in Egypt. *Mycopathologia* 140:99-103.
- FDA, (2000a) Guidance for Industry: Fumonisin levels in human food and animal feed. Draft Guidance. USA Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and applied Nutrition, Centre for Veterinary Medicine.  
URL:<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fumongui.html>.
- FDA, (2000b). Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Corn Products Intended for Human Consumption. USA Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied. URL:<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fumong1.html>.

- Franceschi S., Bidoli, E., Vecchia, C. (1990). Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy. *JNC*. 82:1407-1411.
- Gelderblom, W. A. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R., Kriek, N. P. J. (1988). Fumonisin-nobel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol* 54:1806-1811.
- Gladstones, J. S. (1974). The mediterranean white lupin. *Dep. Agric. Wes. Aust. Tech. Bull.* 26:70-74.
- Glass, N. L.; Kuldau, G. A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous *Ascomycetes*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:201-224.
- González, H. H. L., Resnik, S. L., Boca, R. T., Marasas, W. F. O. (1995). Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia* 130:29-36.
- Grainge, M. & Ahmed. S. (1988). Handbook of plants with pest control properties. John Wiley. p470.
- Hanq, N. (1993). Lupins (*Lupinus species*). En: Underutilized crops. Pulses and vegetables Editado por: Williams, J. T. Publicado por: Chapman y Hall, London, U.K.
- Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greence, J. T., Newman, L. E., Cole, J. R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium verticillioides*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:217-221.
- Haschek-Hock, W. M. C. (1999). An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. International Conference on the toxicology of fumonisin, Arlington Virginia, US, ILSI North America, p7.

- Haschek, W. M., Kim, H. Y., Motelin, G. K., Stair, L. E., Beasley, W. J. (1992). Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117:83-86.
- Hatzold, T., Elmadfa, I., Gross, R., Wink, M., Hartmann, T., Witte, L. (1983). Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem* 31:934-938.
- Headrick, J. M., Pataky, J. K. (1990). Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 80:487-494.
- Henningen M. R., Valente Soares, L. M., Sanchez, S., Di Benedetto, N. M., Longhi, A., Eyh rabide, G., Torroba, J., Zanelli, M. (2000). Fumonisin in corn hybrids grown in Argentina for two consecutive seasons. En: Proceeding of the Xth International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins. Editado por: De Koe, W. J., Samson, R. A., van Egmond, H. P., Gilbert, J., Sabino, M. 21-25, May 2000 Guaruj , Brazil. pp 331-339.
- Hesseltine, C. W. (1985). Global significance of mycotoxins. En: International IUPAC. Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
- Holocomb, M., Thompson, H. C., Hankkins, L. J. (1993). Analysis of fumonisin B<sub>1</sub> in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 4(11):746-767.
- Hopmans, E. C., Murphy, P. A. (1992). The detection of fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn-containing foods and pork tissues. Institute of Food Technologists Annual meeting, New Orleans, LA, June, 1992.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC Lyon, France. 56:445-466.

- Jardine, D. J., Leslie, J. F. (1992). Aggressiveness of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) isolates to grain sorghum under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 76:897-900.
- Kedera, C. J., Leslie, J. F., Claffin, L. E. 1992. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 82:1138.
- Kedera, C. J., Plattner, R. D., Desjardins, A. E. (1999). Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B<sub>1</sub> in maize in western Kenya. *Appl. Environ Microb.* 65:41-44.
- Keeler, R. F. (1984). Teratogens in plants. *J. Anim. Sci.* 58:1029
- Keeler R. F., Panter K. E. (1989). The piperidine alkaloid composition and relation to crooked calf disease-inducing potential of *Lupinus formosus*. *Teratol.* 40:423.
- Kellerman, T. S., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Gelderblom, W. C. A., Cawood, M., Coetzer, J. A. W. (1990). Leucoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B<sub>1</sub>. *J. Vet. Res.* 57:269-275.
- Kinghorn, D. A., Selim, M. A., Smolenski, S. J. (1980). Alkaloid distribution in some new world *Lupinus* species. *Phytochem.* 19:1705-1710.
- Klittich, C. J. R., Leslie, J. L (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme*. *Genetics* 118:417-423.
- Kommendahl, T., Windels, C. (1981). Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. En: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Editado por: Nelson, E., Tousson, T. A., Cook, R. J. Pennsylvania State University, University Park. pp 94-103.
- Leslie, J. F. (1991). Mating population in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*) *Phytopathology* 81:1058-1060.

- Leslie, J. F. (1995). *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Ca. J. Bot.* 73:S282-S291.
- Leslie, J. F. (1996). Genetic problem in some *Fusarium* species. *Sydowia* 48:32-43.
- Leslie, J. F., Doe, F. J., Plattner, R. D., Shackelford, D. D., Jonz, J. (1992a). Fumonisin B<sub>1</sub> production and vegetative compatibility of strains from *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Mycopathologia* 117:27-45.
- Leslie, J. F., Klein, K. K. (1996). Female fertility and mating-type effects on effective population size in filamentous fungi. *Genetics* 144:557-576.
- Leslie, J. F., Mansuetus, A. S. B. (1995). Biological species and vegetative compatibility group as population descriptors in *Fusarium*. En: *Disease Analysis through Genetics and Biotechnology: Interdisciplinary Bridges to Improved Sorghum and Millet Crops*. Editado por: Leslie, J. F., Frederiksen, R. A. Iowa State University Press. pp. 277-290.
- Leslie, J. F., Marasas, W. F. O., Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Stockenström, S., Thiel, P. G. (1996). Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1182-1187.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 88:343-350.
- Leslie, J. F., Plattner, R. D., Desjardins, A. E., Klittich, C. J. R. (1992b). Fumonisin B<sub>1</sub> production by strains from different mating population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 82:341-345.

- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Iowa. USA.
- Lew, H., Adler, A., Edinger, W. (1990). Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) *Mycotoxin Res.* 74:71-76.
- Lipps P. E., Deep, I. W. (1991). Influence of tillage and crop rotation in yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Dis.* 75:828-833.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostecki, M., Golinski, P., Ritieni, A., Chelkowski, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3084-3088.
- Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, V., Ritieni, A., Caiaffa, M. F., Randazzo, G., Bottalico, A., Macchia, L. (1996). Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, EF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B lymphocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3378-3384.
- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Chelkowski, J., Altomare, C., Bottalico, A., Randazzo, G. (1993). Natural occurrence of bauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infested corn ears in Poland. *J. Agric. Food Chem.* 41:2149-2152.
- López, A. G., Theumer, M. G., Zygadlo, J. A., Rubinstein, H. R. (2004). Aromatic plants essential oil activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathologia* 158:343-349.
- McVaugh, R. (1987). *Flora novogaliciana. A. Descriptive account of the vascular plants of western México. Vol. V. leguminosae* and Arbor University of Michigan Press USA.

- Magnoli, C. E., Saenz, M. A., Ferrero, S., Chiachera, S. M., Dalcero, A. M. (1999). Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisins-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 145:35-41.
- Mankinen, C. B., Herding, J., Elliot, M. (1975). Genetics of *Lupinus* VIII. Variation in the occurrence of alkaloids in natural population of *Lupinus nanus*. *Taxonomy* 24(4):425-429.
- Manninger I. (1979). Resistance of maize to ear rot on the basis of natural infection and inoculation. En: Proceeding 10<sup>th</sup> Meeting Eucarpia, Maize, Sorghum Sec. Vama, Bulgaria. pp 181-184.
- Mannon, J., Johnson, E. (1985). Fungi down on the farm. *New Sci.* 105:12-16.
- Mansuetus, A. S., Odvody, G. N., Frederiksen, R. A., Leslie, J. F. (1997). Biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*) recovered from sorghum in Tanzania. *Mycol. Res.* 101:815-820.
- Manzanares, A. T., Estrella, P. A. (1985). Programas de cultivos potenciales alimentarios prehispánicos, mesoamérica y andina. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. México.
- Marasas, W. F. O. (1995). Fumonisins: their implications for human and animal health. *Nat. Toxins* 3:193-198.
- Marasas, W. F., Jaskiewicz, K., Venter, F. S., Van Schalkwyk, D. J. (1988). *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S Afr. Med J.* 74(3):110-114.
- Marasas, W. F., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C., Coetzer, J. A., Thiel, P. G., van der Lugt, J. J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 55(4):197-203.

- Marasas, W. F. O., Kriek, N. P. J., Wiggins, V. M., Steyn, P. S., Towers, D. K., Hastie, T. J. (1979). Incidence, geographical distribution, and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. *Phytopathology* 69:1181-1185.
  
- Marasas, W. F. O., Millar, J. D., Riley, R. T., Visconti, A. (2001). Fumonisin-occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment. En: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. Editado por: Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. Aps PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 332-359.
  
- Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Rabie, C. J., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. (1986). Moniliformin production in *Fusarium* Section *Liseola*. *Mycologia* 78:242-247.
  
- Marín, S., Homedes V., Sanchis V., Ramos A.J., Magan, N. (1999). Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. *J. Stor. Prod. Res.* 35:15-26.
  
- Marín, S., Magan, N., Abellana, M., Canela, R., Ramos, A. J., Canela, R., Sanchis, V. (2000). Selective effect of propionates and water activity on maize mycoflora and impact on fumonisin B<sub>1</sub> accumulation. *J. Stored Prod. Microb.* 36:203-214.
  
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Magan, N. (1998). Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* during colonization of maize. *Intern. J. Food Microb.* 42:185-194.
  
- Marín, S., Sanchis, V., Saenz, D., Castel, I., Ramos, A. J., Canela, R., Magan, N. (1999). Control of growth and fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* isolates in moist maize with propionate preservatives. *Food Add. Contam.* 12:555-563.

- Marín, S., Sanchis, V., Teixido, R., Saenz, D., Ramos, A. J., Magan, N. (1996). Water activity and temperatura relationship and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can. J. Food Microb.* 42:1045-1050.
- Marquez R. L., Gutierrez, R. M., Miranda, F. I. (1991). Acute (human) poisoning by lupin (*Lupinus*) seed debittering water. *Vet. Hum Toxicol.* 33:265-267.
- McGee, D. C. (1988). Maize diseases: A reference source for seed technologists. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Megalla, S. E., El-Keltawi, N. E., Ross, S. A. (1980). A study of antimicrobial action of some essential oil constituents. *Herba Pol.* 26:181-186.
- Miller, J. D. (1994). Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. En: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin. Editado por: Miller, J. D., Trenholm, H. L. Eagan Press, St. Paul, Minn., 19-35.
- Montes-Belmont, R. (1996). Productos naturales de origen vegetal ara el combate de fitopatógenos. *Revista Mexicana. Fitopatología.* 14(1):9-14.
- Moretti, A., Bennett, G. A., Logrieco, A., Bottalico, A., Beremand, M. N. (1995). Fertility of *Fusarium moniliforme* from maize and sorghum related to fumonisin production in Italy. *Mycopathologia* 131:25-29.
- Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G. (1996). Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by differents population of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*). *Sydowia* 48:44-56.
- Moss, M. (1996). Mycotoxins. *Mycol. Res.* 100:513-523.

- Munkvold, G. A., Desjardins, A. E. (1997). Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence. *Plant Dis.* 81:566-565.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L. 2000. Genetically modified, insect resistant maize: Implications for management of ear and stalk diseases. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2000-0912-01-RV.
- Munkvold, G. P., Hellmich, R. L., Showers, W. B. (1997a). Reduce *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European Corn Borer resistance. *Phytopathology* 87:1071-1077.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W. M. (1997b). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Phytopathology* 97:209-217.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Gorospe, M. J., Rodenas, I. (1989). A chemical study of *Lupinus hispanicus* seed-toxic and antinutritional components. *J. Sci. Food Agric.* 47:205-213.
- Muzquiz, M., Cuadrado, C., Ayet, G., De la Cuadra, C., Burbano, C., Osagie, A. (1994). Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. *J. Agric. Food Chem.* 42:1447-1450.
- Nelson, P. E. (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29-36.
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E., Plattner, R. D. (1993). Fumonisin micotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:233-252.

- Nelson, P. E., Plattner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. (1991). Production of fumonisinas by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2410-2412.
- Nelson, P. E., Plattner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. (1992). Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in Section *Liseola* and some related species. *Environ. Microbiol.* 58:984-998.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park.
- Norred, W. P., Voss, K. A. (1994). Toxicity and role of in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot.* 57:52-57.
- Norred, W. P., Voss, K. A., Riley, R. T., Plattner, R. D. (1996). Fumonisin toxicity and metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392:225-236.
- Ono, E. Y.S., Sugiura, Y., Homechin, M., Kamogae, M., Vizzoni, E., Ueno, Y., Hiroka, E. Y. (1999). Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisin in freshly harvested corn of the State of Parana, Brazil. *Mycopathology* 147:139-148.
- Panter, K. E., Keeler, R. F. (1993). Quinilizidine and piperidine alkaloid teratogens from poisonous plants and their mechanism of action in animals. *Vet. Clin. North Amer.* 9:33-40.
- Przybalak, K. J., Ciesiolka, D., Wysocka, W., Garcia, L. P., Ruíz, L. M. A., & Gulewicz, K. (2005). Alkaloid profiles of Mexican wild lupin and an effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annuum* L.). *Industrial Crops and Products* 21(1):1-7

- Park, S. Y., Lee, Y. W., Lee, Y. H. (1999). Population genetic analyses of *Gibberella fujikuroi* isolates from maize in Korea. Proceeding of the 1999 Agricultural Biotechnology Symposium: Biology and Chemistry of Fungal Secondary Metabolites (Seoul, Korea), pp. 101-116.
  
- Peretiatkowics, M., Ciesiolka, D., Stobiecki, M., Gulewics, M. (1994). Biological activity of extract from bitter lupin seeds. En: Advances in Lupin Reseach. Proc. VII Inter Lupin Conf. 197-200. Evora, Portugal 18-23 de abril.
  
- Perkowski, J., Chelkowski, J., Blazezak, P., Snijders, O., Wakulinski, W. (1991a). A study of correlations between the amount of deoxynivalenol in grain of wheat and percentage of *Fusarium* damage kernels. *Mycotoxin Res.* 7:102-115.
  
- Perkowski, J., Chelkowski, J., Plattner, R. D., Gohnsk, P. (1991b). Accumulation of mycotoxins in maize cobs infected with *Fusarium graminearum*. *Mycotoxin Res.* 7:115-121.
  
- Petterson, D. S. (1998). Composition and food uses of *Lupinus*. Chap. 12. En: Lupin as crop plants. Biology, production and utilization. Editado por: Gladstones J. S., Atkins, C. Hamblin, J. CAB. International. UK.
  
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an update review. *Revue. Med. Vet.* 6:479-492.
  
- Planchuelo, A. M. (1994). Wild *lupins* distribution and its implication as germoplasm resources. En: Advances in Lupinus Reseach. Proc. VII Inter. Lupin Conf Evora, 18-23 April. Editado por: Neves, J. M., Beirao da Costa, L. Portugal. pp 65-69.
  
- Plattner, R. D., Norred, W. P., Bacon, C. W., Voss, K. A., Peterson, R., Shackelford, D. D., Weisleder, D. (1990). A method of detection of fumonisin in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Mycologia* 82:698-702.

- Pöggeler, S. (2001). Mating-type for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:589-601.
- Ramírez, M. L., Pascale, M., Chulze, S., Reynoso, M. M., Visconti, A. (1996). Natural occurrence of fumonisins associated to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids grown in Argentina. *Mycopathologia* 135:29-34.
- Rayas, D. P., Mock, C. M., Satterlee, L. D. (1996). Quality of spaghetti containing buckwheat, amaranth, and lupin flours. *Cereal Chemistry.* 73:381-387.
- Reid, L. M., Nicol, R. W., Ouellet, T., Savard, M., Miller, J. D., Young, J. C., Stewart, D. W., Schaafsma, A. W. (1999). Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 89:1028-1037.
- Reid, L. M., Woldemariam, T., Zhu, X., Stewart, D. W., Schaafsma, A. W. (2002). Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. *Can. J. Plant Pathol.* 24:162-167.
- Reyes V., W. P. (2001). Detección del hongo *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de sus hidrolizados. Tesis Doctoral, Universidad de Guadalajara. Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México.
- Reynoso, M. M., Torres, A. M., Chulze, S. N. (2004). Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* complex isolated from maize. *Mycol. Res.* 108:154-160.
- Reynoso, M. M., Torres, A. M., Chulze, S. N. (2006). Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize kernels in Argentina. *Plant Pathol. J.* (en prensa).

- Reynoso, M. M., Torres, A., Ramírez, M., Rodríguez, M. I., Chulze, S., Magan, N. (2002). Efficacy of antioxidant mixtures on growth, fumonisin production and hydrolytic enzyme production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* in vitro on maize-based media. *Mycol. Res.* 106:1093-1099.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Van Schalwyk, D. J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Tanskei. *Phytopathology* 82:353-357.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., van Wyk, P. S. (1990). Fungal associations in corn kernels and effects on germination. *Phytopathology* 80:131-134.
- Reid, L. M., Woldemariam, T., Zhu, X., Stewart, D. W., Schaafsma, A. W. (2002). Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. *Can. J. Plant Pathol.* 24:162-167.
- Riley R. T., Norred W. P. (1999). Mycotoxins prevention and decontamination. Corn –a case study. Third Joint FAO/WHO/UNEP. International Conference on mycotoxins, Tunisia, 3-6 March 1999. p11.
- Ristaino, J. B., Thomas, W. (1997). Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps?. *Plant Dis.* 81:964.
- Ross, P. F. (1994). What are we going to do dead horses?. *J. AOAC Int.* 72(2):491-494.
- Ross, P. F., Nelson, P. E., Richard, J. L., Osweiler, G. D., Rice, L. G., Plattner, R. D., Wilson, T. M. (1990). Production of fumonisinas by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3225-3226.

- Ross P. F., Rice, L. G., Osweiler, G. D., Nelson, H. A., Richard, J. L., Wilson, T. M. (1992). A review and up-date of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. *Mycopathologia* 117:109-114.
- Ruíz, M. J. J., Ruíz, M. A., Zamora, J. F. (1999). The genus *Lupinus*: Taxonomy and distribution in Jalisco, México. p297-300. En: Lupin, and Ancient Crops for the New Millenium. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Lupins Conference. Editado por: E. van Santen, M., Wink, S., Weissman & P. Roemer. June 20-24. Klink/Müritz, Germany.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2003). <http://www.sagarpa.gob.mx>.
- Sánchez-Rangel, D., Sanjuán-Badillo, A., Plasencia, J. (2005). Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a Polymerase Chain Reaction to detected potencial toxicogenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53:8565-8571.
- Santana, F. M. C., Fíalo, A. M., Sa-Correia Y., Empis, J. M. A. (1999). Towards microbial degradation of quinolizidine alkaloids in *lupin*. En: Proc: VIII Inter. Lupin Conf., California. USA 11-16 May.
- Schmeller, T., Saurewein, M., Sporer, F., Muller, W. E., Wink, M. (1994). Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic receptor. *J. Nat. Prod.* 57:1316-1319.
- Scott P. M. (1993). Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.* 18:257-270.
- Scott, P., Trenholm, H., Sutton, M. (1985). Mycotoxins: a Canadian perspective. Ottawa. Nat. Res. Corencil NRCC/CNRC. pp. 185.
- Shelby, R. A. White, D. G., Bauske, E. M. (1994). Differential fumonisin production in maize hybrids. *Plant Dis.* 78:582-584.

- Shephard G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromat.* 13:2077-2080.
- Shephard, G. S., Thiel, P. G., Stokenstrom, S., Synderham, E. W. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.* 79:671-687.
- Shetty, P. H., Bhat, R. V. (1999). A physical method for segregation of fumonisin-contaminated maize. *Food Chem.* 66:371-374.
- Snyder, W. C., Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.* 27:64-67.
- Snyder, W. C., Hansen, H. N. (1941). The species concept in *Fusarium* with reference to Section *Martiella*. *Amer. J. Bot.* 28:738-742.
- Snyder, W. C., Hansen, H. N. (1945). The species concept in *Fusarium* with reference to Section *Discolor* and other sections. *Amer. J. Bot.* 32:657-666.
- Srobarova, A.; Moretti, A.; Ferracane, R.; Ritieni, A.; Logrieco, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in pre-harvest maize ear rot, and associated mycotoxins in Slovakia. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:299-306.
- Stobiecki, M., Markiewicz, M., Michalski, Z., Gulewicks, K. (1992). New concept of the bitter lupin seeds utilization. Proc. 1st European Conf. On Grain Legumes. Angers. France. 1-3 June.
- Sun, S. K., Snyder, W. C. (1981). The bakane disease of the rice plant. En: *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*; Nelson, P. E.; Toussoun, T. A.; Cook, R. J.; Eds.; Pennsylvania State University Press: University Park, P. A. pp 104-113.

- Sutton, J. C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4:195-209.
- Sydenham, E. W., Shepard, G. S., Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Peralta-Sanhueza, C. E., González, H. H. L., Resnik, S. (1993). Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *J. Agric. Food Chem.* 41:891-895.
- Takhtajan, A. (1987). *Systema magnoliophytorum*. Off. Eds Nauka. Leninopoli. Russia.
- Tequida M., M., Cortes R. M., Rosas, B. E. C., López, S. S., Corrales, M. C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysegenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoam Micol.* 19:84-88.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shepard, G. S., Gelderblom, W.C. A., Nieuwenhuis, J. J. (1991). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1089:1093.
- Thompson, D. P. (1991). Effect of butylated hydroxyanisole on conidial germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 54:375-377.
- Thompson, D. P. (1994). Minimum inhibitory concentrations of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (paraben) combinations against toxicogenic fungi. *J. Food Prot.* 57: 133-135.
- Thompson, D. P., Matervia, L., Vessel, T. (1993). Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *J. Food Prot.* 56:134-138.

- Torres, A. M., Ramírez, M. L., Arroyo, M., Chulze, S. N., Magan, N. (2003). Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *Intern J. Food Microb.* 83:319-324.
  
- Torres, A., Reynoso, M. M., Rojo, F., Ramírez, M. L., Chulze, S. (2001). Fungal and mycotoxin contamination in home grown maize harvested in the north area of Argentina. *Food. Addit. Contam.* 18:836-843.
  
- Velluti, A., Marin S., Bettucci L., Ramos, A. J., Sanchis V. (2000). The effect of fungal competition of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on fumonisin B1 and zearalenone formation. *Int. J. Food Microbiol.* 59:59-66.
  
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, V., Egido, J., Marin, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and pahharose essential oilson growth and fumonisin B production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 145-154.
  
- Vigier, B., Reid, L. M., Seifert, K. A., Stewart, D. W., Hamilton, R. I. (1997). Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Can. J. Plant Pathol.* 19:60-65.
  
- Vining, L. C. (1992). Role of secondary metabolites from microbes. En: *Secondary Metabolites: their Function and Evolution*. Editado por: Chadwick, D. J., Whelan, J. John Wiley: Chichester; pp 184-194.
  
- Visconti, A. (1996). Fumonisin in maize genotypes grown in various geographic areas. Editores: Jackson L. S., de Vries J. W., Bullerman L. B. En: *Fumonisin in food*. Editado por: Jackson, L. S., De Vries, J. W., Bellerman, L. B. Plenum Press. New York. pp. 193-204.

- Visconti, A., Doko, M. B. (1994). Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC. Int.* 77:546-550.
- Voss, K. A., Chamberlain, W. J., Bacon, C. W., Norred, W. P. (1993). A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B<sub>1</sub>. *Nat. Tox.* 1:222-228.
- Warfield C. Y., Gilchrist D. G. (1999). Influence of Kernel age on fumonisin B<sub>1</sub> production in corn by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2853-2856.
- Wilkinson, M. J., Hipwell, M., Ryan, T. & Cavanagh, A. H. M. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and Antifungal Activity. *J. Agric. And Food Chem.* 51:76-81.
- Wink M. (1993). Quinolizidine alkaloids. *Methods of plant biochem.* 8:197-239.
- Wittig de Penna, E., Bungler, A., Sansur, M., Lopez, L., Santana, R. (1993). Desarrollo de un confite hiperproteico a base de lupino para deportistas. *Rev. Chilena Nutr.* 21:53-61.
- Yun, S-H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C., Turgeon, B. G. (2000). Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 31:7-20.
- Zamora, C., Virgen, G., Bernal, A. A., Fausto, G. S., Ruiz L., M. A. (2002). Wild and Cultivated *Lupinus* from the Tropics to the Poles. Editado por: INE van Santen. 19 24 June International Ñupin Association. Canterbury, New Zeland.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. Medios de cultivos

**Nash-Snyder:** Peptona 15 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g; Agar 20 g; Pentacloronitrobenceno, 1 g; Agua destilada, 1000 mL.

Se ajusta el pH a 5.5-6.5 y se esteriliza en autoclave, se deja enfriar al medio a 50°C y se agregan 20 mL de sulfato de estreptomicina (Solución stock) y 12 mL de sulfato de neomicina (Solución stock) por litro.

Solución stock: 5 g de sulfato de estreptomicina en 1000 mL de agua destilada; 1 g de sulfato de neomicina en 1000 mL de agua destilada.

**Agar hojas de Clavel (AHC):** 15 g de agar ultra puro por cada 1000 mL de agua destilada. Esterilizar el medio durante 15 minutos a 121°C en autoclave. Se fracciona en placas de Petri de 6 cm de Ø; y se colocan las hojas de clavel estériles (3 - 4 hojas por placa).

**Agar Agua (AA):** Agar 15 g; Agua destilada, 1000 mL. Se esteriliza durante 15 minutos a 121°C en autoclave.

**Agar papa glucosado (APG):** Papas 250 g; Agar 20 g; Glucosa 20 g; Agua destilada 1000 mL.

Las papas con cáscara se lavan, se cortan en trozos, y se hidratan con 500 mL de agua destilada, se hierven en autoclave a vapor fluente durante 45 minutos. Por otro lado se esteriliza el agar en 500 mL de agua destilada. Se filtra el caldo con las papas a través de gasa y se adiciona el agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneiza para obtener un puré y la mitad de éste se adiciona al agar junto con la glucosa, luego se lleva a volumen con agua destilada (1000 mL). Se distribuye el medio en tubos de ensayos y se esteriliza por autoclave a  $\frac{3}{4}$  de atmósfera durante 20 minutos.

**Agar zanahoria:** 450 g de zanahorias lavadas y cortadas en trozos, se hierven en 400 mL de agua destilada en autoclave por 30 minutos. Luego se homogeneiza en licuadora hasta obtener un puré que se fracciona a razón de 100 mL en un frasco Erlenmeyer de 500 mL y se le adiciona 150 mL de agua destilada y 3.5 g de agar. El medio se esteriliza durante 15 min a 121° C y se fracciona en placas de Petri de 6 cm de Ø.

**ANEXO 2.** Análisis de varianza y Prueba de Tukey de la producción de FBs por cepas de *F. verticillioides* aisladas de diferentes híbridos de maíz.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P > 0.200$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.278$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
UGG 600	2	0	36.145	6.271	4.434
Lucero 901	12	0	36.768	12.587	3.634
Lucero 801	10	0	33.497	9.104	2.879
Lucero 807	5	0	52.468	19.034	8.512
Alsa 036 W	11	0	45.708	19.001	5.729
Lucero 808	8	0	35.708	12.390	4.381
Lince	12	0	36.554	16.391	4.732

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	6	1939.260	323.210	1.475	0.205
Error experimental	53	11617.576	219.200		
Total	59	13556.836			

Las diferencias entre los valores promedios de los grupos no son mayores para calcular la probabilidad de que la diferencia sea debida a una variabilidad del muestreo; no existen diferencias estadísticas ( $P = 0.205$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa  $0.050 = 0.175$

El valor crítico de la prueba realizada (0.175) es menor al valor crítico de 0.800.

**Nota:** los datos de producción de FBs se transformaron en *raíz cuadrada* (Sqrt)

**ANEXO 3.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25° C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.051$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.597$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Control	4	0	12.104	0.152	0.0759
Etanol 95%	4	0	11.795	0.0980	0.0490
BHA 0.5 mM	4	0	4.740	0.133	0.0667
BHA 1 mM	3	0	2.417	0.0715	0.0413

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	260.882	80.927	1236.046	<0.001
Error experimental	11	0.774	0.0703		
Total	14	261.555			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	p	q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	9.687	4	67.635	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	7.364	4	55.538	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.309	4	2.329	<0.001	No
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	7.055	4	53.210	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 1.0 mM	9.378	4	65.479	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	2.322	4	16.216	<0.001	Si

**ANEXO 4.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.97$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.072$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.253$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Control	4	0	7.733	0.178	0.0891
Etanol 95%	4	0	7.492	0.126	0.0629
BHA 0.5 mM	4	0	3.196	0.673	0.337
BHA 1 mM	4	0	1.728	0.157	0.0787

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	110.545	36.848	280.337	<0.001
Error experimental	12	1.577	0.131		
Total	15	112.123			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	P	q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	6.005	4	33.128	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	4.537	4	25.027	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.241	4	1.328	0.785	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	5.765	4	31.800	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	4.296	4	23.699	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	1.469	4	8.101	<0.001	Si



**ANEXO 6.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la fase lag de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.010$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.086$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Control	4	0	0.536	0.00505	0.00252
Etanol 95%	4	0	0.599	0.0103	0.00513
BHA 0.5 mM	4	0	1.173	0.0846	0.0423
BHA 1 mM	3	0	1.570	0.0295	0.0170

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	2.527	0.842	392.919	<0.001
Error experimental	11	0.0236	0.00214		
Total	14	2.550			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	p	q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	1.034	4	41.367	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	0.638	4	27.539	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.0629	4	2.717	0.275	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	0.971	4	38.851	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	0.575	4	24.822	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	0.397	4	15.871	<0.001	Si

**Nota:** los datos se transformaron en raíz cuadrada (Sqrt)

**ANEXO 7.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.97$ ) sobre la fase lag de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.036$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.348$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
log10-Control	4	0	-0.423	0.0450	0.0225
log10-Etanol 95%	4	0	-0.313	0.0135	0.00675
log10-BHA 0.5 mM	4	0	0.0281	0.0843	0.0421
log10-BHA 1 mM	3	0	0.448	0.00931	0.00465

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	1.848	0.616	262.262	<0.001
Error experimental	11	0.0282	0.00235		
Total	14	1.876			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	P	q	P	P<0.050
log10-Control vs. log10-BHA 1 mM	0.872	4	35.972	<0.001	Si
log10-Control vs. log10-BHA 0.5 mM	0.451	4	18.628	<0.001	Si
log10-Control vs. log10-Etanol 95%	0.111	4	4.561	0.032	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	0.761	4	31.411	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	0.341	4	14.067	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	0.420	4	17.344	<0.001	Si

**Nota:** los datos se transformaron en raíz cuadrada (Sqrt)

**ANEXO 8.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $\alpha_w = 0.955$ ) sobre la fase lag de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.166$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.033$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Control	4	0	0.448	0.0800	0.0400
Etanol 95%	4	0	0.634	0.0356	0.0178
BHA 0.5 mM	4	0	1.157	0.0700	0.0350
BHA 1 mM	4	0	3.719	0.250	0.125

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	27.581	9.194	490.493	<0.001
Error experimental	12	0.225	0.0187		
Total	15	27.806			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	P	Q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	3.271	4	47.777	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	0.709	4	10.363	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.186	4	2.719	0.270	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	3.084	4	45.058	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	0.523	4	7.643	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	2.561	4	37.414	<0.001	Si

**ANEXO 9.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la producción de fumonisinas de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.020$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.332$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Sqrt-Control	4	0	5.394	0.326	0.163
Sqrt-Etanol 95%	4	0	5.432	0.467	0.234
Sqrt-BHA 0.5 mM	4	0	2.606	0.0915	0.0458
Sqrt-BHA 1 mM	3	0	2.334	0.0780	0.0390

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	34.802	11.601	136.925	<0.001
Error experimental	12	1.017	0.0847		
Total	15	35.819			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	p	q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	3.060	4	21.029	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	2.788	4	19.154	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.0384	4	0.264	0.998	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	3.099	4	21.293	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	2.826	4	19.418	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	0.273	4	1.875	0.565	No

**Nota:** los datos se transformaron en *raíz cuadrada* (Sqrt)

**ANEXO 10.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.97$ ) sobre la producción de fumonisinas de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.069$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.586$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Sqrt-Control	4	0	3.148	0.238	0.119
Sqrt-Etanol 95%	4	0	3.187	0.165	0.0824
Sqrt-BHA 0.5 mM	4	0	2.156	0.0134	0.00669
Sqrt-BHA 1 mM	3	0	1.680	0.0657	0.0329

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	6.698	2.233	101.161	<0.001
Error experimental	12	0.265	0.0221		
Total	15	6.963			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con  $\alpha = 0.050$ : 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparison	Dif. Medias	p	q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	1.468	4	19.761	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	0.991	4	13.345	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.0390	4	0.525	0.982	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	1.507	4	20.286	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	1.030	4	13.870	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	0.477	4	6.416	0.003	Si

**Nota:** los datos se transformaron en raíz cuadrada (Sqrt)

**ANEXO 11.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w = 0.955$ ) sobre la producción de fumonisinas de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25°C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P > 0.200$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.871$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Control	4	0	5.600	0.216	0.108
Etanol 95%	4	0	5.525	0.222	0.111
BHA 0.5 mM	4	0	3.875	0.126	0.0629
BHA 1 mM	3	0	2.150	0.300	0.150

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	3	31.973	10.658	211.388	<0.001
Error experimental	12	0.605	0.0504		
Total	15	32.578			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparación	Dif. Medias	p	Q	P	P<0.050
Control vs. BHA 1 mM	3.450	4	30.730	<0.001	Si
Control vs. BHA 0.5 mM	1.725	4	15.365	<0.001	Si
Control vs. Etanol 95%	0.0750	4	0.668	0.964	No
Etanol 95% vs. BHA 1 mM	3.375	4	30.062	<0.001	Si
Etanol 95% vs. BHA 0.5 mM	1.650	4	14.697	<0.001	Si
BHA 0.5 mM vs. BHA 1 mM	1.725	4	15.365	<0.001	Si

**ANEXO 12.** Análisis de varianza y test de Tukey del efecto del extracto de alcaloides de *Lupinus exaltatus* y la actividad de agua ( $a_w = 0.995$ ) sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *Fusarium verticillioides* UDG 271 cultivada en agar harina de maíz a 25° C.

Prueba de Normalidad: Aceptado ( $P = 0.440$ )

Prueba de Equivalencia de Varianza: Aceptado ( $P = 0.884$ )

Nombre del Grupo	n	Perdido	Promedio	Desviación Estandar	Error estandar de la media
Control	3	0	11.974	0.311	0.180
Lupinus 1 mg/ml	3	0	11.532	0.185	0.107
Lupinus 5 mg/ml	3	0	9.761	0.157	0.0905
Lupinus 10 mg/ml	3	0	7.192	0.251	0.145
Lupinus 20 mg/ml	3	0	4.243	0.309	0.179

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medias	F calculada	Probabilidad
Entre grupos	4	125.163	31.291	497.369	<0.001
Error experimental	10	0.629	0.0629		
Total	14	125.792			

Las diferencias entre los valores promedio de los grupos tratados son mayores esperados; existe diferencia estadística significativa ( $P = <0.001$ ).

El valor crítico para la prueba realizada con alfa = 0.050: 1.000

**Procedimiento de Comparación entre pares de medias (Prueba de Tukey):**

Comparison	Dif. Medias	p	q	P	P<0.050
Control vs. Lupinus 20 mg/ml	7.732		53.391	<0.001	Si
Control vs. Lupinus 10 mg/ml	4.782	5	33.025	<0.001	Si
Control vs. Lupinus 5 mg/ml	2.213	5	15.285	<0.001	Si
Control vs. Lupinus 1 mg/ml	0.442	5	3.055	0.269	No
Lupinus 1 mg/ml vs. Lupinus 20 mg/ml	7.289	5	50.337	<0.001	Si
Lupinus 1 mg/ml vs. Lupinus 10 mg/ml	4.340	5	29.970	<0.001	Si

Lupinus 1 mg/ml vs. Lupinus 5 mg/ml	1.771	5	12.230	<0.001	Si
Lupinus 5 mg/ml vs. Lupinus 20 mg/ml	5.518	5	38.106	<0.001	Si
Lupinus 5 mg/ml vs. Lupinus 10 mg/ml	2.569	5	17.740	<0.001	Si
Lupinus 10 mg/ml vs. Lupinus 20 mg/ml	2.949	5	20.367	<0.001	Si

---