

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MICROBIÓLOGA**

**Evaluación de la producción de fumonisinas en *Fusarium proliferatum* en  
respuesta a dosis sub inhibitorias de fungicida (iprodiona)**

**GABRIELA ESTEFANÍA ANASI CASTILLO**

**DIRECTORA: Mtr. Jeniffer Yánez Altuna**

**QUITO, 2016**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, GABRIELA ESTEFANÍA ANASI CASTILLO, C.I. 171699932-9, autora del trabajo de graduación intitulado: EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FUMONISINAS EN *Fusarium proliferatum* EN RESPUESTA A DOSIS SUB INHIBITORIAS DE FUNGICIDA, previo a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

GABRIELA ESTEFANÍA ANASI CASTILLO

C.I. 171699932-9

## DEDICATORIA

A mi abuelita Bertha, que ha sido mi segunda madre, mi motor y mi inspiración para seguir adelante, siempre con los pies sobre la tierra y con humildad.

A mis padres, Bécker y Verónica, gracias por su apoyo económico y moral. Por inculcar en mí los valores que ahora fundamentan mi diario vivir, por hacerme entender que la vida no es fácil, pero al final del camino todas las pruebas que atravesamos nos preparan para la vida y nos dejan una lección.

A mis hermanos, José y Andrés, que han sido mis cómplices, mis mejores amigos y me han apoyado incondicionalmente. Hemos vivido momentos difíciles, pero juntos hemos salido adelante siempre.

A mis tíos, especialmente a Lorena, Byron, Claudio y Rocío, que me han dado su respaldo sin importar la circunstancia en la que me encuentre. Gracias por caminar junto a mí en este trayecto, por toda la motivación y la ayuda brindada.

A mi abuelito que me ha dado su ejemplo de trabajo duro, constancia y dedicación.

A mis mejores amigas: Michelle, Daniela y Sharon, que me han acompañado en mis mejores y peores momentos durante todos estos años de amistad. Gracias por su lealtad y cariño.

## AGRADECIMIENTOS

La culminación de este arduo pero satisfactorio camino no hubiese sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones.

En primer lugar quiero agradecer infinitamente a mis padres, abuelitos, hermanos, tíos y primos. Por caminar a mi lado en cada uno de mis logros cosechados, y sobre todo por demostrarme que el amor y el apoyo de la familia no pueden ser reemplazados con nada. Sin ustedes este logro no hubiese sido alcanzado.

A Jeniffer Yáñez Mtr., por dirigirme en este trabajo de investigación, por confiar en mí al enviarme a hacer mi trabajo de tesis en Oklahoma State University (OSU), por su apoyo constante a lo largo de toda mi carrera universitaria, por ser una gran maestra y amiga.

A Carla Garzón Ph. D., por estar ahí no solo cuando necesité ayuda en mis experimentos, sino también cuando necesité apoyo moral. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo, y también por esos sabios consejos.

A OSU por abrirme las puertas y por financiar esta investigación. De esta institución me llevo enseñanzas invaluable.

A Mary Gard M. Sc., por trabajar conmigo durante los tres meses de mi estadía en OSU, por siempre confiar en mí, por enseñarme nuevas técnicas, por poner alegría en las largas horas de trabajo en el laboratorio y por convertirse en una gran amiga.

A Stephen Marek Ph. D., por ser de gran apoyo en la parte experimental de este trabajo, y por siempre estar abierto a resolver cualquiera de mis dudas.

Quiero agradecer en especial a Francisco Flores Ph. D., pues su apoyo fue fundamental para concluir los análisis estadísticos del presente trabajo. También a Sumit Pradhan, Andrés Espíndola, Patty Acurio, Fernanda Proaño, Gabriela Orquera y a todas las personas que conocí en la Facultad de Fitopatología de la OSU, por su amistad, entrenamiento y asistencia siempre que necesité ayuda en la realización de esta tesis.

Por último pero no menos importante, quiero agradecer a la PUCE y a mis profesores por enseñarme lo maravilloso que es el mundo de la Microbiología.

¡Mil Gracias!

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xii
RESUMEN .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	5
1.1.1. Objetivo general .....	5
1.1.2. Objetivos específicos .....	5
CAPÍTULO II.....	6
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. Antecedentes .....	6
2.2. Producción agrícola de cebolla .....	7
2.3. Patógenos en el cultivo de cebolla .....	7
2.3.1. <i>Fusarium</i> spp en cebolla.....	8
2.4. <i>Fusarium proliferatum</i> .....	9
2.4.1. Micotoxinas producidas por el género <i>Fusarium</i> .....	11
2.4.1.1. Fumonisinias .....	11
2.5. Control de enfermedades provocadas por <i>Fusarium proliferatum</i> .....	12
2.5.1. Iprodiona.....	13
2.6. Uso inadecuado de fungicidas .....	13
2.7. Hormesis .....	14
2.7.1. Hormesis en hongos .....	15

CAPÍTULO III .....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1. Tipo de Estudio .....	17
3.2. Antecedentes .....	17
3.3. Diseño del Experimento.....	18
3.4. Equipos y Materiales .....	19
3.5. Técnicas empleadas .....	19
3.5.1. Elección y activación de cepas de <i>Fusarium proliferatum</i> .....	19
3.5.2. Ensayo de crecimiento radial (Pradhan, 2015).....	20
3.5.2.1. Preparación de las dosis de iprodiona (Pradhan, 2015, comunicación personal)	20
3.5.2.2. Adición de las dosis de fungicida al medio de cultivo PDA (Pradhan, 2015, comunicación personal).....	22
3.5.2.3. Inoculación de las cepas A1 y A7 en las cajas de Petri (Pradhan, 2015, comunicación personal).....	22
3.5.2.4. Medición del área de crecimiento radial (Pradhan, 2015, comunicación personal)	24
3.5.3. Ensayo de inducción y cuantificación de fumonisinas .....	24
3.5.3.1. Preparación del material.....	24
3.5.3.2. Preparación de las dosis de iprodiona .....	24
3.5.3.3. Adición de las dosis de fungicida al maíz partido.....	25
3.5.3.4. Preparación de la suspensión de esporas.....	25
3.5.3.5. Adición de la suspensión de esporas al maíz partido .....	26
3.5.3.6. Envío de muestras .....	27
3.5.4. Análisis estadístico .....	28
3.5.4.1. Análisis hormético.....	28
3.5.4.2. T de Student .....	29

3.5.4.3.	ANOVA .....	30
CAPÍTULO IV .....		31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1.	Medición del crecimiento radial .....	31
4.1.1.	Aislado A1 .....	31
4.1.2.	Aislado A7 .....	35
4.2.	Cuantificación de fumonisinas.....	38
4.2.1.	Aislado A1 .....	38
4.2.2.	Aislado A7 .....	40
4.3.	Análisis estadístico .....	43
4.3.1.	Análisis hormético .....	43
4.3.1.1.	Ensayo de crecimiento radial .....	43
4.3.1.1.1.	Aislado A1 .....	43
4.3.1.1.2.	Aislado A7 .....	45
4.3.1.2.	Ensayo de cuantificación de fumonisinas .....	47
4.3.1.2.1.	Aislado A1 .....	47
4.3.1.2.2.	Aislado A7 .....	47
4.3.2.	T de Student.....	50
4.3.3.	ANOVA.....	53
CONCLUSIONES.....		56
RECOMENDACIONES .....		58
REFERENCIAS .....		59
ANEXOS .....		71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología macroscópica de <i>F. proliferatum</i> . Micelio aéreo (izquierda), reverso de la colonia (derecha). .....	10
<b>Figura 2.</b> Aislamiento de <i>F. proliferatum</i> y cuantificación de fumonisinas: (A) cebolla comercial infectada, (B) capas de cebolla de donde se aisló a <i>F. proliferatum</i> , (C) maíz, y mezcla sorgo - avena inoculados con <i>F. proliferatum</i> (Gard, 2014). .....	18
<b>Figura 3.</b> Cultivos jóvenes de las cepas A1 (izquierda) y A7 (derecha) en medio PDA. ....	19
<b>Figura 4.</b> Dosis de iprodiona en frascos Erlenmeyer cubiertos con papel aluminio sobre un agitador magnético. ....	21
<b>Figura 5.</b> Cultivos de <i>F. proliferatum</i> de siete días de edad, cepas A7 (izquierda) y A1 (derecha) .....	23
<b>Figura 6.</b> Cepa A1 de <i>Fusarium proliferatum</i> expuesta por triplicado a siete dosis de fungicida (A, B, C, D, E, F, G de izquierda a derecha) y un control.....	23
<b>Figura 7.</b> Cepa A7 de <i>Fusarium proliferatum</i> expuesta por triplicado a siete dosis de fungicida (A, B, C, D, E, F, G de izquierda a derecha) y un control.....	23
<b>Figura 8.</b> Dosis de iprodiona utilizadas en el ensayo de producción de fumonisinas. ...	25
<b>Figura 9.</b> Maíz, dos días tras la inoculación. ....	26

<b>Figura 10.</b> Muestras almacenadas en tubos Falcon después de tres días de inoculación con la cepa A7 (izquierda) y A1 (derecha).....	26
<b>Figura 11.</b> Muestras almacenadas en tubos Falcon después de seis días de inoculación con la cepa A7 (izquierda) y A1 (derecha).....	27
<b>Figura 12.</b> Muestras en proceso de liofilización.....	27
<b>Figura 13.</b> Ecuación del modelo de regresión no-linear. Brain y Cousens, 1989, citado por Schabenberger, Tharp, Kells y Penner, 1999. ....	28
<b>Figura 14.</b> Crecimiento radial <i>in vitro</i> del aislado A1 en agar PDA modificado con iprodiona (expresado en porcentajes respecto al control). ....	34
<b>Figura 15.</b> Comparación entre el método de medición del área de crecimiento radial en el presente estudio (A) frente al de Flores y Garzón, (2013) (B). ....	35
<b>Figura 16.</b> Crecimiento radial <i>in vitro</i> del aislado A7 en agar PDA modificado con iprodiona (expresado en porcentajes respecto al control). ....	38
<b>Figura 17.</b> Curva dosis-respuesta del aislado A1. ....	43
<b>Figura 18.</b> Curva dosis-respuesta del aislado A7. ....	47
<b>Figura 19.</b> Distribución de la respuesta (%) en términos de producción de FB1 en relación con el control frente a las dosis de fungicida evaluadas en el aislado A7.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones de las dosis de iprodiona (ppm) utilizadas en el ensayo de crecimiento radial. Pradhan, 2015, comunicación personal. ....	20
<b>Tabla 2.</b> Volúmenes de agua y fungicida añadidos para obtener las dosis de iprodiona usadas en este estudio. Pradhan, 2015, comunicación personal. ....	21
<b>Tabla 3.</b> Medidas (cm <sup>2</sup> ) del área de crecimiento radial in vitro del aislado A1 en agar PDA modificado con iprodiona, obtenidas al tercer y sexto día con el software KLONK image measurement® (KLONK, Ringsted, Denmark). ....	32
<b>Tabla 4.</b> Porcentajes de incremento o disminución del crecimiento radial in vitro del aislado A1 en agar PDA modificado con iprodiona en comparación con el control.....	33
<b>Tabla 5.</b> Medidas (cm <sup>2</sup> ) del área de crecimiento radial in vitro del aislado A7 en agar PDA modificado con iprodiona, obtenidas al tercer y sexto día con el software KLONK image measurement® (KLONK, Ringsted, Denmark). ....	36
<b>Tabla 6.</b> Porcentajes de incremento o disminución del crecimiento radial in vitro del aislado A7 en agar PDA modificado con iprodiona en comparación con el control.....	37
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de fumonisinas B1 (ppm) del aislado A1 mediante el método HPLC realizado en la Universidad de Arkansas. Bluhm, 2015. ....	39
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de fumonisinas B1 (ppm) en el aislado A7 mediante el método HPLC realizado en la Universidad de Arkansas. Bluhm, 2015. ....	41

<b>Tabla 9.</b> Porcentajes de incremento o disminución de fumonisinas B1 (ppm), en comparación con el control, del aislado A7 evaluado a una dosis recomendada (A) y 3 dosis sub inhibitorias (E, F, G) de iprodiona.....	42
<b>Tabla 10.</b> Parámetros horméticos resultantes del crecimiento radial en el aislado A1..	44
<b>Tabla 11.</b> Parámetros horméticos resultantes del crecimiento radial en el aislado A7..	46
<b>Tabla 12.</b> Parámetros horméticos resultantes de la cuantificación de FB1 en el aislado A7. ....	49
<b>Tabla 13.</b> Prueba T de Student para el área de crecimiento radial del aislado A1. ....	51
<b>Tabla 14.</b> Prueba de ANOVA para el ensayo de crecimiento radial del aislado A7. Comparaciones entre los tratamientos C, D, E, F, G y Control. ....	53
<b>Tabla 15.</b> Prueba de ANOVA para el ensayo de cuantificación de FB1 del aislado A7. Comparaciones entre los tratamientos E, F, G y Control. ....	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Identificación molecular de las especies de <i>Fusarium</i> encontradas en las cebollas comerciales adquiridas en el 2014. Gard, 2014.....	71
<b>Anexo 2.</b> PCRs de los aislados de <i>F. proliferatum</i> con sus primers específicos PRO1-PRO2; Marcador molecular 100bp; Columnas 1, 3, 4, 7 identificadas como <i>F. proliferatum</i> y columnas 2, 5, 6, 8, 12 identificadas como <i>F. oxysporum</i> . Gard, 2014. 72	72
<b>Anexo 3.</b> Niveles de fumonisinas cuantificadas mediante HPLC en medios de cultivo de maíz partido y una mezcla 50:50 de sorgo y avena, luego de dos semanas de inoculación con aislados de <i>F. proliferatum</i> obtenidos de cebollas comerciales. Gard, 2014. ....	72
<b>Anexo 4.</b> Lista de materiales y métodos utilizados en la presente investigación.....	73
<b>Anexo 5.</b> Fórmula y método de preparación del agar PDA (Agar Papa Dextrosa). Neogen Corp., 2011. ....	75
<b>Anexo 6.</b> Placas Petri con los aislados de <i>F. proliferatum</i> A1 (A) y A7 (B) en agar PDA, luego de tres días de inoculación.....	75
<b>Anexo 7.</b> Maíz partido autoclavado listo para ser inoculado con las cepas A1 (A) y A7 (B).....	76
<b>Anexo 8.</b> Maíz luego de 3 (A) y 6 días (B) de inoculación con la cepa A1.....	76
<b>Anexo 9.</b> Maíz partido luego de 3 (A) y 6 días (B) de inoculación con la cepa A7. ....	77

<b>Anexo 10.</b> Código de programación en SAS® 9.3 para realizar el análisis hormético según el modelo Brain-Counsens. Modificado de Schabenberger, Tharp, Kells, y Penner, 1999. ....	77
<b>Anexo 11.</b> Código de programación en SAS® 9.3 para el análisis estadístico T de Student. Schabenberger, Tharp, Kells, y Penner, 1999. ....	79
<b>Anexo 12.</b> Protocolo de cuantificación de fumonisinas por HPLC. (Tomado textualmente de Velásquez, s.f., p. 24).....	80

## RESUMEN

Se ha demostrado que varios hongos fitopatógenos presentes en cultivos de importancia económica a nivel mundial experimentan un fenómeno hormético, es decir una estimulación metabólica en lugar de una inhibición cuando éstos son expuestos a dosis sub inhibitorias de fungicidas. Esto representa un problema al momento de manejar efectivamente las enfermedades producidas por estos hongos. *Fusarium proliferatum* es un hongo fitopatógeno que provoca daño a nivel agrícola y de salud humana, no obstante, existen insuficientes estudios que indiquen que *F. proliferatum* experimenta fenómenos horméticos. Por todo lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo principal: evaluar el efecto de dosis sub inhibitorias de iprodiona en *F. proliferatum in vitro*.

Se experimentó con dos aislados de *F. proliferatum* resistentes a la molécula química iprodiona (A7, altamente productor de fumonisina y A1, no productor de fumonisina). Siete dosis del fungicida fueron utilizadas para modificar el medio de cultivo PDA y así evaluar dos aislados del hongo en términos de área de crecimiento radial, mientras que cuatro dosis del mismo fungicida fueron utilizadas para modificar un medio de cultivo a base de maíz partido y evaluar en éste los dos aislados del hongo en términos de producción de fumonisina.

Una concentración de 0.40 ppm de iprodiona causó una estimulación máxima del 7% del crecimiento radial en el aislado A1, de manera que los análisis horméticos permitieron modelar una curva bifásica. Si bien una dosis sub inhibitoria menor exhibió un incremento del 13%, una respuesta hormética bajo dicha dosis no fue estadísticamente demostrable.

Aunque en el aislado A7 se notó una estimulación de un 10% del crecimiento micelial a una dosis de 0.12712 ppm, y un 16% de incremento en la producción de fumonisina provocado por una dosis de 0,012712 ppm, los datos no fueron estadísticamente verificables, de manera que fueron representados por una curva no-hormética.

Este es el primer estudio en donde se demuestra que las dosis sub inhibitorias de iprodiona provocan un fenómeno hormético en el crecimiento radial de *F. proliferatum*. A futuro se debería considerar estos hallazgos, para realizar un manejo más efectivo de los cultivos afectados por *F. proliferatum*.

## ABSTRACT

It has been shown that several phytopathogenic fungi that are present in crops of economic importance worldwide experience a hormetic phenomenon, i.e., a metabolic stimulation rather than inhibition when they are exposed to sub inhibitory doses of fungicide, which is a problem for the effective management of diseases, caused by these fungi. *Fusarium proliferatum* is a plant pathogen that causes damage to both agriculture and human health. However, there are insufficient studies that indicate that *F. proliferatum* experience a hormetic phenomenon. For all the above, the present study has as its main objective: to evaluate the effect of sub inhibitory dose of iprodione in *F. proliferatum in vitro*.

Experiments were made with two isolates of *F. proliferatum* resistant to the chemical molecule iprodione (A7, high producer of fumonisin and A1, a not fumonisin producer). Seven doses of the fungicide were used to modify the culture medium PDA and evaluate the two isolates of the fungus in terms of area of radial growth, while four doses of the same fungicide were used to modify a culture medium based on cracked corn and analyze the two isolates of the fungus in terms of fumonisin production.

A concentration of 0.40 ppm of iprodione caused a maximal stimulation of 7% of the radial growth in the isolate A1, allowing the hormetic analysis by a biphasic curve. While a smaller sub inhibitory dose exhibited an increase of 13%, whose hormetic response was not statistically demonstrable.

Although a 10% stimulation of mycelial growth at a dose of 0.12712 ppm was noted in the isolate A7; and the production of fumonisin increased by 16% with a dose of 0.012712 ppm, results were not statistically significant: they were represented by a non-hormetic curve.

This is the first study which shows that the sub inhibitory doses of iprodione cause a hormetic phenomenon in the radial growth of *F. proliferatum*. In future studies, these findings should be considered in order to make more effective management of crops affected by *F. proliferatum*.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

Algunas especies de *Fusarium* sección Liseola, en particular *F. verticillioides* (población de apareamiento A) y *F. proliferatum* (población de apareamiento D), producen cantidades significativas de fumonisinas (FBs), endotoxinas que tienen implicaciones de salud en animales y humanos (Abarca, Bragulat, Castellá, Accensi y Cabañes, 2000; Aoki, O'Donnell y Geiser, 2014; Falcão et al., 2010; Marin et al., 2013; Reinoso, Figueroa, Castro, González y Reyes, 2005; Rheeder, Marasas y Vismer, 2002). Hasta el momento se han identificado varios tipos de FBs, pero los grupos de mayor importancia en la naturaleza, en términos de contaminación son FB y FC. Dentro del grupo FB, la FB<sub>1</sub> es la más prevalente en cultivos de maíz: representa alrededor del 70% de todas las fumonisinas aisladas *in vivo* e *in vitro* (Branham y Plattner, 1993). Además es la más tóxica: ha sido catalogada dentro del grupo 2B de toxinas carcinogénicas por la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC por sus siglas en inglés) (Abarca et al., 2000).

Los cultivos afectados por *F. proliferatum*, a más de ser una potencial fuente de intoxicación por micotoxinas, indiscutiblemente provocan pérdidas económicas elevadas (Amarasinghe, Tamburic-Ilincic, Gilbert, Brule-Babel y Dilantha, 2013; Stumpf et al., 2013). De ahí la importancia de realizar una vigilancia alimentaria previa a la comercialización de los productos afectados, que comprenden 75 especies de plantas diferentes entre las que se puede mencionar: cebolla, ajo, maíz, espárragos, distintos cereales y subproductos de los mismos, para así evitar posibles micotoxicosis, debido a su gran patogenicidad en humanos y animales como porcinos, equinos y aves de corral (Munkvold y Desjardins, 1997; Proctor, Desjardins y Moretti, 2010; Stankovic, Levic, Petrovic, Logrieco y Moretti, 2007).

Ciertos fungicidas aplicados a distintas concentraciones son capaces de inhibir el crecimiento de varias especies del género *Fusarium*, incluyendo a *F. proliferatum*. Además, es factible inhibir la producción de fumonisinas con el uso de fungicidas a dosis recomendadas (Coma, Portes, Gardrat, Richard-Forget y Castellan, 2011; Pinto, 2003). El problema se da cuando los agricultores utilizan dosis menores a las recomendadas para

ahorrar costos de producción, a las cuales se referirá en adelante como dosis sub inhibitorias.

En los estudios publicados hasta el momento no está clara la relación existente entre las dosis sub inhibitorias de los fungicidas con la producción de fumonisinas. Sin embargo, Marín, de Ory, Cruz, Magan y González-Jaén (2013) en su estudio señalan, por primera vez, la importancia de utilizar las dosis adecuadas de fungicidas y evaluarlas junto con factores ambientales como temperatura y estrés hídrico. Manipulando dichos factores se puede lograr una buena inhibición de crecimiento del hongo y se puede reducir la expresión del gen FUM1, responsable de la producción de fumonisina en las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Marín et al., 2013).

Por otro lado, existen factores que alteran la homeostasis del hongo a dosis altas de fungicidas, pero a dosis bajas producen respuestas adaptativas y una consecutiva estimulación del metabolismo del hongo, proceso conocido como hormesis (Garzón et al., 2011; Zhou, Liang, Di, You y Zhu, 2014). Sin embargo, el efecto hormético que producen las dosis de fungicida dependerán de las cepas, ya que una dosis de fungicida apropiada para una cepa sensible de cierta especie puede resultar sub inhibitoria para una cepa resistente de la misma especie, con la consecuente producción de micotoxina (Zhou et al., 2014). Estos problemas que se han dado con el uso de dosis sub inhibitorias no han sido tomados en cuenta ni estudiados sino solo hasta hace pocos años.

Existen pocos estudios que indiquen cómo ciertos fungicidas influyen a la producción de micotoxinas, en especial fumonisinas. Por esto, surge la necesidad de conocer el papel que tienen las dosis sub inhibitorias de fungicidas en la inhibición del crecimiento y metabolismo del fitopatógeno. Para esto, la alternativa es evaluar distintas dosis sub inhibitorias de fungicida y su capacidad para reducir o aumentar los niveles de fumonisinas producidas por *F. proliferatum* ya que las dosis y su efecto varían significativamente de un fungicida a otro (Coma et al., 2011; Etcheverry, Torres, Ramirez, Chulze, y Magan, 2001; Pinto, 2003) y de una cepa a otra (Zhou et al., 2014).

Las dosis a las que se aplican los fungicidas juegan un papel muy importante dentro del control de estos microorganismos. Así lo menciona Falcão et al., (2010). Lo ideal es utilizar dosis para inhibir el crecimiento del hongo a un 50 y 90% ( $EC_{50}$  y  $EC_{90}$ ) en periodos cortos de tiempo. Así se reduce al máximo la producción de fumonisinas y se puede comercializar productos que no sobrepasen las dosis permitidas establecidas por la

Unión Europea ni perjudiquen al medio ambiente y a la salud (Marín et al., 2013). Por ello, es fundamental dar a conocer el impacto que tienen las dosis de fungicidas a diferentes concentraciones en el metabolismo de *F. proliferatum*. Además, tomando en consideración, las resistencias que se sabe que poseen algunas especies de *Fusarium* a distintos fungicidas, una dosis sub inhibitoria podría provocar un aumento en la producción de micotoxinas en lugar de una disminución (Falcão et al., 2010; Flores y Garzón, 2013).

Los cultivos de cebolla, espárragos, ajo, maíz y otros cereales que son colonizados por *F. proliferatum* contienen fumonisinas, que son toxinas que causan problemas graves de salud a más de problemas económicos debido a la baja producción que generan los cultivos afectados. Los problemas de salud están relacionados al consumo de este producto contaminado, ya que tanto animales como humanos corren el riesgo de sufrir intoxicaciones y muerte (Munkvold y Desjardins, 1997). Algunos autores señalan que *F. proliferatum* es capaz de infectar a sus hospederos sin causar ninguna sintomatología visible, fenómeno que he sido capaz de observar por experiencia propia, haciendo imposible para el consumidor distinguir entre alimentos infectados o no por *F. proliferatum* y así evitar el consumo de los mismos (Jeney, Béki, Keszthelyi, Leslie y Hornok, 2007; Kwon, Dohlen y Anderson, 2001; Tsavkelovaa, Bömkea, Netrusovb, Weinerc y Tudzynski, 2008).

Debido a lo indicado anteriormente, la presente investigación busca determinar la relación existente entre las dosis sub inhibitorias de los fungicidas y la producción de fumonisinas por parte del hongo *F. proliferatum*, para así enfatizar la importancia de escoger la dosis de fungicida apropiado al momento de manejar cultivos susceptibles a ser invadidos por *F. proliferatum* y a su vez evitar el uso de dosis sub inhibitorias que se ha comprobado promueven cambios en el metabolismo de varios hongos y estimulan la producción de toxinas. Consecuentemente, este estudio tendrá un efecto positivo al momento de elegir un tratamiento efectivo para el manejo de enfermedades provocadas por *F. proliferatum* y se podría reducir a largo plazo los problemas de salud y problemas económicos producidos a causa de estas micotoxinas.

Recientemente han aparecido estudios que mencionan a la hormesis y sus implicaciones en el manejo de fitopatologías. Sin embargo, hay muy pocos estudios que se enfoquen en el hongo fitopatógeno *Fusarium proliferatum* y el posible fenómeno hormético que éste sufre cuando se lo expone a dosis sub inhibitorias de fungicidas. Por ese motivo se

considera al presente estudio como la base para futuros estudios con *F. proliferatum*, ya que servirá para evaluar su comportamiento frente a dosis sub inhibitorias de fungicidas en términos de producción de micotoxinas y cómo estas dosis deben ser tomadas en cuenta para la elección de un tratamiento efectivo y seguro.

Frente a lo expuesto, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué efecto tienen las dosis sub inhibitorias del fungicida iprodiona en la producción de fumonisinas por parte de *Fusarium proliferatum*? Y la siguiente hipótesis: Existe una estimulación en la producción de fumonisinas en *Fusarium proliferatum* cuando se utilizan dosis sub inhibitorias de iprodiona.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

- Evaluar el efecto de dosis sub inhibitorias de iprodiona en *Fusarium proliferatum in vitro*.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Medir el área de crecimiento radial de *Fusarium proliferatum* en medio PDA modificado con dosis sub inhibitorias de iprodiona.
- Inducir y cuantificar la producción de fumonisinas en maíz partido modificado con dosis sub inhibitorias de iprodiona.
- Verificar la existencia de un fenómeno hormético mediante el modelado de la curva dosis-respuesta.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

Los estudios referentes a hormesis en hongos fitopatógenos son relativamente escasos. Sin embargo, existen investigaciones en las que ya se menciona hace mucho tiempo atrás que las dosis sub inhibitorias de fungicidas pueden estimular la producción de micotoxinas. Por ejemplo, en el estudio de Al-Hilli y Smith (1979) se llegó a la conclusión de que dosis subletales de ácido propiónico aplicadas en el hongo fitopatógeno *Aspergillus flavus* no detienen la producción de aflatoxinas; por el contrario, la estimulan. En la actualidad, se puede mencionar dentro de estos estudios al de Falcao et al. (2010), donde evaluaron la producción de fumonisinas bajo el efecto de fungicidas y la inhibición *in vitro* de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium verticillioides*, concluyendo que los fungicidas quintozeno y fludioxonil + metalaxil-M aplicados a dosis sub inhibitorias, en ocasiones, aumentan los niveles medios de FB1 en comparación con el control. También se ha observado que la síntesis de fumonisinas (en términos de expresión del gen FUM1) y la tasa de crecimiento de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* se ven aumentadas cuando se aplican dosis sub inhibitorias de tebuconazol y éstas se combinan con estrés hídrico moderado y temperaturas menores a 35°C (Marín et al., 2013). En un estudio más reciente de Zhou et al. (2014) evaluaron al fungicida dimethachlon para determinar el efecto que tienen las dosis sub inhibitorias del mismo en el crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* y la virulencia en las plantas de colza (planta huésped de *S. sclerotiorum*). Los resultados mostraron que tanto los aislamientos del hongo resistentes como de algunos sensibles a este fungicida presentaron respuestas estimuladoras a estas dosis sub inhibitorias.

El manejo de enfermedades de plantas causadas por hongos, en general, se convierte en un problema cuando no se emplean dosis adecuadas de fungicidas. Las dosis sub inhibitorias de fungicidas favorecen a la hormesis (Flores y Garzón, 2013; Garzón et al., 2011; Zhou et al., 2014). Para un correcto control de enfermedades micóticas en plantas, con repercusión en animales y humanos, se debe procurar aplicar técnicas de prevención

y control que no induzcan a la producción de micotoxinas, ya que éstas aumentan la patogenicidad en el huésped. En el caso de tratamiento con fungicidas se debería utilizar concentraciones efectivas y no sub inhibitorias para así dar la importancia que se merece a este problema de hormesis en fungicidas que se ha ignorado por algunos años (Garzón y Flores, 2013; Lazzari, 1993; Zhou et al., 2014) y hasta el momento se desconoce su relevancia.

## **2.2. Producción agrícola de cebolla**

La cebolla (*Allium cepa*) es la segunda hortaliza con mayor importancia económica a nivel mundial. En primer lugar se encuentra el tomate (*Solanum lycopersicum*) (Vallejo y Estrada, 2004). Estadísticas publicadas por la FAO (2013) indican que anualmente se producen alrededor de 86 millones de toneladas de cebolla a nivel mundial.

El cultivo consta de dos temporadas, en la primera se forman los bulbos y en la segunda las flores. Un clima templado (15-20°C), con lluvias moderadas, un rango de 6-7 de pH del suelo y un período de luz de 11-16 horas favorecen al mejor desarrollo del cultivo (FAO, 2015).

A más de ser una fuente de vitaminas A, B, C y proteínas (FAO, 1989), posee también propiedades medicinales gracias a: la acción antibiótica de ciertas sustancias frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, su acción hipoglicémica y su capacidad protectora contra la arterioesclerosis. Debido a esto, no sólo es importante dentro de la industria alimenticia sino también en la industria farmacéutica (Luro, 1982; Vallejo y Estrada, 2004).

## **2.3. Patógenos en el cultivo de cebolla**

Así como en otros cultivos, la cebolla se ve afectada por varias plagas y enfermedades que resultan en problemas en el sector agrícola a corto y largo plazo. Entre éstos tenemos a la reducción de la productividad, que origina grandes pérdidas económicas, y al incremento de los costos de producción, debido a compras masivas de plaguicidas, fungicidas y herbicidas (Kiehr y Delhey, 2007).

Según Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003), la clave para el manejo adecuado de enfermedades es la identificación de los organismos patógenos. Actualmente, más de una

docena de patógenos han sido identificados en los cultivos de cebolla. Los agentes causales son diversos, se puede nombrar a insectos como *Agrotis* sp., *Spodoptera* spp., *Hylemia* sp., etc; nemátodos como *Dytilenchus dipsaci*, *Paratrichodorus allius*, etc; ciertas bacterias y virus; y por último los hongos, que son los patógenos más predominantes en este tipo de cultivo y pueden causar enfermedades foliares, sistémicas o post-cosecha. Entre los más representativos están: *Botrytis allii*, *Aspergillus niger*, *Alternaria porri*, *Peronospora destructor*, *Cladosporium allii-cepae*, *Penicillium* spp., *Phytium* spp., *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum* (Cabrera y Salazar, 2004; Kiehr y Delhey, 2007).

### **2.3.1. *Fusarium* spp en cebolla**

De acuerdo a Leslie y Summerell (2006), muchos cultivos a nivel mundial desarrollan al menos una enfermedad asociada al hongo fitopatógeno *Fusarium* y la cebolla no es la excepción. De hecho, varias especies de *Fusarium* han sido aisladas de cebollas, aunque no todas son altamente patogénicas. La especie encontrada más frecuentemente es *F. oxysporum*. Sin embargo, en el estudio de Ghanbarzadeh, Goltapeh y Safaie (2013). Al comparar la virulencia entre *F. oxysporum* y *F. proliferatum* en bulbos de cebolla, la especie más destructiva resultó ser *F. proliferatum*. Se conoce también que, a más de las especies mencionadas anteriormente, *F. solani*, *F. acuminatum*, y *F. redolens* causan daños severos en cultivos de cebolla (Bayraktar y Dólar, 2010). Los síntomas asociados a éste género son principalmente el marchitamiento de plántulas, podredumbre basal y de la raíz, tanto en campo como en almacenamiento (Klokočar-Šmit et al., 2008).

Es importante mencionar al hongo con el que se ha trabajado en el presente proyecto, *Fusarium proliferatum*, debido a que a más de su capacidad de producir y acumular toxinas en partes comestibles de alimentos como cebolla y ajo, está implicado en dos enfermedades muy importantes de la cebolla: la podredumbre basal y la mancha salmón (Moncrief, 2014; Stankovic et al., 2007).

*F. proliferatum* ha sido aislado de cebollas con síntomas de podredumbre basal conjuntamente con *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, aunque en el estudio de Stankovic et al., (2007), mediante pruebas de patogenicidad, se llegó a la conclusión de que el comportamiento patogénico de *F. proliferatum* varía de acuerdo a los diferentes cultivares

de cebolla y es importante investigar más a fondo el rol que tiene este microorganismo como patógeno del mencionado cultivo.

La mancha salmón en la cebolla es una enfermedad que se identificó en Yotvata, Israel en el año 2006. La caracterización se llevó a cabo, mediante la realización de los postulados de Koch. Exitosamente el hongo aislado con frecuencia fue identificado mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) como *F. proliferatum*. Las cebollas infectadas se caracterizan por presentar manchas de color salmón en sus capas externas, y progresivamente se van colonizando las capas internas hasta que el bulbo se pudre (Moncrief, 2014). Curiosamente los cultivares blancos son los más propensos a desarrollar los síntomas, aunque el hongo también puede ser aislado de cultivares rojos y amarillos (Garzón y Marek, comunicación personal). Dicho fenómeno puede ser explicado debido a la capacidad que tiene *F. proliferatum* de infectar a su hospedero sin producir síntomas visibles (Tsavkelovaa et al., 2008; Jeney et al., 2007; Kwon et al., 2001; Munkvold y Desjardins, 1997).

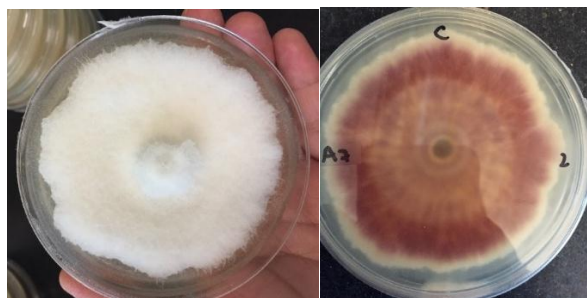
#### **2.4. *Fusarium proliferatum***

El género *Fusarium* incluye varias especies fitopatógenas distribuidas ampliamente en varios cultivos y encontrado en desechos vegetales alrededor del mundo (Marasas et al., 1984; Stępień, Koczyk y Waśkiewicz, 2011). Una de las especies es *F. proliferatum* que ataca a cultivos de importancia agrícola como maíz, cebolla, ajo, mango, arroz, espárragos, varios cereales, entre otros (Bahareh, Naser y Ebrahim, 2014; Palacios et al., 2015; Proctor, Desjardins y Moretti, 2010; Stankovic et al., 2007; Stępień, Waśkiewicz y Wilman, 2015). Es un hongo perteneciente al filo Ascomycota, orden Hypocreales y familia Nectriaceae. Hace algunas décadas, *F. proliferatum* fue clasificado como *F. moniliforme* junto con otras especies como *F. verticillioides* (Aoki et al., 2014; Bacon y Hinton, 1996; Isack, Benichis, Gillet y Gamliel, 2014). Este hongo pertenece a la sección *Liseola* junto con *F. subglutinans*, *F. anthophilum* y *F. thapsinum* y al complejo de especies *Gibberella fujikuroi* según la clave taxonómica propuesta por Nelson et al. (1983). Se sabe que los miembros de esta sección comparten la característica de poseer microconidias ovoides y obovoides (Isack et al., 2014). *Gibberella intermedia* es su estado telomórfico (*Gibberella fujikuroi* especie biológica o población de apareamiento

D). A *F. proliferatum* se lo aisló por primera vez de cebollas enfermas en el 2006, al sur de Israel (Moncrief, 2014; Waśkiewicz, Stępień, Wilman y Kachlicki, 2013).

Este hongo causa importantes patologías como la mancha salmón en la cebolla (*Allium cepa*), el punto púrpura de la espinaca de Malabar (*Basella alba L.*) y la pudrición del grano de maíz (*Zea mays*). En los tejidos infectados, *F. proliferatum* puede producir una alta cantidad de micotoxinas incluyendo las fumonisinas, fusaproliferin y moniliformina, que vuelve a las enfermedades más agresivas y difíciles de tratar y controlar (Aoki et al., 2014; Figueroa, 2006; Glenn, 2007; Jurado et al., 2009). La propagación del hongo se da generalmente por semillas infectadas por el mismo y otro material de propagación como residuos vegetales de plantas afectadas por *F. proliferatum* (Marasas et al., 1984; Munkvold, 2003).

La morfología microscópica de *Fusarium proliferatum* comprende macroconidias con forma de hoz a rectas, con la superficie ventral y dorsal casi paralelas, usualmente presentan de 3-5 septos. Sus macroconidióforos presentan monofialides ramificadas y no ramificadas, y en el caso de los microconidióforos presentan también polifiálides. Los microconidios son unicelulares, no septados, ovoides, piriformes a napiformes, en falsas cabezas y cadenas. No presenta clamidosporas. Respecto al micelio aéreo, puede observarse cadenas o agregados de pocas microconidias (Figueroa, 2006; Leslie y Summerell, 2006). En cuanto a su morfología macroscópica (Figura 1), se observa abundante micelio aéreo blanco, lavanda a púrpura, al reverso es incoloro a púrpura (características observadas en Papa Dextrosa Agar (en adelante se referirá como PDA)). Algunas cepas pueden tornarse casi negras con el paso del tiempo en agar PDA. Las colonias en agar PDA se tardan 3 días en crecer, el crecimiento micelial puede llegar hasta 4 cm de diámetro, aunque algunas cepas tienen un crecimiento más lento (Leslie y Summerell, 2006; Pavlović, Dražić e Ivanović, s.f.).



**Figura 1.** Morfología macroscópica de *F. proliferatum*. Micelio aéreo (izquierda), reverso de la colonia (derecha).

### **2.4.1. Micotoxinas producidas por el género *Fusarium***

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos y pueden representar un riesgo para animales y humanos (Falcao et al., 2010).

Algunas micotoxinas del género *Fusarium* han sido aisladas de granos de cereales. Estas se encuentran dentro del grupo de los tricotecenos. Entre las más importantes están la T-2, diacetoxiscirpenol (DAS), deoxinivalenol (DON), fusarenona X (FUSA) y nivalenol (NIV); zearalenona (ZEN) y fumonisinas (FBs); moniliformina (MON), beauvericina (BEA), fusaproliferina (FUS), eniانتinas (EN), fusarocromanona (FUC), neosolaniol (NEO), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA) y zearalenol (ZOH); y dentro de las micotoxinas que produce la especie *F. proliferatum* están: FB1, BEA, MON, FUP, FB2 (Bottalico, 1998; Leslie y Summerell, 2006; Logrieco, Bottalico, Mulé, Moretti y Perrone, 2003).

#### **2.4.1.1. Fumonisinas**

En 1988, luego de 18 años de trabajo de investigación en Sudáfrica, el Programa sobre Micotoxinas y Carcinogénesis Experimental (PROMECA por sus siglas en inglés) descubrió por primera vez que el hongo *Fusarium verticillioides* cepa MRC 826 producía una endotoxina cancerígena denominada fumonisina (Marasas, 2001). Alrededor de 15 especies de *Fusarium* han sido identificadas como productoras de fumonisinas, entre ellas ocho especies de la sección Liseola, incluida *F. proliferatum* (Rheeder et al., 2002).

Los efectos ocasionados por estas micotoxinas recaen en los individuos que son expuestos a las mismas mediante la ingesta de alimentos contaminados. En animales se puede mencionar a la leucoencefalomalacia equina (ELEM por sus siglas en inglés) y al edema pulmonar porcino (PPE por sus siglas en inglés), los cuales fueron relacionados con fumonisinas luego de un brote por consumo de maíz contaminado con *F. verticillioides* y fueron halladas poco tiempo después del descubrimiento de la micotoxina (Munkvold y Desjardins, 1997; Rheeder et al., 2002; Ross et al., 1990). A partir de ésta, varias otras patologías causadas por la exposición a fumonisinas fueron descubiertas, como tumores cancerígenos en ratones (Kodell y Turturro, 2004) y cáncer de esófago en humanos (Marasas, 2001).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, 2001) estableció rangos seguros para el contenido de fumonisinas contenidas en productos destinados al consumo humano, concluyendo que los límites máximos permisibles de fumonisinas van de 2 ppm a 4 ppm dependiendo del alimento (aunque principalmente se detallaron alimentos derivados del maíz, debido a la alta ocurrencia de FB1 en este producto). Para productos destinados a consumo animal, los límites van de 1 a 50 ppm dependiendo del alimento, y también varía de acuerdo a cada especie animal. La Comisión de la Unión Europea ha recomendado niveles para las fumonisinas B1 y B2 (ya que se conoce que son las más letales) según la especie. En caballos, cerdos, conejos y animales de compañía 5 ppm, 50 ppm para rumiantes adultos y visón (Voss, Smith y Haschek, 2007).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA por sus siglas en inglés) estableció un nivel de ingestión tolerable máximo para humanos para el grupo de fumonisinas B1, B2 y B3 de 2 µg/kg peso corporal por día. Sin embargo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2013), se estima que las personas cuya dieta está basada en maíz consumen diariamente alrededor de 400 g/persona de estas micotoxinas, superando los valores máximos de ingestión de fumonisinas propuesto por la JECFA.

## **2.5. Control de enfermedades provocadas por *Fusarium proliferatum***

Para el tratamiento de cultivos infectados con *Fusarium proliferatum*, se han utilizado diversos fungicidas como carboxina + tiram, procloraz, boscalida + piraclostrobina, iprodiona, trifloxistrobin, tebuconazol, difenoconazol, clortalonil prothioconazole y metconazole (Amarasinghe et al., 2013; Gálvez-Patón, Gil-Serna, Bango y Palmero, 2011). Se ha probado también con distintos tratamientos inhibidores fúngicos como aceites esenciales (aceite de canela), teniendo buenos resultados a concentraciones de 500 y 1000 ppm (Sumalán, Alexa y Poiana, 2013), antioxidantes como el ácido ferúlico (Cao, Reid, Butrón, Souto y Santiago, 2011), controladores biológicos como *Trichoderma* spp., (Ghanbarzadeh, Safaie y Mohammadi, 2014), entre otros. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, un tratamiento efectivo será llevado a cabo sólo si las dosis aplicadas son las adecuadas. Las dosis sub inhibitorias empeoran el problema.

En el 2011, se publicó un estudio clave para el control de cultivos infectados con *F. proliferatum*, donde se evaluó a Tetrahidrocurcuminoïdes, particularmente THC1, para reducir *in vitro* el crecimiento del hongo y la producción de fumonisina B1, concluyendo que las dosis bajas aplicadas son efectivas para el objetivo del estudio. Esta podría ser una de las moléculas de base biológica más prometedoras para el control de cepas de hongos productores de toxinas como *F. proliferatum* y es importante su posterior evaluación *in vivo* (Coma et al., 2011).

### **2.5.1. Iprodiona**

La iprodiona, cuya fórmula IUPAC es 3-(3,5-Dichlorofenyl)-N-isopropil-2,4-dioximidazolidine-1-carboxamide (Nufarm, 2012), se introdujo en el mercado en 1974, y pertenece al grupo de las Dicarboximidias (Lacroix et al., 1974 citado por Muiño, Almándoiz y Martín, 2009). Al ser un fungicida sistémico y de amplio espectro, es utilizado para varios géneros de hongos, en especial aquellos que han desarrollado resistencias a otros tipos de fungicidas sistémicos derivados del benzimidazol (Viera, 2002). En un estudio de Thomidis, Michailides y Exadaktylou (2008), se reporta que iprodiona fue altamente efectivo tanto para el género *Fusarium* como para otros géneros de hongos fitopatógenos entre los que se menciona a *Monilinia*, *Aspergillus*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, entre otros. En algunos cultivos la iprodiona es el tratamiento de elección para solucionar problemas de fusariosis. Aunque es costoso, su acción es inmediata (Geiser; Garzón, comunicación personal).

La iprodiona es diseminada sistémicamente una vez que ha sido absorbida por las raíces de la planta y no se ha observado toxicidad. Su modo de acción sobre el hongo se basa en la interrupción de la biosíntesis de timina, lo cual interfiere directamente en la síntesis de ADN. Puede también afectar a la peroxidación de lípidos y la síntesis de la pared celular (Viera, 2002).

## **2.6. Uso inadecuado de fungicidas**

Como se ha venido mencionando a lo largo de este capítulo, las dosis juegan un papel muy importante dentro del control de enfermedades en plantas, y vale la pena mencionar

lo que el padre de la toxicología dijo en el siglo XVI: "Todo es tóxico, hay toxicidad en todo, sólo la dosis hace que algo no sea tóxico" (Parikh, 2014).

De acuerdo con Damalas y Eleftherohorinos (2011), los pesticidas son utilizados a nivel mundial para controlar numerosas enfermedades y plagas en cultivos y así mejorar la calidad y rendimiento de los productos. No obstante, los problemas derivados del uso de fungicidas son preocupantes. Uno de los problemas mencionados en su estudio es el uso excesivo de pesticidas que generan complicaciones de salud tanto en el sector ocupacional como en los consumidores, que ingieren cantidades residuales de éstas sustancias químicas perjudiciales para la salud. Otro inconveniente señalado por Damalas y Eleftherohorinos (2011) es el daño ambiental que se produce al liberar dichos productos en la naturaleza. La resistencia a fungicidas es otro problema que puede verse relacionado con la dosificación del fungicida. Van der Bosch, Paveley, Shaw, Hobbelen y Oliver (2011) indican que en la mayoría de los casos el aumento de la resistencia es directamente proporcional al aumento de la dosis.

El uso de dosis sub inhibitorias también constituyen un problema serio, a pesar de que no se ha mencionado anteriormente entre los problemas relacionados con las dosis de fungicidas. En realidad, poca atención ha sido prestada hacia ésta problemática. De hecho en varias ocasiones, las dosis sub inhibitorias no son consideradas como un fenómeno que requiere vigilancia ni una investigación más minuciosa. Uno de los problemas derivados de las dosis sub inhibitorias es la hormesis (Garzón y Flores, 2013).

## **2.7. Hormesis**

Este término, acuñado por Southam y Ehrlich en 1943, deriva del etimológico griego "horm" que quiere decir estimular. La hormesis se define como la respuesta bifásica que una célula u organismo (generalmente patógeno) desarrolla en respuesta a ciertos estímulos como cantidades variables de cierta sustancia inhibidora (fungicidas, etc.) o condición inhibitoria (condiciones de estrés, etc.). Una respuesta hormética está dada por una inhibición, reacción tóxica o muerte en cierto organismo frente a dosis normales (altas) de cierta sustancia, y una estimulación de la actividad metabólica del mismo organismo cuando se encuentra bajo dosis sub inhibitorias de dicha sustancia (Mattson y Calabrese, 2009).

La hormesis fue dilucidada a partir de las observaciones de Schulz en 1887, cuando Branham, en 1929 descubrió en uno de sus estudios que bajas dosis de desinfectantes estimulaban el crecimiento de levaduras y altas dosis de los mismos eran efectivas. A más de éste estudio, existen otros relacionados a fenómenos horméticos en organismos biológicos como hongos, bacterias o procesos biológicos como germinación de semillas (Garzón y Flores, 2013). Garzón y Flores (2013), además, explican que para estudiar la hormesis de cierto grupo de organismos es necesario evaluar ciertos parámetros como crecimiento, producción de metabolitos, longevidad, entre otros (éstos parámetros se escogen dependiendo del tipo de organismo a ser evaluado) para demostrar experimentalmente un fenómeno hormético. Existe también la llamada curva dosis-respuesta, en donde la hormesis se evidencia como una expresión bifásica. La curva comprende una zona hormética que va desde la menor dosis sub inhibitoria, le sigue la dosis máxima de estimulación (MSD por sus siglas en inglés) y llega hasta el nivel adverso no observable (NOAEL por sus siglas en inglés).

A pesar de que ciertas investigaciones antiguas y recientes demuestran a la hormesis como un fenómeno real y experimentalmente demostrable, también existen estudios como el de Dobosz et al. (2011). En este estudio no se menciona a la hormesis como un problema derivado del uso de tratamientos para eliminar la plaga, sino que los mecanismos defensivos de las plantas son los que inducen a la producción de toxinas cuando éstas han sido colonizadas por un microorganismo.

### **2.7.1. Hormesis en hongos**

El fenómeno de estimulación, no necesariamente hormético, en el que se evalúa la dosis-respuesta frente a ciertos estímulos, principalmente factores ambientales y fungicidas en el caso de hongos, se ha estudiado en algunos microorganismos fitopatógenos, como por ejemplo en *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhou et al., 2014), *Fusarium verticillioides* (Cruz, Marín, Magan, y González-Jaén, 2014; Etcheverry et al., 2001; Falcão et al., 2010; Marín et al., 2013), *F. proliferatum* (Etcheverry et al., 2001; Marín et al., 2013), *Aspergillus flavus* (Al-Hilli y Smith, 1979), *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia zea* (Flores y Garzón, 2013), *P. aphanidermatum* (Garzón et al., 2011), *P. irregulare*, *P. ultimum* y *S. homoeocarpa* (Pradhan, 2015), entre otros. Sin embargo, casi ninguno de los estudios que

involucran al género *Fusarium* relaciona a los fenómenos horméticos con la producción de fumonisinas.

Los parámetros más comúnmente evaluados cuando se desea analizar el efecto que causan los fungicidas (solos o combinados con otros) en hongos fitopatógenos son la actividad del agua, la temperatura, el crecimiento micelial, la concentración, la dosis de fungicidas, la producción de toxinas, etc. (Cruz et al., 2014; Etcheverry et al., 2001; Flores y Garzón, 2013; Marín et al., 1999;).

En 1997, Calabrese y Baldwin propusieron tres parámetros para verificar la existencia de un fenómeno hormético. Estos fueron: i) un nivel adverso no observable (NOAEL) debe ser determinado; ii) se debe evaluar la respuesta producida de al menos cinco dosis menores al NOAEL, y éstas deben estar separadas equivalentemente entre sí y iii) la zona de estimulación hormética debe estar comprendida en un rango de hasta 10 dosis evaluadas bajo el NOAEL. Otra condición indispensable para que se demuestre estadísticamente un fenómeno hormético es que el valor de  $\gamma$  debe ser positivo en un rango de 95% de confianza (Garzón y Flores, 2013; Pradhan, 2015).

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Tipo de Estudio

El presente estudio es de tipo experimental y se realizó como parte del proyecto de tesis doctoral de Mary Gard M. Sc., intitulado “Biología poblacional de *Fusarium proliferatum* en cebolla”, financiado por la Universidad del Estado de Oklahoma (OSU por sus siglas en inglés), en el año 2015.

#### 3.2. Antecedentes

En el mes de Mayo de 2014, se compraron cultivares blancos de cebollas (Figura 2) en un supermercado local de Stillwater, Oklahoma y se seleccionaron al azar un número determinado de cebollas sintomáticas y asintomáticas, a partir de las cuales se aisló e identificó molecularmente a las especies *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum* mediante PCR. Se utilizaron los primers específicos Prolif-TEF1- $\alpha$ , y Pro 1 & 2 que amplificaron las regiones TEF1- $\alpha$  y CaM respectivamente (Anexo 1 y 2). Cuatro diferentes cepas fueron identificadas como *F. proliferatum* y fueron aisladas a partir de la primera y séptima capas de una cebolla asintomática (A), y de la primera y tercera capas de una cebolla sintomática (S), correspondiendo a los aislados: A1, A7, S1 y S3 respectivamente (Figura 2). Dichos aislados fueron inoculados durante 2 semanas en maíz partido y en una mezcla 50:50 de avena y sorgo para inducir y cuantificar la producción de fumonisina FB1 (Figura 2). Los aislados S1 y S3 no produjeron ninguna cantidad de FB1, mientras que el aislado A7 sobrepasó los límites de cuantificación del método de cromatografía líquida de alta eficacia utilizado (HPLC por sus siglas en inglés) (700 ppm) y el aislado A1 no produjo micotoxinas (Anexo 3).



**Figura 2.** Aislamiento de *F. proliferatum* y cuantificación de fumonisinas: (A) cebolla comercial infectada, (B) capas de cebolla de donde se aisló a *F. proliferatum*, (C) maíz, y mezcla sorgo - avena inoculados con *F. proliferatum* (Gard, 2014).

Según la FDA (Food and Drug Administration, 2001), los límites seguros para el contenido de fumonisinas en alimentos de consumo humano no deben exceder las 4 ppm. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron concluir que la ausencia de signos y síntomas en cebollas infectadas con *F. proliferatum* pueden resultar en una ingesta accidental de FB1 por animales y humanos (Gard, 2014, datos no publicados). Todas las cepas caracterizadas fueron preservadas en papel filtro desecado con silica gel a 4°C por Mary Gard, y reposan en el laboratorio de genómica de hongos de la Facultad de Fitopatología de OSU.

### 3.3. Diseño del Experimento

El presente estudio se dividió en tres etapas:

- Primera etapa: elección de aislados de *F. proliferatum* y su respectiva activación.
- Segunda etapa: ensayos experimentales en los laboratorios de la Facultad de Fitopatología de la OSU.
- Tercera etapa: análisis estadísticos de los resultados obtenidos y modelado de la curva dosis-respuesta.

### 3.4. Equipos y Materiales

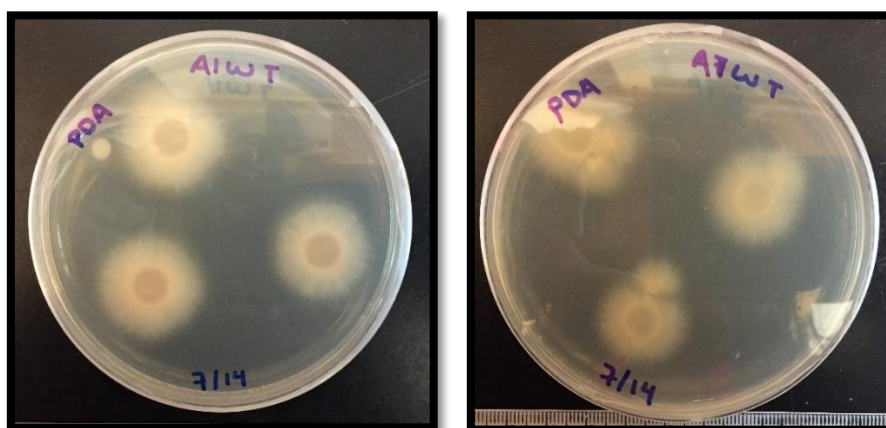
La lista de equipos y materiales se detallan en el Anexo 4.

### 3.5. Técnicas empleadas

#### 3.5.1. Elección y activación de cepas de *Fusarium proliferatum*

De las cuatro cepas caracterizadas como *F. proliferatum* (Gard, 2014, datos no publicados), se eligió trabajar con los aislados provenientes de cebollas asintomáticas (A1 y A7). Existen dos motivos por los cuales se seleccionaron los aislados A1 y A7: i) por las graves consecuencias que resultarían de un consumo accidental de FB1, tanto en humanos como en animales, debido a la ausencia de síntomas en cultivos afectados por *F. proliferatum* (Garzón, 2015, comunicación personal) y ii) porque ambos aislados fueron experimentalmente catalogados como resistentes a iprodiona (Pradhan, 2015, datos no publicados), y en algunos estudios se ha observado que los aislados resistentes son más propensos a desarrollar respuestas horméticas (Pradhan, 2015; Zhou, 2014).

Para iniciar el experimento, se procedió a transferir las cepas (A7, altamente productora de fumonisinas y A1, no productora de fumonisinas) de papel filtro a medio PDA (Anexo 5), lo que permitió la germinación de las conidias y la obtención de cultivos jóvenes de *F. proliferatum* (Figura 3).



**Figura 3.** Cultivos jóvenes de las cepas A1 (izquierda) y A7 (derecha) en medio PDA.

### 3.5.2. Ensayo de crecimiento radial (Pradhan, 2015)

Para evaluar los efectos del fungicida iprodiona sobre las cepas escogidas, se probaron siete distintas concentraciones (incluyendo la dosis recomendada y dosis sub inhibitorias) junto a un control negativo como se puede ver a continuación:

**Tabla 1**

*Concentraciones de las dosis de iprodiona (ppm) utilizadas en el ensayo de crecimiento radial. Pradhan, 2015, comunicación personal.*

Dosis	Concentración (ppm)
A	127,1177
B	12,71177
C	1,271177
D	0,127118
E	0,012712
F	0,001271
G	0,000127
Control	0

\* La dosis resaltada en color azul representa a la dosis recomendada.

\*\* Las dosis resaltadas en color rojo representan a las dosis sub inhibitorias.

#### 3.5.2.1. Preparación de las dosis de iprodiona (Pradhan, 2015, comunicación personal)

Las siete dosis de fungicida fueron preparadas a partir de una solución concentrada de iprodiona (29620 ppm). Primero, la solución madre fue diluida hasta una concentración de 127,1177 ppm, la cual representa la tasa de aplicación mínima (dosis recomendada por la casa comercial del fungicida, de aquí en adelante se referirá a dicha dosis como “A”. Ver Tabla 1). A partir de ésta se realizó diluciones seriadas 1:10 hasta la dilución  $10^{-6}$  con un volumen final de 120 ml (Tabla 2). Las soluciones fueron almacenadas en matraces Erlenmeyer de 200 ml cubiertos con papel aluminio para evitar su degradación hasta el

momento de su uso (no más de 12 horas). Además, fueron mantenidos en agitación constante para evitar su precipitación (Figura 4).

**Tabla 2**

*Volúmenes de agua y fungicida añadidos para obtener las dosis de iprodiona usadas en este estudio. Pradhan, 2015, comunicación personal.*

Dosis	Volumen iprodiona (ml)	Volumen agua (ml)
A	0,515	119,485
B	12,0	108,0
C	12,0	108,0
D	12,0	108,0
E	12,0	108,0
F	12,0	108,0
G	12,0	108,0

\* La dosis resaltada en color azul representa a la dosis recomendada.

\*\* Las dosis resaltadas en color rojo representan a las dosis sub inhibitorias.



**Figura 4.** Dosis de iprodiona en frascos Erlenmeyer cubiertos con papel aluminio sobre un agitador magnético.

### **3.5.2.2. Adición de las dosis de fungicida al medio de cultivo PDA (Pradhan, 2015, comunicación personal)**

Para este estudio, la preparación del medio PDA recomendada por la casa comercial fue adaptada. La cantidad de agua adicionada fue menor en un 10%, ya que después de la esterilización, fue reemplazada por cada una de las dosis de fungicida a evaluar, a excepción del control negativo, el cual no contuvo iprodiona en absoluto.

Por cada una de las dosis de iprodiona se preparó, en un matraz, un volumen final de 60 ml de medio de cultivo, con las condiciones antes mencionadas (54 ml de agua destilada y 6 ml de fungicida). Cabe recalcar que las soluciones de iprodiona adicionadas al medio PDA no fueron dispensadas inmediatamente después de la esterilización, sino cuando el medio alcanzó una temperatura de 55°C (temperaturas mayores degradan al fungicida).

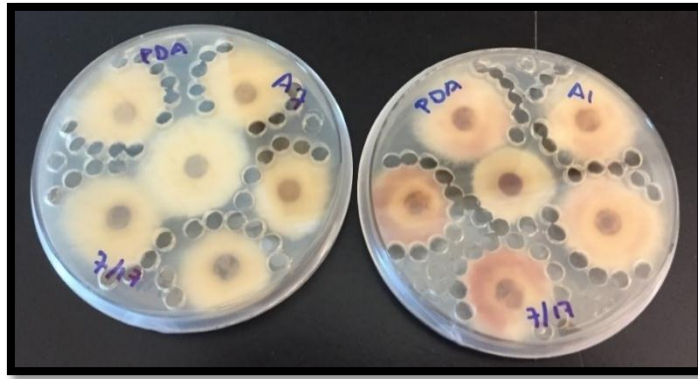
### **3.5.2.3. Inoculación de las cepas A1 y A7 en las cajas de Petri (Pradhan, 2015, comunicación personal)**

Los matraces con el medio de cultivo modificado fueron colocados sobre un agitador magnético durante dos minutos a velocidad media, para lograr la homogenización del medio.

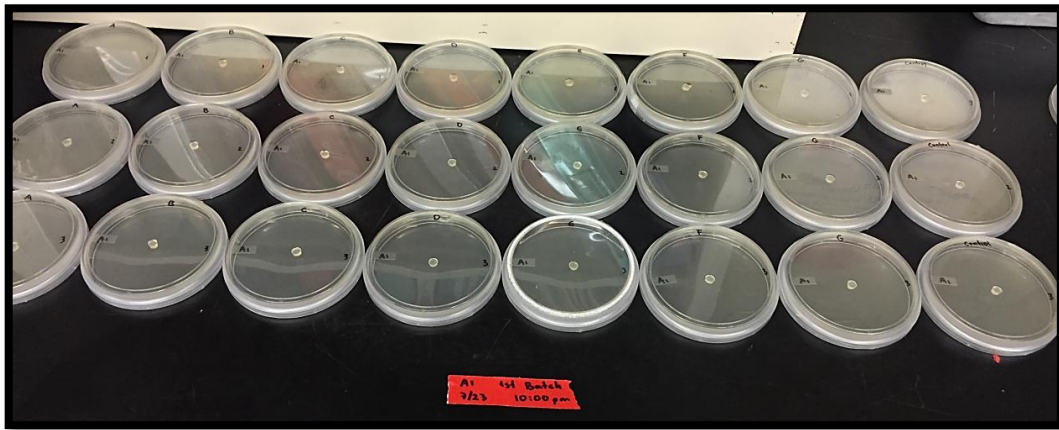
15 ml del medio modificado fueron dispensados en cada una de las cajas de Petri debidamente rotuladas, hasta completar tres cajas por cada dosis y por cada aislado a evaluar. Al mismo tiempo, discos de 5 mm de diámetro a una distancia equidistante del centro de las cajas de Petri, fueron obtenidos de las dos cepas de *F. proliferatum* de 7 días de edad (Figura 5).

Posteriormente, cuando el medio modificado se solidificó y enfrió por completo, se tomaron los discos de agar con micelio obtenidos en el paso anterior y se los inoculó en el centro de las cajas de Petri (Figuras 6 y 7).

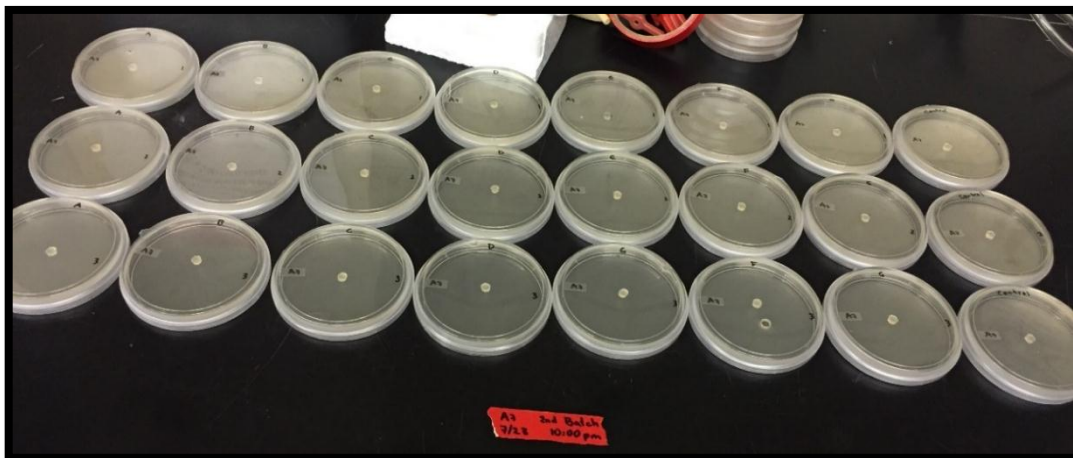
Por último, se utilizó parafilm para sellar las cajas y luego se las incubó por tres y seis días a una temperatura de 28°C en la oscuridad (Anexo 6).



**Figura 5.** Cultivos de *F. proliferatum* de siete días de edad, cepas A7 (izquierda) y A1 (derecha)



**Figura 6.** Cepa A1 de *Fusarium proliferatum* expuesta por triplicado a siete dosis de fungicida (A, B, C, D, E, F, G de izquierda a derecha) y un control.



**Figura 7.** Cepa A7 de *Fusarium proliferatum* expuesta por triplicado a siete dosis de fungicida (A, B, C, D, E, F, G de izquierda a derecha) y un control.

#### **3.5.2.4. Medición del área de crecimiento radial (Pradhan, 2015, comunicación personal)**

Al tercer y al sexto día de incubación se procedió a escanear cada una de las cajas, retirando el parafilm y colocándolas boca abajo. Las fotografías en formato digital se utilizaron para medir el área de crecimiento micelial con el software KLONK image measurement® (KLONK, Ringsted, Denmark). El presente ensayo incluyó ocho tratamientos con tres réplicas y tres repeticiones cada uno.

#### **3.5.3. Ensayo de inducción y cuantificación de fumonisinas**

##### **3.5.3.1. Preparación del material**

Para realizar este ensayo se utilizó y adaptó la metodología de Proctor, Desjardins, Plattner y Hohn (1999).

Se lavaron y autoclavaron 20 cajas magenta durante 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión. Se pesaron 10 gramos de maíz partido y se colocaron en cada una de las cajas magenta, adicionando también 2.5 ml de agua destilada. Las cajas fueron autoclavadas nuevamente siguiendo el ciclo anterior, con el fin de eliminar cualquier tipo de esporas o microorganismos presentes. Al finalizar el ciclo de autoclavado, se dejó enfriar completamente las cajas (Anexo 7).

##### **3.5.3.2. Preparación de las dosis de iprodiona**

Se utilizó el mismo protocolo (Pradhan, 2015, comunicación personal) que en el ensayo de crecimiento radial (Tabla 2).

A diferencia del ensayo de crecimiento radial, para esta prueba únicamente se trabajó con las dosis A, E, F y G y un control (Figura 8). Además, solamente se hicieron dos repeticiones y dos réplicas por repetición. Esta decisión fue tomada por motivos de financiamiento. Por tanto, las dosis escogidas representan una dosis alta (A), dosis sub inhibitorias (E, F, G) y un control negativo.



**Figura 8.** Dosis de iprodiona utilizadas en el ensayo de producción de fumonisinas.

### **3.5.3.3. Adición de las dosis de fungicida al maíz partido**

El protocolo descrito por Proctor, Desjardins, Plattner y Hohn (1999) fue adaptado para este ensayo, ya que originalmente después de autoclavar el maíz se añaden 2 ml de agua estéril. Sin embargo, para este estudio se reemplazó los 2 ml de agua estéril por 2 ml de las soluciones de las varias dosis de fungicida a evaluar. Inmediatamente después de añadir el fungicida se mezcló con el maíz y se dejó reposar durante cuatro horas para que así el maíz absorba uniformemente la solución.

### **3.5.3.4. Preparación de la suspensión de esporas**

Para lograr una diseminación rápida y completa del hongo, se escogió trabajar con una suspensión de esporas en lugar de discos de agar con micelio. Para esto, se hizo crecer las cepas A1 y A7 en un medio de cultivo a base de levadura, peptona y almidón (YPS por sus siglas en inglés) durante siete días, en la oscuridad, a una humedad relativa del 45% y a una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  para estimular su esporulación. Algunos autores utilizan este medio de cultivo debido a que permite que la reproducción sexual de las esporas sea óptima (De-Wei, 2016). Pasado este lapso de tiempo, se cortó el agar en discos de 3,5 mm de diámetro y cinco de ellos fueron colocados en un microtubo de 2 ml. En seguida, se añadió 1 ml de agua estéril y se llevó al equipo de disrupción celular durante 10 segundos a 5000 rpm, tiempo recomendado para formar una solución de esporas líquida (Marek, 2015, comunicación personal).

Al finalizar la preparación, se obtuvieron 10 suspensiones de esporas en microtubos por cada cepa de *F. proliferatum*.

### 3.5.3.5. Adición de la suspensión de esporas al maíz partido

El contenido de cada microtubo fue dispensado individualmente en cajas magenta (apropiadamente rotuladas) con el maíz partido.

Para promover una colonización uniforme del maíz, cada caja fue agitada durante 20 segundos (Figura 9). Esta acción fue repetida diariamente, por el lapso de seis días, hasta recolectar la última muestra de maíz (Anexos 8 y 9).

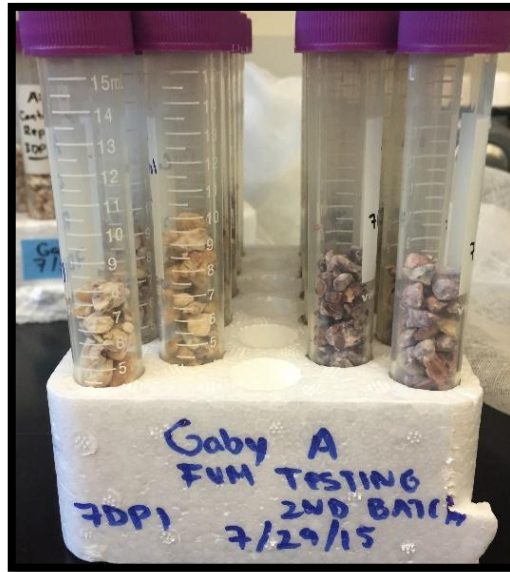


**Figura 9.** Maíz, dos días tras la inoculación.

Las muestras fueron recolectadas a los tres y seis días de inoculación y almacenadas a -20°C en tubos Falcon de 15 ml (Figuras 10 y 11). El presente ensayo incluyó cinco tratamientos con dos réplicas y dos repeticiones cada uno.



**Figura 10.** Muestras almacenadas en tubos Falcon después de tres días de inoculación con la cepa A7 (izquierda) y A1 (derecha).



**Figura 11.** Muestras almacenadas en tubos Falcon después de seis días de inoculación con la cepa A7 (izquierda) y A1 (derecha).

### 3.5.3.6. Envío de muestras

Las muestras almacenadas en tubos Falcon fueron liofilizadas (Figura 12), empacadas y enviadas en fundas whirl pak® a la Universidad de Arkansas. Burton H. Bluhm Ph. D., recibió las muestras en el laboratorio de Ciencias de Plantas para ejecutar la cuantificación de fumonisinas mediante HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).



**Figura 12.** Muestras en proceso de liofilización.

### 3.5.4. Análisis estadístico

#### 3.5.4.1. Análisis hormético

Para el presente análisis, se siguió el protocolo utilizado en el estudio de Flores y Garzón, (2013). En el mismo, se utiliza la ecuación (Figura 13) del modelo de regresión no-lineal Brain-Cousens (1989) para detectar la presencia o ausencia de hormesis y para la obtención de los valores EC<sub>50</sub>, NOAEL y MSD (Brain y Cousens, 1989, citado por Schabenberger, Tharp, Kells y Penner, 1999).

$$E\left[\frac{y}{x}\right] = \delta + \frac{\alpha - \delta + \gamma x}{1 + \omega \exp\left[\beta \ln\left(\frac{x}{NOAEL}\right)\right]}$$
$$\omega = \frac{\gamma NOAEL}{\alpha - \delta}$$

**Figura 13.** Ecuación del modelo de regresión no-lineal. Brain y Cousens, 1989, citado por Schabenberger, Tharp, Kells y Penner, 1999.

- Donde  $E\left[\frac{y}{x}\right]$  es la respuesta promedio a una concentración “x”
- $\alpha$  es el punto más alto de la curva
- $\delta$  es el punto más bajo de la curva
- $\beta$  es la pendiente de la dosis EC<sub>50</sub>
- $\gamma$  es el rango de incremento a bajas concentraciones

Es importante mencionar que la ecuación del modelo de regresión no-lineal Brain-Cousens puede ser fácilmente transformada a una ecuación log-logística en el caso de la ausencia de un fenómeno hormético. En ese caso el valor de  $\delta$  sería cero.

Los parámetros iniciales para modelar la curva,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y EC<sub>50</sub>, fueron obtenidos a partir de los datos experimentales, mediante un procedimiento de modelado no-lineal (PROC-NLIN, SAS 9.3, SAS Institute, Cary, NC).

Los datos de área de crecimiento radial fueron transformados a porcentajes respecto al control. El porcentaje del área de crecimiento radial del control, que fue 100, determina

el límite mayor de la curva ( $\alpha$ ), y la inhibición total del crecimiento fúngico, que fue cero, representa el límite menor de la curva ( $\delta$ ).

El análisis de hormesis para el ensayo de cuantificación de fumonisinas fue el mismo que para el ensayo de crecimiento radial. El código de programación en SAS® (SAS System for PC, v. 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC) para realizar el análisis hormético se especifica en el Anexo 10.

Una vez que se obtuvieron los parámetros horméticos, se procedió a modelar la curva dosis-respuesta en el programa Microsoft Excel 2013® (Microsoft, Redmond, WA). Mediante los parámetros horméticos, se obtuvieron los valores de respuesta, los cuales fueron comparados con el logaritmo natural de las dosis evaluadas. También se incluyeron los logaritmos naturales de los parámetros NOAEL, EC<sub>50</sub> y MSD.

La ausencia de un fenómeno hormético se observa cuando los valores de  $\delta$ , en el intervalo de confianza de 95%, son inferiores o iguales a cero. Consecuentemente, la curva modelada no es bifásica, sino monofásica (Pradhan, 2015).

Cabe recalcar que el análisis hormético realizado representa un análisis estadístico riguroso y específico, el mismo que se adapta a la naturaleza de este estudio (valores de respuesta obtenidos bajo la influencia de distintas dosis sub inhibitorias de fungicida). Incluso, en estudios como el de Pradhan (2015), se ha considerado al análisis hormético como único análisis estadístico. De todas maneras, los análisis estadísticos que se han realizado adicionalmente en esta investigación, servirán para complementar el análisis estadístico hormético y para exhibir una mayor fortaleza en la presentación de los resultados.

#### **3.5.4.2. T de Student**

Con la ayuda del software SAS® (SAS System for PC, v. 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC), se realizó la prueba T de student con un valor  $\alpha=0.05$  para complementar el análisis estadístico de hormesis correspondiente al ensayo de crecimiento radial del aislado A1. Esta prueba permite identificar los tratamientos que producen una estimulación significativa, en comparación con el control, y también entre tratamientos. El código de programación en SAS® para realizar la prueba T de student se detalla en el Anexo 11.

### **3.5.4.3. ANOVA**

Con la ayuda del programa Microsoft Excel 2013® (Microsoft, Redmond, WA) se realizaron dos análisis de ANOVA correspondientes al ensayo de crecimiento radial y cuantificación de FB1 del aislado A7 para apoyar a los datos obtenidos a partir del análisis estadístico hormético.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Medición del crecimiento radial

##### 4.1.1. Aislado A1

Un total de 144 mediciones fueron realizadas en el aislado A1. Los valores obtenidos en la repetición 3 exhibieron una notable variación frente a los valores obtenidos en las repeticiones 1 y 2 (Tabla 3), como se podrá verificar más adelante, desde un punto de vista estadístico.

Cabe recalcar que el medio de cultivo y las dosis de iprodiona se prepararon individualmente por repetición. Por lo señalado, se puede descartar la posibilidad de que las dosis de fungicida hayan provocado un desfase tan elevado en la repetición 3. Una de las explicaciones puede ser que el hongo estuvo metabólicamente más activo que en las repeticiones 1 y 2. Es por eso que se observa un mayor crecimiento a los tres y seis días en todos los tratamientos incluyendo el control negativo (Flores, 2015, comunicación personal) (Tabla 3).

Detectar un fenómeno hormético se vuelve complicado en algunas ocasiones (Pradhan, 2015; Zhou et al., 2014). Existen múltiples factores que pueden provocar variaciones en los ensayos experimentales, tal y como lo indican Garzón y Flores (2013). Condiciones como la luz, la edad del inóculo y su estado metabólico, la edad de las dosis de fungicida a evaluar, el grosor del medio de cultivo, entre otras, pueden resultar en variaciones significativas del crecimiento del hongo y, por tanto, en una baja reproducibilidad de resultados. En esta investigación es lo que sucedió con la repetición 3.

El estrés hídrico es uno de los factores que más condicionan el crecimiento fúngico y la inducción de genes encargados de la producción de toxinas (Marín, 2010). En el estudio de Marín (2010), se determinó que las condiciones óptimas de crecimiento para *F. proliferatum* son mucho más restringidas que para otras especies toxígenas de *Fusarium* como *F. verticillioides*, por lo que también una variación en el contenido de agua en la

preparación del medio de cultivo para la repetición 3 pudo haber contribuido con un crecimiento más rápido del hongo.

**Tabla 3**

*Medidas (cm<sup>2</sup>) del área de crecimiento radial in vitro del aislado A1 en agar PDA modificado con iprodiona, obtenidas al tercer y sexto día con el software KLONK image measurement® (KLONK, Ringsted, Denmark).*

Dosis	Primera repetición					
	Día 3			Día 6		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<b>A</b>	0,53	0,6	0,57	3,53	2,75	2,65
<b>B</b>	1,88	1,86	1,86	6,48	7,01	6,58
<b>C</b>	7,38	7,37	7,35	23,64	23,92	23,58
<b>D</b>	8,02	7,98	8,34	24,93	25,55	26,01
<b>E</b>	8,1	8,41	8,53	24,78	24,15	24,47
<b>F</b>	8,57	8,46	8,55	26,25	26,30	27,35
<b>G</b>	8,01	8,22	8,23	25,12	23,54	23,71
<b>Control</b>	7,9	8,01	7,94	26,87	27,31	27,47
Dosis	Segunda repetición					
	Día 3			Día 6		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<b>A</b>	0,79	0,72	0,69	2,08	1,88	2,02
<b>B</b>	1,39	1,25	1,35	5,73	5,26	5,57
<b>C</b>	4,44	4,7	4,65	16,16	16,38	16,06
<b>D</b>	4,95	4,89	4,79	16,56	15,99	15,77
<b>E</b>	5,07	5,29	5,24	17,7	17,93	18,16
<b>F</b>	4,8	5,26	5,38	16,9	17	18,19
<b>G</b>	4,15	4,38	4,26	14,02	14,21	14,08

<b>Control</b>	5,01	5,23	5,19	16,36	15,26	15,81
<b>Dosis</b>	<b>Tercera repetición</b>					
	<b>Día 3</b>			<b>Día 6</b>		
	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>	<b>Réplica 1</b>	<b>Réplica 2</b>	<b>Réplica 3</b>
<b>A</b>	11,5	12,7	11,66	61,5	61,74	61,62
<b>B</b>	11,98	12,52	12,45	25,26	24,99	25,05
<b>C</b>	28,01	27,64	27,83	70,45	70,03	69,6
<b>D</b>	32,62	31,41	31,07	68,35	67,99	67,35
<b>E</b>	31,68	32,71	32,2	71,29	73	71,75
<b>F</b>	29,55	31,35	30,69	68,03	66,61	67,25
<b>G</b>	30,48	29,81	29,13	68,65	67,95	67,25
<b>Control</b>	30,95	28,69	26,43	69,02	70,55	67,5

El comportamiento del hongo se observó en un lapso de seis días, debido a que experimentalmente estos pueden adaptarse al fungicida y a las condiciones ambientales a lo largo del tiempo. Algunas cepas lo hacen de manera temprana y otras de manera tardía (Garzón, 2015, comunicación personal). Esto quiere decir que la respuesta estimuladora se puede dar a cualquier instante y que el efecto hormético desaparece eventualmente (Hoffman, 2009). Los datos mostrados en la Tabla 4 y en la Figura 14 confirman que la estimulación del crecimiento radial no siempre se da al tercer día. Los análisis estadísticos que corroboran las aseveraciones aquí indicadas se presentarán más adelante.

**Tabla 4**

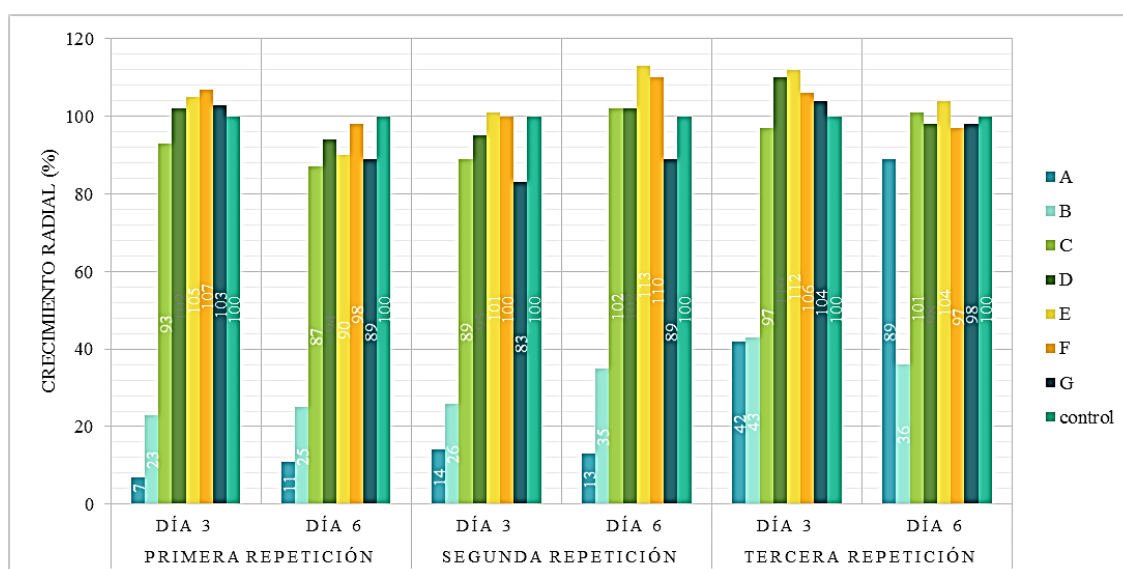
*Porcentajes de incremento o disminución del crecimiento radial in vitro del aislado A1 en agar PDA modificado con iprodiona en comparación con el control.*

<b>Dosis</b>	<b>Primera repetición</b>		<b>Segunda repetición</b>		<b>Tercera repetición</b>	
	<b>Día 3</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 6</b>
<b>A</b>	7	11	14	13	42	89

<b>B</b>	23	25	26	35	43	36
<b>C</b>	93	87	89	102	97	101
<b>D</b>	102	94	95	102	110	98
<b>E</b>	105	90	101	113	112	104
<b>F</b>	107	98	100	110	106	97
<b>G</b>	103	89	83	89	104	98

\* Los valores que se indican en cada repetición son los promedios de las tres réplicas.

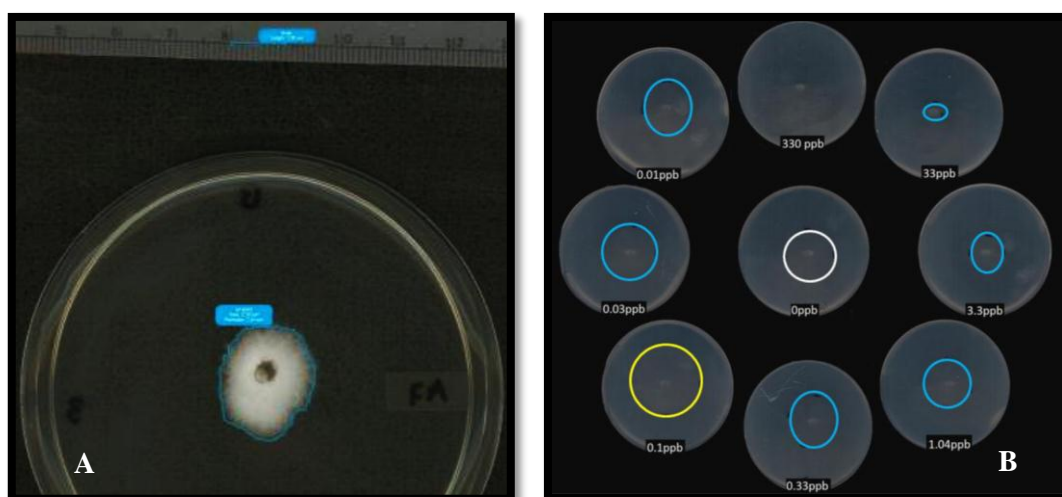
\*\* Los valores resaltados en color rojo indican una sobre estimulación (%) de crecimiento radial en relación al control



**Figura 14.** Crecimiento radial *in vitro* del aislado A1 en agar PDA modificado con iprodiona (expresado en porcentajes respecto al control).

Los valores (cm<sup>2</sup>) indicados en la Tabla 3 son inconsistentes para la repetición 3. Sin embargo, cuando estos son expresados en manera de porcentaje respecto al control, todas las repeticiones experimentan una estimulación de crecimiento frente al control, sea al tercer día, al sexto día o a ambos (Tabla 4 y Figura 14). En la primera y tercera repetición se puede notar una estimulación a los tres días, que va desde un 2 hasta un 12%, pero a los seis días la estimulación desciende a un 4% hasta una estimulación nula. Por el contrario, en la segunda repetición al tercer día, se observa una estimulación del 1% frente a la dosis sub inhibitoria E, pero esta estimulación aumenta hasta un 13% en el sexto día.

En estudios donde se evalúa la respuesta de ciertos hongos frente a distintos fungicidas, no se menciona una variación tan significativa entre repeticiones, o se realiza un análisis selectivo para adaptarse a las variaciones de los datos obtenidos (Flores y Garzón, 2013; Garzón et al., 2011; Marín et al., 2013; Marín, Sanchis, Ramos, Viñas y Magan, 1998; Zhou et al., 2014). No obstante, la técnica que se utilizó en dichos estudios para medir el área de crecimiento radial generalmente se basa en realizar mediciones de dos de sus diámetros perpendiculares entre sí y con el valor promedio obtener el área (Figura 15 B), asumiendo que el crecimiento micelial siempre es circular o regular. Mientras que en el presente estudio, se utilizó un software que permite calcular el área de crecimiento de una manera más precisa, especialmente cuando el área de crecimiento radial es irregular (Figura 15 A). Lo anteriormente mencionado sugiere que, de haber existido variaciones en los valores de crecimiento radial entre repeticiones en dichos estudios, existe la posibilidad de que hayan sido obviadas debido a la metodología utilizada.



**Figura 15.** Comparación entre el método de medición del área de crecimiento radial en el presente estudio (A) frente al de Flores y Garzón, (2013) (B).

#### 4.1.2. Aislado A7

Un total de 144 mediciones fueron realizadas en el aislado A7. Sin embargo, se observaron diferencias muy altas en la repetición 3 en comparación con las demás repeticiones (Tabla 5), siguiendo la misma tendencia que el aislado A1. Esto pudo haberse dado por las razones antes mencionadas. Los análisis estadísticos que respaldan lo aquí mencionado se abarcarán con detalle en apartados posteriores.

**Tabla 5**

Medidas (cm<sup>2</sup>) del área de crecimiento radial *in vitro* del aislado A7 en agar PDA modificado con iprodiona, obtenidas al tercer y sexto día con el software KLONK image measurement® (KLONK, Ringsted, Denmark).

Dosis	Primera repetición					
	Día 3			Día 6		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<b>A</b>	1,43	1,89	1,4	3	3,21	2,87
<b>B</b>	2,48	2,22	2,79	6,42	6,23	6,88
<b>C</b>	7,43	7,18	6,89	20,57	20,8	19,8
<b>D</b>	7,35	7,83	7,95	21,77	21,49	21,41
<b>E</b>	7,51	7,63	7,87	18,99	20,15	19,56
<b>F</b>	8,15	7,93	8,85	20,73	21,77	21
<b>G</b>	7,72	8,07	7,56	18,8	17,5	18,66
<b>Control</b>	7,58	7,46	8,01	19,69	19,66	19,68
Dosis	Segunda repetición					
	Día 3			Día 6		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<b>A</b>	0,67	0,58	0,68	2,05	1,69	2,06
<b>B</b>	1,58	2,18	1,76	6,2	5,75	5,68
<b>C</b>	4,37	4,25	4,19	11,68	11,49	11,29
<b>D</b>	4,78	4,67	4,43	13,84	13,85	13,85
<b>E</b>	4,18	4,3	4,39	14,48	12,48	13,95
<b>F</b>	4,42	4,62	4,9	14,79	14,3	15,28
<b>G</b>	2,99	3,06	3,51	11,69	11,47	11,9
<b>Control</b>	5,49	5,72	5,35	19,62	20,89	19,55
Dosis	Tercera repetición					
	Día 3			Día 6		

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<b>A</b>	12,32	13,41	12,22	23,35	25,9	24,63
<b>B</b>	12,97	13,64	13,31	54,2	51,75	56,64
<b>C</b>	31,24	32,05	32,04	70,17	67,1	64,03
<b>D</b>	30,15	31,77	33,55	61,2	61,43	61,65
<b>E</b>	31,35	32,46	30,91	69,15	67,2	65,25
<b>F</b>	30,13	33,06	31,6	60,22	59,33	59,78
<b>G</b>	32,12	33,06	32,58	44,71	45,37	42,15
<b>Control</b>	31,26	32,41	32,12	72,71	71,6	72,1

Al obtener los porcentajes de estimulación de crecimiento radial frente al control (Tabla 6 y Figura 16), se puede observar que, si bien en la primera repetición las dosis sub inhibitorias provocan una estimulación de 1 hasta un 10% del crecimiento radial tanto al tercer día como al sexto día, en la segunda repetición desaparece el patrón estimulador. En cambio, en la tercera repetición se da una mínima estimulación frente a la dosis sub inhibitoria G. Estos resultados tan inconstantes afectan a la demostración de un fenómeno hormético estadísticamente significativo, como se indicará más adelante.

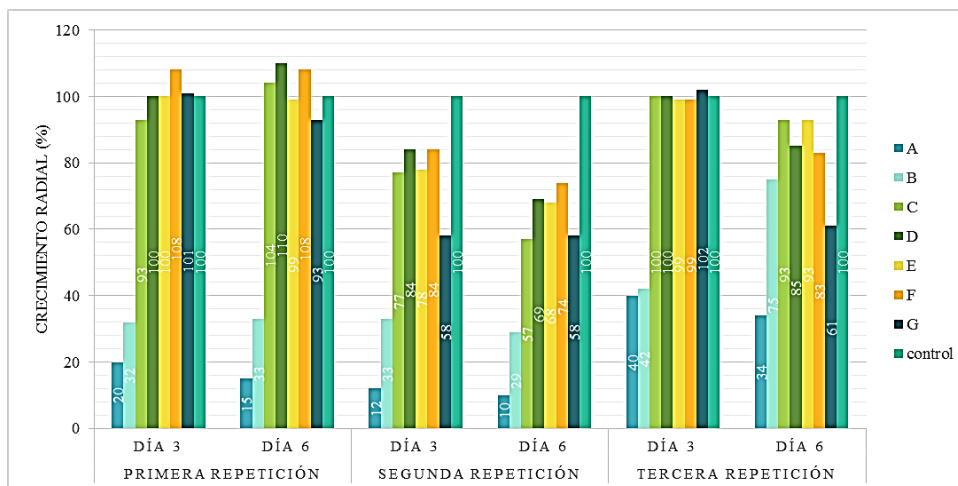
**Tabla 6**

*Porcentajes de incremento o disminución del crecimiento radial in vitro del aislado A7 en agar PDA modificado con iprodiona en comparación con el control.*

Dosis	Primera repetición		Segunda repetición		Tercera repetición	
	Día 3	Día 6	Día 3	Día 6	Día 3	Día 6
<b>A</b>	20	15	12	10	40	34
<b>B</b>	32	33	33	29	42	75
<b>C</b>	93	104	77	57	100	93
<b>D</b>	100	110	84	69	100	85
<b>E</b>	100	99	78	68	99	93
<b>F</b>	108	108	84	74	99	83
<b>G</b>	101	93	58	58	102	61

\* Los valores que se indican en cada repetición son los promedios de las tres réplicas.

\*\* Los valores resaltados en color rojo indican una sobre estimulación de crecimiento radial en relación al control



**Figura 16.** Crecimiento radial *in vitro* del aislado A7 en agar PDA modificado con iprodiona (expresado en porcentajes respecto al control).

Es importante señalar que las variaciones encontradas entre repeticiones tanto en el aislado A1 como en el A7 pueden ser el resultado de haber trabajado con dosis de fungicida tan mínimas como  $1,27 \cdot 10^{-4}$  ppm. El mismo hecho de utilizar dosis sub inhibitorias de fungicidas a concentraciones en ppm permite que cualquier ligera variación al momento de realizar las diluciones se traduzca en un error experimental.

Otro factor importante a considerar es la viscosidad de la solución madre de iprodiona con la que se hicieron las diluciones, que debido a su alta concentración, los volúmenes transferidos a la primera dilución no siempre fueron los mismos.

## 4.2. Cuantificación de fumonisinas

### 4.2.1. Aislado A1

Los resultados de cuantificación de FB1 en el aislado A1 fueron nulos, como se resumen en la Tabla 7.

A pesar de que, previamente, los aislados A1 y A7 ya fueron sometidos a pruebas de cuantificación de fumonisinas (Gard, 2014, datos no publicados), el procedimiento fue realizado nuevamente con el fin de observar el comportamiento del hongo cuando éste es sometido a dosis sub inhibitorias de fungicida.

La hipótesis que se planteó en esta investigación fue que las dosis sub inhibitorias de iprodiona estimulan o inducen a una mayor producción de fumonisina B1. De hecho, en estudios como el de Marín et al. (2013) se demostró que dosis sub inhibitorias de fungicida combinadas con estrés hídrico y temperaturas menores a 35°C inducen significativamente la expresión del gen FUM1, responsable de la producción de FB1 en algunas especies de *Fusarium*, incluyendo a *F. proliferatum*. Sin embargo, era incierta la posibilidad de que, bajo dosis sub inhibitorias de fungicida, un aislado de *F. proliferatum* genéticamente no productor de FB1 sea capaz de sufrir una activación de los genes productores de fumonisina (FUM1) y una consecuente biosíntesis de fumonisina. Tampoco existen estudios que contemplen esa posibilidad.

*F. proliferatum* puede ser productor o no de fumonisina B1. En un estudio de Stankovic et al. (2007), se evaluó la producción de FB1 en 11 aislados de *F. proliferatum*, donde se encontró que tres de los once aislados (dos provenientes de cebolla y uno de ajo) fueron negativos para la producción de FB1. El aislado A1 (proveniente de cebolla) evaluado en el presente estudio confirma la veracidad de los datos obtenidos por Gard en el 2014 (Apartado 3.2. y Anexo 3), en donde se determinó al aislado A1 como no productor de fumonisina B1.

Los resultados obtenidos permiten concluir que no es posible que una inducción en la producción de FB1 sea observada (*in vitro*) en un aislado de *F. proliferatum* genéticamente no productor de FB1, cuando el mismo es enfrentado a dosis sub inhibitorias de iprodiona. Por tanto, no se realizó el análisis estadístico respectivo en el ensayo de cuantificación de fumonisinas del aislado A1.

**Tabla 7**

*Cuantificación de fumonisinas B1 (ppm) del aislado A1 mediante el método HPLC realizado en la Universidad de Arkansas. Bluhm, 2015.*

Dosis	Primera repetición				Segunda repetición			
	Día 3		Día 6		Día 3		Día 6	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
A	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0

Pese a las observaciones realizadas *in vitro*, sería recomendable verificar si los resultados son los mismos cuando se realiza el experimento *in vivo* puesto que, en condiciones de campo, *F. proliferatum* es susceptible a diferentes factores como temperatura, disponibilidad de agua, etc., y no solo a dosis sub inhibitorias de fungicida. También, estudios moleculares posteriores permitirían conocer más acerca de la expresión genética de una cepa de *F. proliferatum* no productora de FB1, cuando ésta se enfrenta a dosis sub inhibitorias de fungicida.

#### **4.2.2. Aislado A7**

Como se mencionó antes, los datos de la cuantificación de FB1 en la cepa A7 de *F. proliferatum* (obtenidos en el 2014, mediante el método de HPLC realizado en el laboratorio de diagnóstico de enfermedades animales de Oklahoma), originaron problemas de interpretación, ya que dicho método no cuantificó cantidades de toxinas mayores a 700 ppm. A consecuencia de esto, los datos recopilados no fueron exactos, sino únicamente estimados, ya que excedieron los rangos de cuantificación del equipo de HPLC utilizado. Para una mejor comprensión del funcionamiento del equipo HPLC se adjunta el protocolo de cuantificación de FB1 por HPLC en el Anexo 12.

Para esta investigación, se consideró importante utilizar un método HPLC con una capacidad de cuantificación mayor, que permitiera conocer qué tan alta puede llegar a ser la producción de fumonisinas en este hongo, y particularmente en esta cepa. Recordemos que la cepa A7 fue aislada de una cebolla aparentemente sana, adquirida en un supermercado local de Stillwater, Oklahoma, de manera, que la ausencia de sintomatología no quiere decir ausencia de toxicidad. Es por tal razón que las muestras recolectadas fueron enviadas al laboratorio de Ciencias de Plantas de la Universidad del Estado de Arkansas, donde cuentan con un equipo de HPLC capaz de cuantificar cantidades mayores de toxinas.

En la Tabla 8 se observa que en el presente estudio el rango de producción de FB1 estuvo comprendido entre 0 y 4191,49 ppm. Sin embargo, en el estudio de Reyes (2001), una variación bastante alta fue encontrada en la producción de FB1 de una cepa de *F. verticillioides*; la cual fue de 700 a 2280 ppm. Además, el método de extracción fue el mismo que se utilizó en este estudio (HPLC). Así que, la variabilidad en la cuantificación de fumonisinas B1 por el método de HPLC, no solo es observada en la especie *F.*

*proliferatum* sino también en *F. verticillioides*. Por consiguiente, se puede presumir que mientras las vías responsables de la biosíntesis de fumonisinas no estén claras (Jurado et al., 2009), la cuantificación de las mismas y la obtención de cantidades más estables entre repeticiones seguirá siendo un reto.

Nótese también cómo, al tercer día, el nivel de fumonisinas no supera las 89,99 ppm a excepción de una de las réplicas, pero al sexto día, bajo influencia de la dosis sub inhibitoria de iprodiona F (0,001271 ppm), la cantidad de micotoxina producida es alarmantemente alta (4191,49 ppm). En este punto vale la pena mencionar de nuevo que los límites seguros de contenido de fumonisinas, establecidos por la FDA (2001) en alimentos como el maíz y otros destinados al consumo humano capaces de albergar fumonisinas, no deberían sobrepasar las 4 ppm.

Con los resultados recopilados en el presente estudio, se puede inferir que 72 horas son suficientes para que el maíz expuesto al hongo *F. proliferatum* pueda ser totalmente tóxico y potencialmente letal en humanos, y que la cantidad de fumonisina producida incrementa con los días de almacenamiento.

Otra observación preocupante es el hecho de que la tasa de aplicación mínima recomendada por la casa comercial del fungicida, que se la denominó dosis A, no tiene la capacidad de reducir al máximo la producción de micotoxina.

**Tabla 8**

*Cuantificación de fumonisinas B1 (ppm) en el aislado A7 mediante el método HPLC realizado en la Universidad de Arkansas. Bluhm, 2015.*

Dosis	Primera repetición				Segunda repetición			
	Día 3		Día 6		Día 3		Día 6	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
A	11,02	18,02	183,23	145,47	22,21	14,46	1326,83	1849,36
E	74,41	57,44	394,98	289,55	56,51	78,04	1895,27	140,76
F	89,99	63,7	75,41	280,88	38,38	84,99	175,2	4191,49
G	54,56	69,36	423,06	249,4	27,92	26,95	3826,29	2481,68
Control	82,16	72,64	293,87	0	12,81	884,23	3615,68	3106,34

Lamentablemente, por motivos de financiamiento, el número de muestras a enviar fue limitado y, por esta razón, no se pudieron hacer más repeticiones ni réplicas, las mismas

que hubiesen ayudado a recolectar datos más similares y comparables, debido a que gran parte de los valores obtenidos no reflejan una uniformidad, ni siguen un patrón constante entre réplicas ni entre repeticiones.

Probablemente, es por las variaciones observadas en éste y otros estudios, que varios autores decidieron evaluar la expresión de los genes encargados de la producción de fumonisinas, en lugar de la cuantificación de fumonisinas (Bluhm, Cousin y Woloshuk, 2004; Brown, Butchko, Busman y Proctor, 2007; Kohut, Ádán, Fazekas y Hornok, 2009; Marín, 2010). También han inducido la producción de fumonisinas utilizando la técnica de ELISA (Jurado et al., 2009) o han utilizado medios líquidos en lugar de medios sólidos (Jiménez, Mateo, Hinojo y Mateo, 2003).

A pesar de que se observa una sobreproducción de FB1 de hasta un 16% (Tabla 9) en relación con el control, la variabilidad de los datos obtenidos no permiten concluir que se trata de un fenómeno hormético (como se demostrará más adelante). Además cabe recalcar que se está hablando de concentraciones en ppm. Por lo tanto, al existir errores mínimos experimentales o de carácter sistemático, los resultados podrían estar representados en un rango sumamente variable (Flores, 2016, comunicación personal). También, el hecho de que las fumonisinas sean metabolitos secundarios, hace que cualquier variación en los factores que regulan el metabolismo secundario de *F. proliferatum* afecte a la biosíntesis de esta micotoxina. Lastimosamente, sus vías metabólicas aún no han sido elucidadas por completo (González-Jaén et al., 2004).

**Tabla 9**

*Porcentajes de incremento o disminución de fumonisinas B1 (ppm), en comparación con el control, del aislado A7 evaluado a una dosis recomendada (A) y 3 dosis sub inhibitorias (E, F, G) de iprodiona.*

Dosis	Primera repetición		Segunda repetición	
	Día 3	Día 6	Día 3	Día 6
A	19	56	53	96
E	85	116	70	85
F	99	61	35	86
G	80	114	6	94

\* Los valores que se indican en cada repetición son los promedios de las dos réplicas.

\*\* Los valores resaltados en color rojo indican una sobre estimulación de crecimiento radial en relación al control

### 4.3. Análisis estadístico

#### 4.3.1. Análisis hormético

##### 4.3.1.1. Ensayo de crecimiento radial

###### 4.3.1.1.1. Aislado A1

Aunque los valores del área de crecimiento radial exhibieron ciertas inconsistencias entre repeticiones, los parámetros horméticos definidos con el programa SAS® (SAS System for PC, v. 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC) y sus respectivos valores de respuesta, permitieron modelar una curva típica hormética (Figura 17), con forma de U invertida como se puede observar en algunos estudios (Flores y Garzón, 2013; Garzón y Flores, 2013; Guedes, Magalhães y Cosme, 2009; Hoffman, 2009; Pradhan, 2015), así como también lo menciona Weis (2000).

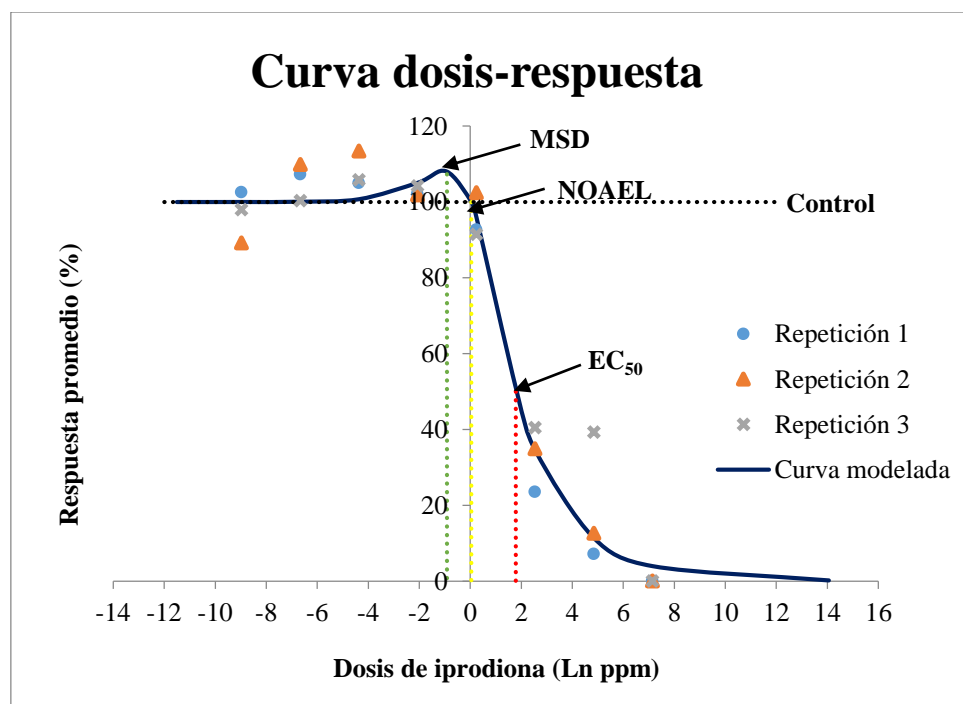


Figura 17. Curva dosis-respuesta del aislado A1.

Recordemos la ecuación de la curva:  $E\left[\frac{y}{x}\right] = \delta + \frac{\alpha - \delta + \gamma x}{1 + \omega \exp\left[\beta \ln\left(\frac{x}{NOAEL}\right)\right]}$

En el eje X se encuentran los valores de respuesta en porcentajes, en comparación con el control. En el eje Y se encuentran todas las dosis evaluadas más los parámetros NOAEL, MSD y EC50, todos ellos transformados a sus logaritmos naturales.

A continuación se resumen los parámetros que permitieron modelar la curva hormética. Vale la pena señalar que dichos parámetros fueron estimados a partir de un límite de confianza del 95%. Todos ellos fueron obtenidos mediante el código de programación SAS detallado en el Anexo 10.

**Tabla 10**

*Parámetros horméticos resultantes del crecimiento radial en el aislado A1.*

Parámetro	Valor dosis (ppm)	Valor de respuesta (%)
EC <sub>50</sub>	5.99	50
Beta (β)	1.48	N.A.
Gamma (γ)	54.35	N.A.
NOAEL	1.04	99.997
MSD	0.40	107.04

\* N.A.= no aplica

El aislado A1, en términos de crecimiento micelial, exhibió un comportamiento hormético, y fue demostrado estadísticamente con el software SAS y también según indica la literatura sobre hormesis, especialmente en cuanto a los parámetros establecidos para la demostración de un fenómeno hormético (Calabrese y Baldwin, 1997).

Como se puede ver en la Tabla 10, el NOAEL fue determinado a una dosis de 1.04 ppm cuyo valor de respuesta fue 99.997%. En otras palabras, a una concentración de iprodiona de 1.04 ppm, ya no puede ser detectada una respuesta hormética. Cinco dosis menores al NOAEL fueron evaluadas, éstas son: D, E, F, G y el control. La zona hormética se encuentra comprendida entre tres de las dosis evaluadas bajo el NOAEL (Figura 17), aunque se hubiera obtenido una curva hormética más definida si se hubiera evaluado un mayor número de dosis dentro de esa zona. La mayor dosis de estimulación o MSD fue

0.40 ppm, la misma que exhibió un 7% de incremento en relación con el control. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Flores y Garzón (2013). El valor de  $\gamma$  fue positivo ( $54.35 \pm 22.4$ ).

Los resultados hallados en el aislado A1 exponen, por primera vez, que dosis sub inhibitorias de fungicida provocan un fenómeno hormético en *F. proliferatum*. A pesar de que esta cepa es no-productora de FB1, las implicaciones que tiene este hallazgo en la agricultura son altas, pues aún pequeñas estimulaciones en crecimiento micelial pueden resultar en una virulencia significativamente mayor en la planta y, por ende, una reducción en la productividad del cultivo (Garzón et al., 2011). Un test de patogenicidad en maíz o cebolla, con dosis sub inhibitorias de iprodiona y otros fungicidas utilizados para combatir a *F. proliferatum* sería importante realizar para apoyar los resultados obtenidos en esta investigación.

El manejo efectivo de enfermedades producidas por *F. proliferatum* podría verse beneficiado por este estudio, ya que, evidentemente, fenómenos horméticos en este fitopatógeno pudieron haber sido ignorados a lo largo de este tiempo.

Queda justificada la importancia que tiene el elegir la dosis de fungicida adecuada y que al abaratar costos de producción, utilizando dosis sub inhibitorias de fungicidas, solo se está empeorando el problema.

#### **4.3.1.1.2. Aislado A7**

Una respuesta hormética no pudo ser visualizada en el aislado A7. La falta de consistencia de los datos de crecimiento radial fue un inconveniente.

A más de los criterios para evaluar una respuesta hormética que Calabrese y Baldwin señalaron en 1997, Crump estableció los suyos en 2001, indicando que la inconsistencia de datos experimentales regularmente no logra demostrar hormesis. Otros requisitos que menciona el mismo autor son la robustez de datos, la solidez de pruebas y la plausibilidad biológica.

En contraste con el aislado A1, este mostró lo opuesto a las aseveraciones de Crump (2001). Como se puede apreciar en la Tabla 11, el valor de respuesta del NOAEL y del MSD difieren en una décima y otros autores sugieren que, en condiciones ideales, el NOAEL debería ser de tres a seis veces mayor al MSD, aunque también se puede detectar

hormesis si esto no se cumple (Garzón y Flores, 2013). Este es el caso del aislado A1 donde el NOAEL fue 2.6 veces mayor que el MSD y se pudo detectar una respuesta hormética gracias a los valores de respuesta que dichos parámetros indujeron. Pero en este caso en particular, a pesar de que el NOAEL sobrepasó un 2.4 veces al MSD y fue casi similar al aislado A1, la curva modelada y sobre todo los datos estadísticos evidenciaron una falta de respuesta. Además que los valores de respuesta no sobrepasan al control (100%).

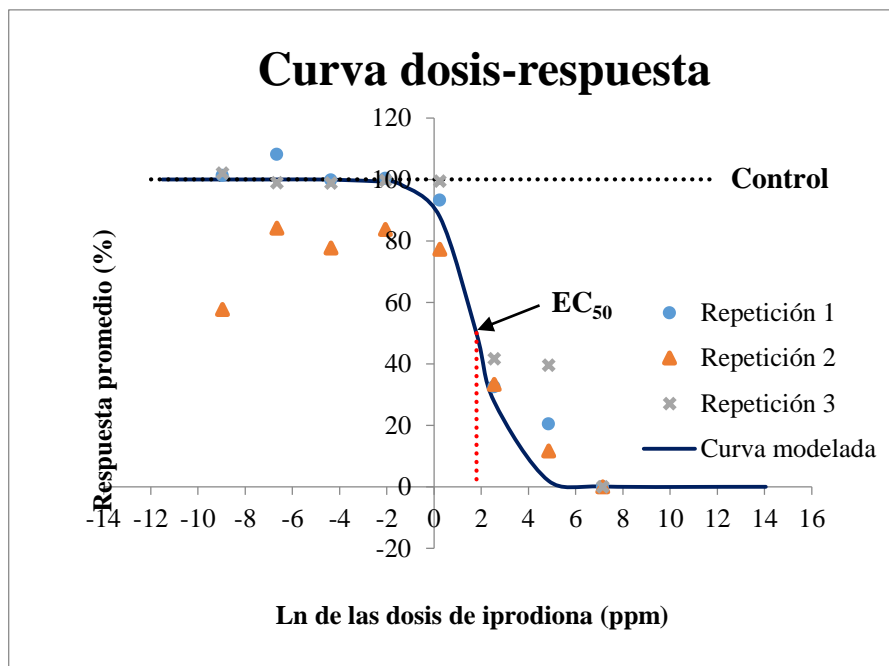
**Tabla 11**

*Parámetros horméticos resultantes del crecimiento radial en el aislado A7.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor (ppm)</b>	<b>Valor de respuesta (%)</b>
EC <sub>50</sub>	6.01	50
Beta ( $\beta$ )	1.28	N.A.
Gamma ( $\gamma$ )	38.89	N.A.
NOAEL	0.24	98.35
MSD	0.10	99.48

\* N.A.= no aplica

Al ingresar los datos (Tabla 11) en el programa Microsoft Excel 2013® (Microsoft, Redmond, WA) se obtuvo la siguiente curva monofásica.



**Figura 18.** Curva dosis-respuesta del aislado A7.

La ausencia de hormesis en el aislado A7, por el momento, indica que las dosis evaluadas de iprodiona no causan ningún efecto sobre-estimulador en el hongo. A futuro, existe la posibilidad de demostrar lo contrario si se mejora la consistencia de los datos de crecimiento radial. Es importante demostrar la presencia o ausencia de un fenómeno hormético en este aislado, puesto que la cantidad de FB1 que produce es demasiado alta y las consecuencias en salud humana, animal, agrícola, etc., serían devastadoras si se estuviese ignorando un fenómeno hormético.

#### 4.3.1.2. Ensayo de cuantificación de fumonisinas

##### 4.3.1.2.1. Aislado A1

Ningún análisis hormético fue realizado, por las razones ya antes mencionadas.

##### 4.3.1.2.2. Aislado A7

Independientemente de que los valores de área de crecimiento radial hayan proyectado una curva no-hormética (Figura 18), se buscó correlacionar el patrón de respuesta en términos de producción de fumonisinas con la respuesta producida en términos de

crecimiento radial, cuando *F. proliferatum* es sometido a dosis sub inhibitorias de fungicida.

Lo que se esperaba demostrar era una correlación positiva entre la producción de FB1 y el crecimiento radial en el aislado A7 (Tabla 6), ya que, ciertamente, se ha visto que un aumento en la expresión del gen FUM1 (bajo condiciones de estrés), se ve acompañado también de un aumento de biomasa del hongo (Marín, 2010).

Si comparamos la tabla 6 con la tabla 9, los valores de respuesta no son semejantes entre ensayos, sin embargo ambos comparten una misma característica y es que la máxima estimulación se vio en el sexto día de la primera repetición. En el ensayo de crecimiento radial se produjo una estimulación del 10% y en el ensayo de cuantificación de FB1 se produjo una estimulación del 16%.

Sin embargo, el coeficiente de correlación calculado en el programa Microsoft Excel 2013® (Microsoft, Redmond, WA) fue de 0.54 e indicó una correlación positiva débil. Este hallazgo sugiere que, a pesar de la inconsistencia de los datos, existe una cierta relación directa entre la producción de FB1 con el crecimiento micelial. Seguramente, la variabilidad de los datos fue causa de un error experimental, más no de un error sistemático.

Una de las causas puede ser la técnica que se utilizó para inducir la producción de FB1 en maíz. En este estudio se inoculó *F. proliferatum* mediante discos de agar con micelio. Este procedimiento también ha sido realizado en otros estudios como el de Waśkiewicz et al. (2013).

Por otro lado, Bluhm, Flaherty, Cousin y Woloshuk (2002) inocularon exactamente  $5 \cdot 10^4$  conidias de dos especies de *Fusarium* en maíz autoclavado. Sin embargo, no mencionan su metodología de conteo de esporas. Técnicas de inoculación estándar como ésta se creería que evitarían irregularidades en los resultados de cuantificación de fumonisinas. Pero es curioso observar que en el estudio de Falcao et al. (2010), para el ensayo de cuantificación de fumonisinas por HPLC, inocularon exactamente  $10^6$  conidias y aún así la desviación estándar entre sus réplicas fue de hasta 723, lo que indica una alta variabilidad de resultados. Esto revela lo complicado que se vuelve el recopilar datos consistentes cuando se realiza una cuantificación de fumonisinas.

Otra solución a este problema sería medir la densidad óptica de la solución de esporas con un espectrofotómetro para estimar su concentración de una manera más exacta. Sin

embargo, esto tendría que probarse a nivel de laboratorio. De todas maneras, es evidente que no fue sólo la técnica de inoculación de esporas lo que ocasionó una alta variabilidad de datos.

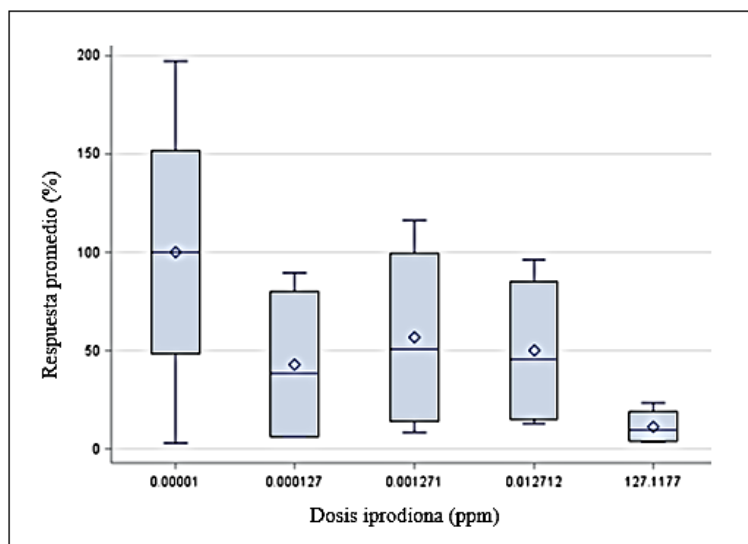
La falta de repeticiones en el ensayo en conjunto con la utilización de una técnica de inoculación que arroja resultados inconsistentes, fueron razones suficientes para que los parámetros horméticos sean inválidos y se descarte estadísticamente una respuesta hormética (Tabla 12).

**Tabla 12**

*Parámetros horméticos resultantes de la cuantificación de FBI en el aislado A7.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor (ppm)</b>
EC <sub>50</sub>	0.0035
Beta ( $\beta$ )	1.06
Gamma ( $\gamma$ )	-1285.1
NOAEL	1.57
MSD	1.33

Los parámetros resumidos en la Tabla 12 indican claramente la ausencia de hormesis. A pesar de que el NOAEL fue determinado, nótese como ninguna dosis se encuentra entre la zona hormética (entre MSD y NOAEL). El valor de  $\gamma$  es negativo ( $-1285.1 \pm 21334.7$ ) y con una desviación estándar extremadamente alta, contrario a lo que exponen Calabrese y Baldwin (1997). Por tales motivos, los parámetros no fueron ingresados en el programa Microsoft Excel 2013® (Microsoft, Redmond, WA) y, por consiguiente, no se obtuvieron los valores de respuesta. En su lugar, el diagrama de caja (Figura 19), desplegado en el programa SAS® (SAS System for PC, v. 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC), demuestra por qué fue imposible modelar la curva dosis respuesta y, por ende, demostrar estadísticamente un fenómeno hormético.



**Figura 19.** Distribución de la respuesta (%) en términos de producción de FB1 en relación con el control frente a las dosis de fungicida evaluadas en el aislado A7

La Figura 19 representa el porcentaje promedio  $\pm$  la desviación estándar de cada una de las respuestas originadas frente a las dosis de fungicida evaluadas.

Evidentemente los efectos que tienen los fungicidas sobre la biosíntesis de fumonisinas permanecen aún precarios (Falcao et al., 2011), por lo que es importante ampliar la investigación en este campo, ya que distintos factores pueden verse inmiscuidos en este proceso.

#### 4.3.2. T de Student

Con el fin de complementar el análisis estadístico hormético, realizado en el apartado 4.3.1., se realizó un T de Student específicamente para el aislado A1, porque fue el que exhibió una respuesta hormética.

Con un nivel de significación de 0.05, se observó que la respuesta en términos de crecimiento radial del aislado A1 (expuesto a dosis sub inhibitorias de iprodiona) fue significativamente mayor que el control negativo.

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, así como también entre el control y las dosis sub inhibitorias. Las diferencias que fueron interesantes observar son las que corresponden a las dosis sub inhibitorias 0.012712 y 0.001271 comparadas con el control, como se puede observar en la Tabla 13.

**Tabla 13.***Prueba T de Student para el área de crecimiento radial del aislado A1.*

Rangos de comparación	Diferencias entre medias	Límites de confianza (95%)		
0.012712 - 0.001271	3.393	-2.053	8.840	
0.012712 - 0.127118	6.498	1.051	11.944	***
0.012712 - 0.00001	9.202	3.755	14.648	***
0.012712 - 1.271177	11.637	5.670	17.603	***
0.012712 - 0.000127	13.318	7.352	19.285	***
0.012712 - 12.71177	76.244	70.798	81.691	***
0.012712 - 127.1177	99.330	93.363	105.297	***
0.001271 - 0.012712	-3.393	-8.840	2.053	
0.001271 - 0.127118	3.104	-1.767	7.976	
0.001271 - 0.00001	5.808	0.937	10.680	***
0.001271 - 1.271177	8.243	2.797	13.690	***
0.001271 - 0.000127	9.925	4.478	15.372	***
0.001271 - 12.71177	72.851	67.979	77.723	***
0.001271 - 127.1177	95.937	90.490	101.383	***
0.127118 - 0.012712	-6.498	-11.944	-1.051	***
0.127118 - 0.001271	-3.104	-7.976	1.767	
0.127118 - 0.00001	2.704	-2.168	7.575	
0.127118 - 1.271177	5.139	-0.308	10.586	
0.127118 - 0.000127	6.821	1.374	12.267	***
0.127118 - 12.71177	69.747	64.875	74.618	***
0.127118 - 127.1177	92.832	87.386	98.279	***
0.00001 - 0.012712	-9.202	-14.648	-3.755	***
0.00001 - 0.001271	-5.808	-10.680	-0.937	***
0.00001 - 0.127118	-2.704	-7.575	2.168	
0.00001 - 1.271177	2.435	-3.012	7.882	
0.00001 - 0.000127	4.117	-1.330	9.564	
0.00001 - 12.71177	67.043	62.171	71.915	***
0.00001 - 127.1177	90.128	84.682	95.575	***
1.271177 - 0.012712	-11.637	-17.603	-5.670	***

1.271177 - 0.001271	-8.243	-13.690	-2.797	***
1.271177 - 0.127118	-5.139	-10.586	0.308	
1.271177 - 0.00001	-2.435	-7.882	3.012	
1.271177 - 0.000127	1.682	-4.285	7.648	
1.271177 - 12.71177	64.608	59.161	70.054	***
1.271177 - 127.1177	87.693	81.727	93.660	***
0.000127 - 0.012712	-13.318	-19.285	-7.352	***
0.000127 - 0.001271	-9.925	-15.372	-4.478	***
0.000127 - 0.127118	-6.821	-12.267	-1.374	***
0.000127 - 0.00001	-4.117	-9.564	1.330	
0.000127 - 1.271177	-1.682	-7.648	4.285	
0.000127 - 12.71177	62.926	57.479	68.373	***
0.000127 - 127.1177	86.012	80.045	91.978	***
12.71177 - 0.012712	-76.244	-81.691	-70.798	***
12.71177 - 0.001271	-72.851	-77.723	-67.979	***
12.71177 - 0.127118	-69.747	-74.618	-64.875	***
12.71177 - 0.00001	-67.043	-71.915	-62.171	***
12.71177 - 1.271177	-64.608	-70.054	-59.161	***
12.71177 - 0.000127	-62.926	-68.373	-57.479	***
12.71177 - 127.1177	23.086	17.639	28.532	***
127.1177 - 0.012712	-99.330	-105.297	-93.363	***
127.1177 - 0.001271	-95.937	-101.383	-90.490	***
127.1177 - 0.127118	-92.832	-98.279	-87.386	***
127.1177 - 0.00001	-90.128	-95.575	-84.682	***
127.1177 - 1.271177	-87.693	-93.660	-81.727	***
127.1177 - 0.000127	-86.012	-91.978	-80.045	***
127.1177 - 12.71177	-23.086	-28.532	-17.639	***

\*\*\*Diferencias estadísticamente significativas al nivel de significación de 0.05.

El análisis hormético realizado con el programa estadístico SAS no pudo determinar diferencias significativas a dichas dosis. En su lugar demostró que una dosis de 0.40 ppm de iprodiona fue la dosis responsable de provocar un fenómeno hormético en el aislado A1.

Estos resultados permiten concluir que el análisis estadístico realizado según el modelo de regresión no-lineal Brain-Cousens es más específico, lo que quiere decir que está más adaptado a un fenómeno hormético real. De esta manera, los resultados obtenidos mediante la prueba de T de Student sólo muestran de manera general las diferencias significativas entre tratamientos.

### 4.3.3. ANOVA

Para el ensayo de crecimiento radial y producción de FB1 en el aislado A7, se decidió hacer un análisis estadístico complementario al análisis hormético. Se realizó un ANOVA de un factor con el fin de determinar, de manera general, si existieron o no diferencias significativas entre el control y las dosis sub inhibitorias de fungicida. No se realizó un análisis estadístico hormético ni de varianza en el ensayo de producción de fumonisinas del aislado A1 debido a su naturaleza no-productora de micotoxina.

En cuanto a los datos del área de crecimiento radial del aislado A7, se realizó un ANOVA comparando los tratamientos correspondientes a las 5 últimas dosis sub inhibitorias (C, D, E, F y G) y el control negativo en el tercer día. A continuación se presentan las tablas:

**Tabla 14.**

*Prueba de ANOVA para el ensayo de crecimiento radial del aislado A7. Comparaciones entre los tratamientos C, D, E, F, G y Control.*

<b>RESUMEN</b>				
<b>Grupos</b>	<b>Cuenta</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>Varianza</b>
C	3	270	90	139
D	3	284	94,6666667	85,333333
E	3	277	92,3333333	154,33333
F	3	291	97	147
G	3	261	87	631
CONTROL	3	300	100	0

**ANÁLISIS DE  
VARIANZA**

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
Entre grupos	335,1666	5	67,033333	0,347723	0,8740376
Dentro de los grupos	2313,333	12	192,77777		
<b>Total</b>	<b>2648,5</b>	<b>17</b>			

Con un valor de significación del 0,05 y un valor  $P=0,874$ , se puede deducir que no existen diferencias significativas entre tratamientos. Este resultado concuerda con los resultados del análisis estadístico de hormesis realizado en el apartado 4.3.1.2.

Adicionalmente se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor para los datos de la cuantificación de fumonisinas en el aislado A7. Los resultados del análisis se presentan a continuación:

**Tabla 15.**

*Prueba de ANOVA para el ensayo de cuantificación de FB1 del aislado A7. Comparaciones entre los tratamientos E, F, G y Control.*

**RESUMEN**

<b>Grupos</b>	<b>Cuenta</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>Varianza</b>
E	2	201	100,5	480,5
F	2	147	73,5	312,5
G	2	208	104	200
CONTROL	2	200	100	0

**ANÁLISIS DE  
VARIANZA**

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>
Entre grupos	1195	3	398,333333	1,604565	0,321599
Dentro de los grupos	993	4	248,25		

Total	2188	7
-------	------	---

---

Con un nivel de significación de 0,05 y  $P= 0,322$ , se llega a la conclusión de que no existieron diferencias entre las dosis sub inhibitorias y el control. Los datos aquí presentados soportan los resultados del análisis estadístico hormético detallado en el apartado 4.3.2.2.

## CONCLUSIONES

- La dosis sub inhibitoria de iprodiona de 0.40 ppm, produjo una estimulación del crecimiento radial en el aislado A1 estadísticamente significativa del 7% en comparación con el control y reveló estadísticamente una respuesta hormética mediante el gráfico de la curva bifásica dosis-respuesta. Cabe mencionar que este es el primer estudio donde se demuestra estadísticamente un fenómeno hormético en *F. proliferatum in vitro*.
- La respuesta del crecimiento radial frente a las dosis sub inhibitorias de iprodiona en el aislado A7, no exhibió una curva bifásica en forma de “U” invertida. En su lugar se graficó una curva monofásica, indicando así una ausencia de hormesis y de diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.
- El área de crecimiento radial del aislado A1 mostró una estimulación de 13% en comparación con el control. Esta estimulación en el crecimiento micelial fue provocada al sexto día por la dosis sub inhibitoria de iprodiona “E” (0,012712 ppm). Sin embargo, no fue estadísticamente significativa.
- El aislado A7 exhibió una estimulación en el crecimiento radial de 10% frente al control. Esta estimulación fue provocada al sexto día por la dosis sub inhibitoria de iprodiona “D” (0,127118 ppm). Sin embargo, no fue estadísticamente significativa.
- Las dosis sub inhibitorias de fungicida no indujeron una biosíntesis de FB1 en la cepa A1 (previamente catalogada como no productora de FB1).
- La cuantificación de fumonisinas en los diferentes tratamientos a los que fue sometido el aislado A7 presentó resultados altamente variables. El fenómeno hormético no pudo demostrarse estadísticamente. De todas maneras, la máxima

estimulación que se produjo fue de 16% y se la observó al sexto día bajo efectos de la dosis sub inhibitoria “E” (0,012712 ppm), aunque estos datos tampoco fueron estadísticamente significativos.

## RECOMENDACIONES

- Para demostrar un fenómeno hormético más adaptado a las condiciones ambientales de un cultivo sería importante evaluar, a más de la respuesta provocada por dosis sub inhibitorias de fungicida, otros factores como variaciones de humedad, temperatura, pH, contenido de nitrógeno, entre otros.
- Definitivamente, la ejecución de más réplicas y repeticiones en cada uno de los ensayos realizados en este proyecto, ayudarían a obtener resultados menos variables y, por ende, una mayor evidencia de un fenómeno hormético.
- Sería recomendable evaluar el efecto que producen varios fungicidas, no solo iprodiona.
- Una vez que ha sido determinada la dosis que induce una mayor estimulación (MSD) y la dosis en donde hay ausencia de hormesis (NOAEL), se aconseja incluir un mayor número de dosis dentro de ese rango. De esta manera, la respuesta hormética que *F. proliferatum* experimenta bajo dosis sub inhibitorias de iprodiona sería más sólida.
- En futuras investigaciones se recomienda evaluar una respuesta hormética en términos de patogenicidad de la cebolla, como se ha hecho ya en otros estudios con diferentes hongos y cultivos.
- El procedimiento de inoculación para la inducción de FB1 debería ser mejorado para evitar al máximo los errores experimentales por variaciones de concentración en la cantidad de inóculo. Una de las alternativas podría ser la utilización de técnicas espectrofotométricas.
- El análisis de la expresión génica en cepas de *F. proliferatum* productoras y no productoras de FB1 sería una alternativa muy promisoría para entender de mejor manera los fenómenos horméticos.

## REFERENCIAS

- Abarca, M., Bragulat, M., Castellá, G., Accensi, F., y Cabañes, F. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S63-S68. Recuperado de <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S63S68.pdf>
- Al-Hilli, A., y Smith, J. (1979). Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *FEMS Microbiology Letters* 6, 367-370. Recuperado de [http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1574-6968.1979.tb03744.x?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1&purchase\\_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase\\_site\\_license=LICENSE\\_DENIED](http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1574-6968.1979.tb03744.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com&purchase_site_license=LICENSE_DENIED)
- Amarasinghe, C., Tamburic-Ilicic, L., Gilbert, J., Brûlé-Babel, A., y Dilantha, W. (2013). Evaluation of different fungicides for control of fusarium head blight in wheat inoculated with 3ADON and 15ADON chemotypes of *Fusarium graminearum* in Canada, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(2), 200-208. Doi: 10.1080/07060661.2013.773942
- Aoki, T., O'Donnell, K., y Geiser, D. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of Gen Plant Pathology*, 80, 189–201. Doi: 10.1007/s10327-014-0509-3
- Bacon, C., y Hinton, D. (1996). Symptomless Endophytic Colonization of Maize by *Fusarium moniliforme*. *Can J Bot.*, 74, 1195-1202. Doi: 10.1139/b96-144
- Bahareh, G., Naser, S., y Ebrahim, M. (2014). Antagonistic activity and hyphal interactions of *Trichoderma spp.* against *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum in vitro*, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47 (16), 1979-1987. Doi: 10.1080/03235408.2013.864506
- Bayraktar, H., y Dolar, F. (2010). Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159, 28–34. Doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01715.x
- Bluhm, B., Flaherty, J., Cousin, M., Woloshuk, C. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Differential Detection of Trichothecene and Fumonisin

- Producing Species of *Fusarium* in Corn Meal. *Journal of Food Protection*, 65 (12), 1955-1961. Recuperado de <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2002/00000065/00000012/art00018?token=004d1a61a33030d7ae7e442f20672136763c2553235b2f5f7342687627502b333e3568263c2b3#expand/collapse>
- Bluhm, B., Cousin, M., Woloshuk, C. (2004). Multiplex Real-Time PCR Detection of Fumonisin-Producing and Trichothecene-Producing Groups of *Fusarium* Species. *Journal of Food Protection*, 67 (3), 432-623. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035370>
- Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85-103. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/41997909>
- Branham, S. (1929). The effects of certain chemical compounds upon the course of gas production by baker's yeast. *Journal of Bacteriology*, 18 (4), 247-264. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC375082/pdf/jbacter00878-0020.pdf>
- Branham, B., y Plattner, R. (1993). Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Natural Products*, 56 (9), 1630-1633. Doi: 10.1021/np50099a030
- Brown, D., Butchko, R., Busman, M., y Proctor, R. (2007). The *Fusarium verticillioides* FUM Gene Cluster Encodes a Zn (II) 2Cys6 Protein That Affects FUM Gene Expression and Fumonisin Production. *Eukaryotic cell*, 6 (7), 1210–1218. Doi:10.1128/EC.00400-06
- Calabrese, E., Baldwin, L. (1997). A quantitatively based methodology for the evaluation of chemical hormesis. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 3, 545-554. Doi: 10.1080/10807039709383710
- Cao, A., Reid, L., Butrón, A., Souto, X., y Santiago, R. (2011). Changes in the Phenolic Composition of Maize Silks after Inoculation with *Fusarium graminearum* Schwabe. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 1020-1026. Recuperado de <http://www.docstoc.com/docs/150845430/Changes-in-the-Phenolic-Composition-of-Maize-Silks-after#>

- Coma, B., Portes, E., Gardrat, C., Richard-Forget, F., y Castellan, A. (2011). In vitro inhibitory effect of tetrahydrocurcuminoids on *Fusarium proliferatum* growth and fumonisin B<sub>1</sub> biosynthesis. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28 (2), 218-225. Doi: 10.1080/19440049.2010.540721
- Crump, K. (2001). Evaluating the evidence for hormesis: A statistical perspective. *Human and Ecological Risk Assessment*, 7, 781-794. Doi: 10.1080/20014091111947
- Cruz, A., Marín, P., Magan, N., y González-Jaén, M. (2014). Combined effects of benomyl and environmental factors on growth and expression of the fumonisin biosynthetic genes FUM1 and FUM19 by *Fusarium verticillioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 165 (3), 251-258. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.026>
- Damalas, C., y Eleftherohorinos, I. (2011). Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8, 1402-1419. Doi: 10.3390/ijerph8051402
- De-Wei, L. (2016). *Biology of Microfungi Fungal Biology*. Springer. Windsor, CT, USA.
- Dobosz, B., Drzewiecka, K., Waskiewicz, A., Irzykowska, L., Bocianowski, J., Karolewski, Z.,...Golinski, P. (2011). Free Radicals, Salicylic Acid and Mycotoxins in Asparagus after Inoculation with *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum*. *Applied Magnetic Resonance*, 41, 19–30. Doi: 10.1007/s00723-011-0233-5
- Etcheverry, M., Torres, A., Ramirez, M., Chulze, S., y Magan, N. (2001). In vitro control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 624-632. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01566.x/epdf>
- Falcão, V., Ono, M., de Avila Miguel, T., Vizoni, E., Hirooka, E., y Ono, E. (2010). *Fusarium verticillioides*: Evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on in vitro inhibition of mycelial growth. *Mycopathologia*, 171, 77–84. Doi: 10.1007/s11046-010-9339-9

- FAO. (1989). Prevention of post-harvest food losses fruits, vegetables and root crops a training manual. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/t0073e/T0073E00.htm#Contents>
- FAO. (2013). Reglamentos anivel mundial paralas micotoxinas enlos alimentos y enlas raciones en el año 2003. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>
- FAO. (2013). 50 principales productos a nivel mundial en el año 2013. Recuperado de [http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/S](http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/S)
- FAO. (2015). *Crop Water Information: Onion*. Recuperado de [http://www.fao.org/nr/water/cropinfo\\_onions.html](http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_onions.html)
- FDA. (2001). Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. Recuperado de <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm109231.htm>
- Figueroa, R. (2006). *Estudio de las especies de Fusarium (sección Liseola) aisladas de maíz. Control de Fusarium verticillioides y fumonisinias mediante extractos de alcaloides de Lupinus exaltatus* (Tesis de maestría). Recuperado [http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4678/Figueroa\\_Gomez\\_Rosa\\_Marina.pdf?sequence=1](http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4678/Figueroa_Gomez_Rosa_Marina.pdf?sequence=1)
- Flores, F., y Garzón, C. (2013). Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth *in vitro* of oomycetes and fungal plant pathogens. *Dose-Response*, 11, 361–373. Doi: 10.2203/dose-response.12-026.Garzon
- Gálvez-Patón, L., Gil-Serna, J., Bango, D., y Palmero, D. (2011). *La podredumbre del ajo causada por Fusarium proliferatum*. Recuperado de <http://www.upm.es/sfs/E.U.I.T.%20Agricola/Departamentos/Produccion%20Vegetal:%20Botanica/Documentos/2011%20La%20podredumbre%20.pdf>
- Ghanbarzadeh, B., Goltapeh, E., y Safaie, N. (2013). Identification of *Fusarium* species causing basal rot of onion in East Azarbaijan province, Iran and evaluation of their virulence on onion bulbs and seedlings. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47 (9), 1050-1062. Doi: 10.1080/03235408.2013.829628

- Ghanbarzadeh, B., Safaie, N., y Mohammadi, E. (2014) Antagonistic activity and hyphal interactions of *Trichoderma spp.* against *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* in vitro. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47 (16), 1979-1987. Doi: 10.1080/03235408.2013.864506
- Garzón, C., Molineros, J., Yáñez, J., Flores, F., Jiménez-Gasco, M., y Moorman, G. (2011). Sublethal doses of mefenoxam enhance *Pythium* damping-off of geranium. *Plant Disease*, 95(10), 1233-1238. Doi: 10.1094/PDIS-09-10-0693
- Garzón, C., y Flores, F. (2013). Hormesis: Biphasic Dose-Responses to Fungicides in Plant Pathogens and Their Potential Threat to Agriculture. En M. Nita (Ed.), *Fungicides-Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World* (pp. 311-328). Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/fungicides-showcases-of-integrated-plant-disease-management-from-around-the-world>
- Glenn, A. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137 (4), 213–240. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.003
- González-Jaén, M., Mirete, S., Patiño, B., López-Errasquín, E., y Vázquez, C. (2004). Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 525–532. Doi: 10.1023/B:EJPP.0000032392.20106.81
- Guedes, R., Magalhães, L., y Cosme, L. (2009). Stimulatory Sublethal Response of a Generalist Predator to Permethrin: Hormesis, Hormoligosis, or Homeostatic Regulation?. *Journal of Economic Entomology*, 102 (1), 170-176. Doi: 10.1603/029.102.0124
- Hoffman, G. (2009). A perspective on the scientific, philosophical, and policy dimensions of hormesis. *Dose-Response*, 7. 1-51. Doi: 10.2203/dose-response.08-023.Hoffmann
- Isack, Y., Benichis, M., Gillet, D., y Gamliel, A. (2014). A selective agar medium for isolation, enumeration and morphological identification of *Fusarium proliferatum*. *Phytoparasitica*, 42 (4), 541-547. Doi: 10.1007/s12600-014-0392-7

- Jeney, A., Béki, E., Keszthelyi, A., Leslie, J., y Hornok, L. (2007). *Journal of Basic Microbiology*, 47, 16-24. Doi: 10.1002/jobm.200610197
- Jiménez-Gasco, M., y Jiménez-Díaz, R. (2003). Development of a specific Polymerase Chain Reaction-Based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology*. 93 (2), 200–209. Doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.2.200
- Jiménez, M., Mateo, J., Hinojo, M., y Mateo, R. (2003). Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int J Food Microbiol.*, 89, 185–93. Doi:10.1016/S0168-1605(03)00120-X
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vásquez, C., y González-Jaén, M. (2009). Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology*, 27, 50-57. Doi: 10.1016/j.fm.2009.08.001
- Kiehr, M., y Delhey, R. (2007). Estrategias para el manejo de enfermedades de cebolla en el sur argentino. *Agro UNS*, 7, 5-10. Recuperado de <http://www.agronomia.criba.edu.ar/revista/archivos/AgroUNSNro7.pdf#page=5>
- Klokočar-Šmit, Z., Lević, J., Maširević, S., Grozdanović-Varga, J., Vasić, M., y Aleksić, S. (2008). *Fusarium* rot of onion and possible use of bioproduct. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 114, 135-148. Recuperado de <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-4906/2008/0352-49060814135K.pdf>
- Kohut, G., Ádán, A., Fazekas, B., y Hornok, L. (2009). N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 65-69. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.002
- Kwon, S., Dohlen, C., y Anderson, A. (2001). Gene sequence analysis of an opportunistic wheat pathogen, an isolate of *Fusarium proliferatum*. *Canadian Journal of Botany*, 79 (9), 1115-1121. Doi: 10.1139/b01-084
- Lazzari, F. (1993). Occurrence of *Fusarium* toxins in stored maize in southern Brazil. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product Protection*, 2, 1014-1016. Recuperado de <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcsspp/pdf2/6/1014.pdf>

- Leslie, J., y Summerell, B. *The Fusarium Laboratory Manual*. Iowa, Estados Unidos: Blackwell Publishing
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A. y Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (7), 645-667. Doi: 10.1023/A:1026033021542
- Luro, P. (1982). *VADEMENECUM. Tomo II: cultivo de cebolla, análisis de costos y evaluación económica de una hectárea*. Río Colorado, Venezuela: IICA Biblioteca Venezuela
- Marasas, W., Nelson, P., y Toussoun, T. (1984). *Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology*. University Park, Estados Unidos: The Pennsylvania State University Press
- Marasas, W. (2001). Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109 (2), 239-243. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240671/pdf/ehp109s-000239.pdf>
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A., Viñas, I., y Magan, N. (1998). Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, 102 (1), 801-837. Doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00297.x
- Marín, S. (1998). *Ecofisiología de cepas de Fusarium productoras de fumonisinas* (Tesis doctoral). Recuperado de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8387/Tsms1de1.pdf.txt?sequence=2>
- Marín, P. (2010). *Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "Fusarium"*. (Tesis doctoral). Recuperado de: <http://eprints.ucm.es/11150/1/T32054.pdf>
- Marín, S., Sanchis, V., Sanz, D., Castel, I., Ramos, A., Canela, R., y Magan, N. (1999). Control of growth and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* isolates in moist maize with propionate preservatives.

*Food Additives & Contaminants*, 16(12), 555-563. Doi: 10.1080/026520399283696

- Marín, P., de Ory, A., Cruz, A., Magan, N., y González-Jaén, M. (2013). Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 165 (3), 251-258. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.022>
- Mattson, M., y Calabrese, E. (2009). *Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine*. Nueva York, Estados Unidos: Springer Science & Business Media.
- Moncrief, I. (2014). *Validating forensic tools for crop biosecurity: case study investigation of salmon blotch of onions in Israel* (Tesis Doctoral). Recuperado de <https://shareok.org/handle/11244/15022>
- Muiño. B., Almándoiz, J., y Martín, E. (2009). Efecto in vitro del fungicida iprodione sobre *Alternaria spp.*, y prospección para su inclusión en estrategias de manejo en papa, tomate, ajo y cebolla. *Fitosanidad*, 14 (3), 171-176. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v14n3/fit04310.pdf>
- Munkvold, G., y Desjardins, A. (1997). Fumonisin in maize, can we reduce their occurrence? *Plant Disease*, 81 (6), 556-565. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1997.81.6.556>
- Munkvold, G. (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (7), 705 –713. Doi: 10.1023/A:1026078324268
- Nelson, P., Toussoun, T., y Marasas, W. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State. University Press. University Park.
- Nufarm. (2012). Iprodione Agrogen 500 sc ficha técnica comercial. Recuperado de: <http://www.nufarm.ec/Assets/17877/1/FTIPRODIONEAGROGEN500SC.pdf>
- Pavlović, S., Dražić, S., e Ivanović, N. (2000). Microflora of St. John's wort seeds. En S. Dragana, S. Maksimović, y J. Kišgeci (Eds.), *Proceedings of the First Conference on Medical and Aromatic Plants of Southeast European Countries. Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić"* (pp. 339-346). Recuperado de [http://www.amapseec.org/cmapseec.1/papers/pap\\_p043.htm](http://www.amapseec.org/cmapseec.1/papers/pap_p043.htm)

- Palacios, S., Suscab, A., Haidukowskib, M., Steab, G., Cendoya, E., Ramírez, M., ... Torres, A. (2015). Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 201, 35–41. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.011
- Parikh, C. (2014). *Parikhs Textbook of Medical Jurisprudence, Foresic Medicine & Toxicology, for classrooms & courtrooms*. (6<sup>a</sup> Ed.). New Delhi, India: CBS Publishers & Distributors Pvt. Ltd.
- Pinto, N. (2003). Tratamento de sementes de milho com fungicidas. *Revista Ceres*, 50 (291), 681-686. Recuperado de <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/53012/1/Tratamento-sementes-1.pdf>
- Pradhan, S. (2015). *Fungicide-induced hormetic effects in plant pathogenic fungi and oomycetes* (Tesis de maestría).
- Proctor, R., Desjardins, A., Plattner, R., y Hohn, T. (1999). A Polyketide Synthase Gene Required for Biosynthesis of Fumonisin Mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A. *Fungal Genetics and Biology* 27 (1), 100-112. Doi:10.1006/fgbi.1999.1141
- Proctor, R., Desjardins, A., Moretti, A. (2010). *Biological and Chemical Complexity of Fusarium proliferatum. The Role of Plant Pathology in Food Safety and Food Security, Plant Pathology in the 21st Century*. (3<sup>a</sup> Ed.). Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media.
- Randall, W., Price, C., y Welch, H. (1947). Demonstration of Hormesis (Increase in Fatality Rate) by Penicillin. *American Journal of Public Health*, 37 (4), 421-425. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1623559/pdf/amjphnation01115-0072.pdf>
- Reinoso, M., Figueroa, R., Castro, C., González, B., y Reyes, W. (2005). Estudio de las poblaciones de *Fusarium* (sección *Liseola*) aisladas de híbridos de maíz cultivados en parcelas experimentales del CUCBA. Características ecofisiológicas y genéticas. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 669-673.

- Recuperado de  
[http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances\\_2005/Veterinaria/ReynosoMariaMarta/ReynosoMariaMarta.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances_2005/Veterinaria/ReynosoMariaMarta/ReynosoMariaMarta.pdf)
- Reyes, W. (2001). *Detección del Hongo Fusarium verticillioides y de Fumonisin en Maíz y Efecto de la Nixtamalización sobre la Producción de sus Hidrolizados*. (Tesis Doctoral). Recuperado de <http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/4549>
- Rheeder, J., Marasas, W., y Vismer, H. (2002). Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5), 2101–2105. Doi: 10.1128/AEM.68.5.2101–2105.2002
- Schabenberger O., Tharp B.E., Kells J., y Penner D. (1999). Statistical tests for hormesis and effective dosages in herbicide dose response. *Agronomy Journal*, 91 (4), 713-721. Doi: 10.2134/agronj1999.914713x
- Southam C., y Ehrlich J. (1943). Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33, 517–524. Doi: 10.3390/ph4050726
- Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A., y Moretti, A. (2007). Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (2), 165-172. Doi: 10.1007/s10658-007-9126-8
- Stępień, L., Koczyk, G., y Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics*, 52, 487–496. Doi: 10.1007/s13353-011-0059-8
- Stępień, L., Waśkiewicz, A., y Wilman K. (2015). Host extract modulates metabolism and fumonisin biosynthesis by the plant-pathogenic fungus *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 16(193), 74-81. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.020.
- Stumpf, R., dos Santos, J., Gomes, L., Silva, C., Tessmann, D., Ferreira, F., ... del Ponte, E. (2013). *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing

- seasons. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (1), 89-95. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24159288>
- Sumalán, R., Alexa, E., y Poiana, M. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(32), 1-12. Recuperado de <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/32>
- Thomidis, T., Michailides, T., y Exadaktylou, E. (2008). Contribution of pathogens to peach fruit rot in Northern Greece and their sensitivity to Iprodione, Carbendazim, Thiophanate-methyl and Tebuconazole fungicides. *J. Phytopathol*, 157, 194–200. Doi:10.1111/j.1439-0434.2008.01469.x
- Tsavkelovaa, E., Bömkea, C., Netrusovb, A., Weinerc, J., y Tudzynski, B. (2008). Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (10), 1393–1403. Doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.011
- Vallejo, F., y Estrada, E. (2004). *Producción de hortalizas de clima cálido*. Palmira, Colombia: Univ. Nacional de Colombia.
- Van der Bosch, F., Paveley, N., Shaw, M., Hobbelen, P., y Oliver, R. (2011). The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with the dose? *Plant Pathology*, 60, 597–606. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x
- Velásquez, C. (s.f.). *Análisis de micotoxinas aminopolihidroxiladas*. (Tesis de Maestría). Recuperado de la Universitat de Lleida de la página: [www.cervantesvirtual.com/obra/...0/ff05f568-82b1-11df-acc7-002185ce6064.pdf](http://www.cervantesvirtual.com/obra/...0/ff05f568-82b1-11df-acc7-002185ce6064.pdf)
- Viera, W. (2002). Evaluación de fungicidas *in vitro* y pruebas de resistencia de cinco variedades de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) para Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides*). Cutuglagua, Pichincha. *INIAP Archivo histórico*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=HYEzAQAAMAAJ&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=HYEzAQAAMAAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

- Voss, K., Smith, G., y Haschek, W. (2007). Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137,299–325. Doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.007
- Waśkiewicz, A., Stepień, L., Wilman, K., y Kachlicki, P. (2013). Diversity of Pea-Associated *F. proliferatum* and *F. verticillioides* Populations Revealed by FUM1 Sequence Analysis and Fumonisin Biosynthesis. *Toxins*, 5, 488-503. Doi: 10.3390/toxins5030488
- Weis, J. (2000). Hormesis and Regulatory Policy. *BioScience*, 50 (1), 4-6. Recuperado de <http://www.bioone.org/doi/full/10.1641/0006-3568%282000%29050%5B0004%3AHARP%5D2.3.CO%3B2>
- Zhou, F., Liang, H. J., Di, Y. L., You, H., y Zhu, F. X. (2014). Stimulatory effects of sublethal doses of dimethachlon on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 98 (10), 364-1370. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1059-RE>

## ANEXOS

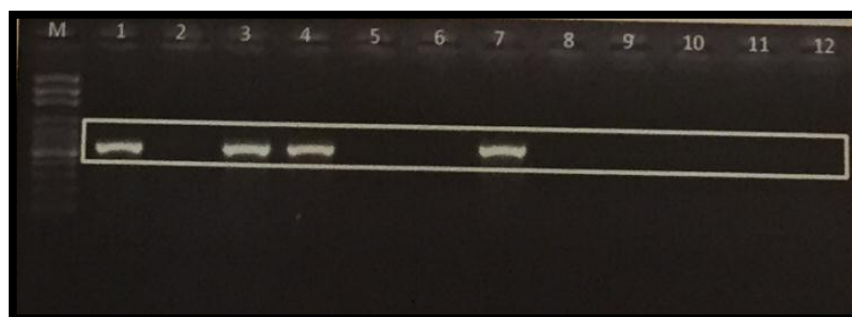
**Anexo 1.** Identificación molecular de las especies de *Fusarium* encontradas en las cebollas comerciales adquiridas en el 2014. Gard, 2014.

Aislado	PRO1- PRO2 (gel)	Prolif- TEF1R (gel)	Secuencia EF1-EF2		RPB1 & RPB2
			NCBI	MLST	
<b>S1</b>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatum</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>
<b>S2</b>	-	-	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	
<b>S3</b>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>pseudonyga</i> <i>mi</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>
<b>A1</b>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatum</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>
<b>A3</b>	-	-	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	
<b>A5</b>	-	-	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	
<b>A7</b>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>pseudonyga</i> <i>mi</i>	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>
<b>A9</b>	-	<i>F.</i> <i>proliferatu</i> <i>m</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	

<b>D3</b>	-	-	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	
<b>D5</b>	-	-	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	
<b>D7</b>	-	-	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	
<b>DCR</b>	-	-	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	

\*D= enfermos, A= asintomáticos, CR= corona.

**Anexo 2.** PCRs de los aislados de *F. proliferatum* con sus primers específicos PRO1-PRO2; Marcador molecular 100bp; Columnas 1, 3, 4, 7 identificadas como *F. proliferatum* y columnas 2, 5, 6, 8, 12 identificadas como *F. oxysporum*. Gard, 2014.



**Anexo 3.** Niveles de fumonisinas cuantificadas mediante HPLC en medios de cultivo de maíz partido y una mezcla 50:50 de sorgo y avena, luego de dos semanas de inoculación con aislados de *F. proliferatum* obtenidos de cebollas comerciales. Gard, 2014.

<b>Aislado</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Nivel de fumonisina B1 (ppm)</b>
<b>Control</b>	Maíz partido	0.2
<b>A1</b>	Maíz partido	0.2

<b>A7</b>	Maíz partido	> 700
<b>S1</b>	Maíz partido	0.0
<b>S3</b>	Maíz partido	0.0
<b>Control</b>	50:50 Mezcla sorgo/avena	0.0
<b>A1</b>	50:50 Mezcla sorgo/avena	0.0
<b>A7</b>	50:50 Mezcla sorgo/avena	> 350
<b>S1</b>	50:50 Mezcla sorgo/avena	0.0
<b>S3</b>	50:50 Mezcla sorgo/avena	0.0

**Anexo 4.** Lista de materiales y métodos utilizados en la presente investigación.

#### **Equipos usados en el estudio**

- Autoclave
- Microondas
- Balanza digital
- Cámara de flujo laminar
- Campana de gases
- Cámara digital
- Scanner Cannon
- Baño de perlas digital
- Pipeteador automático
- Microscopio de óptico
- Mezclador magnético

- Pipetas automáticas de volumen variable
- Disruptor celular
- Liofilizador

### **Materiales usados en el estudio**

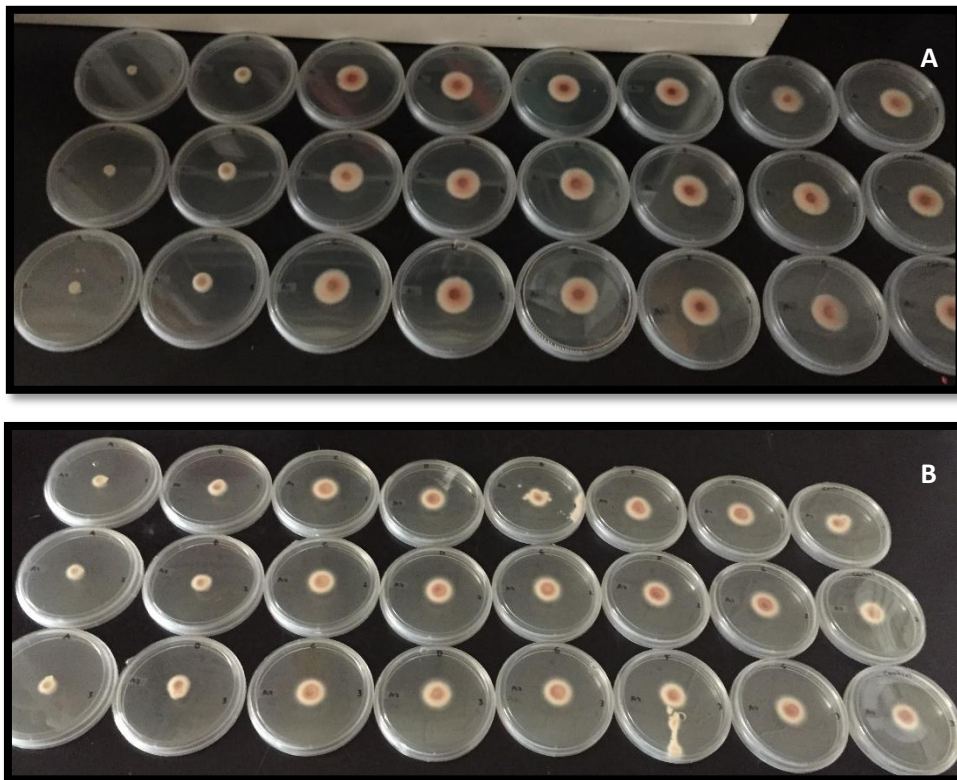
- Regla
- Papel aluminio
- Saca bocados de 3,5 y 5mm de diámetro
- Etanol al 90%
- Agua destilada
- Alcohol antiséptico
- Guantes de nitrilo
- Toallas de papel
- Puntas para pipetas, volumen 100 y 1000  $\mu$ l
- Mechero Bunsen
- Lámpara de alcohol
- Matraces Erlenmeyer de 200 y 1000 ml
- Probetas de 200 y 1000 ml
- Pipetas serológicas desechables de 25 ml
- Cajas de Petri 80 x 15mm
- Agitadores magnéticos
- Iprodiona 100 ml
- Agar papa dextrosa 500 g
- Parafilm
- Maíz partido

- Tubos Falcon de 15 ml
- Fundas whirl pak®

**Anexo 5.** Fórmula y método de preparación del agar PDA (Agar Papa Dextrosa). Neogen Corp., 2011.

<b>Fórmula por litro de preparación</b>	
Extracto de infusión de papa	4 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
pH final	5.6 ± 0.2 a 25°C
<b>Método de preparación</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Suspender 39 g del medio en un litro de agua destilada.</li> <li>2. Calentar con agitación frecuente y dejar hervir durante un minuto hasta disolver completamente el medio</li> <li>3. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.</li> </ol>	

**Anexo 6.** Placas Petri con los aislados de *F. proliferatum* A1 (A) y A7 (B) en agar PDA, luego de tres días de inoculación.



**Anexo 7.** Maíz partido autoclavado listo para ser inoculado con las cepas A1 (A) y A7 (B).



**Anexo 8.** Maíz luego de 3 (A) y 6 días (B) de inoculación con la cepa A1.



**Anexo 9.** Maíz partido luego de 3 (A) y 6 días (B) de inoculación con la cepa A7.



**Anexo 10.** Código de programación en SAS® 9.3 para realizar el análisis hormético según el modelo Brain-Cousens. Modificado de Schabenberger, Tharp, Kells, y Penner, 1999.

```

data hormesisA1;
input rep repl rate resp3 resp6;
datalines;

;

/* Test the dose response data for a hormesis effect */
/* This is the Brain-Cousens model parameterized in terms of EC50 */
/* _____ */
_____ */

ods html;
proc nlin data = hormesisA1 noitprint method = marquardt;
parameters beta 2.0 EC50 10 gamma 0.1 ;
alpha =100; delta=0;

```

```

omega= 1 + 2*gamma*EC50/(alpha-delta);
term=1 + omega * exp(beta*log(rate/EC50));
model resp3= (delta +( alpha-delta + gamma*rate) / term);
*bounds gamma >= 0;
run;
quit;
ods html close;

data hormesisA1;
input rep repl rate resp3 resp6;
datalines;

;

/* To estimate the MSD from radial growth data.*/

ods html;

proc nlin data = hormesisA1 noitprint method = marquardt;
parameters beta = 2.0 MSD = 1 gamma = 2 ;
alpha = 100; delta = 0;
omega = MSD*gamma/(((alpha-delta)*beta)-(MSD*gamma*(1-beta)));
term = 1 + omega*exp(beta*log(rate/MSD));
model resp3 = delta + ((alpha - delta + gamma*rate) / term);
bounds MSD> 0;
run;
ods html close;

data hormesisA1;
input rep repl rate resp3 resp6;
datalines;

;

/* To estimate the NOAEL from radial growth data.*/

```

```

/* _____
_____ */

/*since the log-logistic model does not have a NOAEL apart from 0 dose */
ods html;
proc nlin data = hormesisA1 noitprint method = marquardt;
parameters beta = 2.0 NOAEL = 1 gamma = 2;
delta = 0; alpha = 100;
omega = gamma*NOAEL/(alpha-delta);
term = 1 + omega*exp(beta*log(rate/NOAEL));
model resp3 = delta + ((alpha - delta + gamma*rate) / term);
bounds NOAEL > 0, gamma > 0;
run;
ods html close;

```

**Anexo 11.** Código de programación en SAS® 9.3 para el análisis estadístico T de Student. Schabenberger, Tharp, Kells, y Penner, 1999.

```

data hormesisA1;
input rep repl rate resp3 resp6;
datalines;
;

ods html;
proc glm data=hormesisA1;
where rep=1;
class rate;
model resp3=rate;
means rate/t alpha=0.05;
run;
quit;
ods html close;

```

**Anexo 12.** Protocolo de cuantificación de fumonisinas por HPLC. (Tomado textualmente de Velásquez, s.f., p. 24)

### **Extracción de las fumonisinas en muestras de maíz para su análisis.**

- **Preparación de las muestras de maíz.**

Se muelen 5 kg de maíz, de modo a obtener un tamaño de grano uniformemente fino, se homogeneiza el total molido y de aquí se recogen sub- muestras de 100 g. Cinco de estas muestras se utilizan para los estudios posteriores.

- **Extracción de fumonisinas en muestras de maíz de 25 g.**

La extracción de estos 25 g se realiza según el método propuesto por Shephard y colaboradores (1990), modificado mínimamente.

Se homogeneizan 100 g de maíz molido, de los cuales se pesan 25 g y se suspenden en 50 ml de una mezcla (metanol, agua)= 3:1, v/v, se dejan con agitación magnética durante 30 min. Luego se filtran con papel Whatman n° 4.

La purificación, se realiza con minicolumnas de resina de intercambio iónico (Sax) de 3 ml. Se realiza un pre-acondicionamiento de la columna con 5 ml de metanol, seguidos de 5 ml de (metanol, agua)= 3:1, v/v, cuidando de no dejar secar la fase estacionaria.

Una vez acondicionada la columna se adiciona a la misma, 10 ml del extracto filtrado, obtenido anteriormente.

Seguidamente se procede a realizar sendos lavados con 8 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, seguidos de 3 ml de metanol. La elución final de las muestras se realiza con (3 x 7 ml) de ácido acético al 0'5% en metanol. Recogiéndose los lavados en sendos tubos.

Durante todo el proceso se realiza la elución de las minicolumnas con la utilización de vacío.

Finalmente se juntan las fracciones de los lavados con ácido acético y se llevan a sequedad en un rotavapor (40 °C y 30 Torr). Se retoman con 1 ml de metanol, y se vuelven a evaporar en corriente de N<sub>2</sub> a 60 °C en baño de arena. Este paso se repite tres veces más con la finalidad de eliminar los restos de ácido acético que puedan afectar los resultados del posterior análisis por HPLC.

El residuo sólido o sobrenadante obtenido después de los procesos iniciales de extracción se somete a un proceso re-extractivo y de purificación. La muestra final se analiza también por HPLC.

- **Extracción de las fumonisinas b 1 y b 2 en 5 g de maíz.**

El siguiente sistema de extracción, se realiza según Scott y colaboradores (1992).

A partir de una sub-muestra de 100 g se obtienen 5 g de maíz y se extraen con 10 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, mediante agitación magnética durante un período de 30 min a 60 % de la velocidad del agitador. Se filtra con papel Whatman nº 4.

Para la purificación de la disolución de obtenida se sigue la misma metodología que en el apartado anterior. La variante con respecto al sistema anterior en que aquí se utilizan el volumen total extraído.

El residuo sólido o sobrenadante obtenido después del proceso de filtración inicial, se somete a una reextracción y nueva purificación, igual que en el apartado 3.2.2.

Las dos muestras así obtenidos se analizan por HPLC.

- **Extracción y purificación de las muestras de 1 g de maíz.**

En primer lugar, se procede al acondicionamiento de las columnas de intercambio iónico (Varian Sax Elut) igual que en el apartado (3.2.2.).

Después se pesa una muestra de 1 g de maíz a partir de una de las sub-muestras de 100 g. Posteriormente la muestra de maíz se introduce en la columna y, una vez acondicionada mediante una suave presión, se coloca una frita. Seguidamente se adiciona a la columna un volumen de 1'5 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, cubriendo todo el maíz con este disolvente. Se deja la mezcla en contacto con el maíz durante 1 hora, al cabo de la cual, se eluye la columna.

Posteriormente se eluye de igual manera que en los casos interiores. Primero con 8 ml de una mezcla de (metanol, agua)= 3:1, v/v, y luego 5 ml de metanol.

Finalmente se eluye la columna con una disolución de ácido acético al 0'5 % en metanol (4 x 7 ml). Todo proceso de elución se realiza mediante vacío en la cubeta para aumentar el flujo de los eluyentes por la fase estacionaria. Las cuatro fracciones ácidas obtenidas se llevan por separado a sequedad en rotavapor (40 °C, 30Torr).

Posteriormente se retoman con un volumen de 1 ml de metanol, y se re-evaporan con una corriente de N<sub>2</sub> calentado a 60 °C en baño de arena.

Finalmente se disuelven en metanol y se pasan por un filtro de 0'45 micras, para su posterior análisis por HPLC.

### **Análisis del contenido de fumonisinas mediante HPLC.**

#### **Aspectos generales.**

- **Preparación de los patrones de fumonisinas.**

Se realizan partiendo de una disolución "madre" de 500 g/ml, preparada a partir de patrones de fumonisinas suministrados por el centro "CSIR, Division of Food Science and Technology", Pretoria, Sudáfrica. A partir de aquí se preparan disoluciones de 40, 20, 10, 1 y 0'5 g/ml, en distintos disolventes tales como metanol y acetonitrilo y una mezcla de (acetonitrilo, agua)= 1:1, v/v. Todos los disolventes empleados son de grado HPLC.

- **Preparación de las curvas de calibración.**

La preparación de una curva de calibración se realiza mediante la utilización de patrones de distintas concentraciones de FB1 y FB2, tratadas con el reactivo correspondiente e inyectadas en el HPLC. Las inyecciones en el cromatógrafo de HPLC se realizan por triplicado obteniendo una curva de calibración para cada serie de patrones disueltos en los distintos disolventes.

Las curvas se construyen dibujando las áreas de los picos medidas en mV contra las concentraciones de las FB1 y FB2 expresadas en g/ml. 3.3.1.3. Cálculo de las concentraciones de FB 1 y FB 2 en maíz.

La concentración de las fumonisinas en las disoluciones provenientes de la purificación, (S) se calcula a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos y de su asociación con los valores en las rectas de calibración.

Una vez cuantificado el contenido de las fumonisinas en las muestras inyectadas, falta realizar la determinación de la concentración de las muestras del maíz. Para llegar a este resultado se tendrán en cuenta todos los factores de dilución y de concentración a que se han sometido las muestras de maíz durante la extracción y purificación. Finalmente se expresará el resultado respecto al peso inicial del maíz empleado durante la extracción.

La expresión utilizada para efectuar los cálculos del contenido de fumonisinas en la muestras de maíz es la siguiente.  $C ( g/g) = S.V.D/W.A$

V = volumen del disolvente utilizado en la extracción del maíz (ml). D = volumen en que se ha disuelto la muestra una vez purificada (ml). W = peso de la muestra de maíz (g). S = corresponde a la concentración de las fumonisinas en la disolución a partir de la cual se obtiene el derivado. A = volumen de la solución obtenida después de extraer el maíz y purificado a partir de una columna de intercambio iónico (ml).

- **Cálculo de los límites de detección.**

Los límites de detección se calculan a partir de los dos sistemas más empleados en la bibliografía.

- ✓ **Método del "ruido de fondo".**

En éste caso se analiza una muestra que denominaremos "blanco" cuyos contenidos de toxina no sean detectables por nuestro sistema y una muestra en la que se hayan conseguido las mínimas respuestas. Inicialmente se inyecta la muestra "blanco" y se desarrolla el cromatograma hasta un tiempo superior al de detección de las toxinas, seguidamente se calcula la altura alcanzada por la línea de base en distintos tiempos y se promedia. Finalmente se inyecta la muestra con la toxina y se mide la altura.

Los cálculos se realizan mediante la siguiente expresión:

$$C (ng) = (q/h)h'.3$$

c = cantidad de toxina detectable, medida en ng. q = cantidad de toxina inyectada, medida en ng. h = altura del pico de toxina medida en mm. h' = altura del ruido de fondo, medida en mm.

- ✓ **Método de la "recta de calibración".**

En éste método el cálculo del límite de detección, para cada una de las toxinas y cada uno de los reactivos utilizados, se basa en la recta de calibración obtenida (Miller y Miller, 1993).

El límite de detección se calcula de la forma siguiente: a partir de la ordenada en el origen (b) y la desviación estándar del blanco (SB), se calcula la ordenada  $y = b + 3SB$  (si  $b < 0$  se considera  $b = 0$ ). Dicho valor se sustituye en la correspondiente recta

de regresión (recta tipo  $y = ax \pm b$ ), y se encuentra el valor de la "x" que se toma como "límite de detección del análisis".