



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud
**Determinación de la toxicidad de
fungicidas sintéticos y naturales en
fibroblastos humanos BJ**

Para Obtener el Grado de:
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta: Mtro. Andy José Moo Muñoz

Comité Tutorial:

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Tutor Académico

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Interno

Dra. Erika Patricia Azorín Vega

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, octubre de 2021

VOTOS APROBATORIOS

ÍNDICE

Índice de cuadros y figuras	v
Resumen	1
Introducción	2
1. Antecedentes	2
1.1 Los plaguicidas.....	3
1.2 Uso de plaguicidas en México.....	4
1.3 Daños a la salud por el uso de plaguicidas	5
1.4 Los fungicidas y su uso en México	6
1.5 Toxicidad causada por fungicidas	7
1.6 Citotoxicidad	9
1.7 Genotoxicidad	9
1.8 Principales cultivos en el Estado de México	10
1.9 Los Hongos y su diversidad	14
1.10 Características de hongos fitopatógenos	14
1.11 Bio-plaguicidas y bio-fungicidas.....	15
1.12 Identificación en hongos	19
2. Planteamiento del problema.....	21
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos.....	24
5.1 Objetivo general.....	24
1.2 Objetivos específicos.....	24
6. Diseño metodológico.....	25
6.1 Diseño del estudio	25
6.2 Universo y muestra.....	25
6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	25
6.4 Variables	26
6.5 Instrumentos	28
6.6 Procedimiento.....	28
6.7 Recolección de datos	34
6.8 Análisis estadístico.....	34
6.9 Ética de estudio	34

7. Resultados	36
7.1 Artículo publicado.....	36
7.2 Artículo publicado.....	41
8. Discusión general.....	46
9. Conclusiones generales.....	47
10. Bibliohemerografía utilizada	48
11. Anexos	67
11.1 Identificación de cepas colectadas	67
11.2 Prueba en microplacas de extractos de cepas saprobias frente a fitopatógenos colectados.	71

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Tipos de clasificaciones de los plaguicidas.....	3
Cuadro 2: Principales países consumidores de fungicidas y bactericidas a nivel mundial.....	7
Cuadro 3. Estudios sobre toxicidad causada por los fungicidas	8
Cuadro 4. Principales cultivos del estado de México	11
Cuadro 5. Enfermedades y fungicidas recomendados en los principales cultivos del Estado de México en principales cultivos	12
Cuadro 6. Reportes de organismos aislados en México con potencial bioplaguicida.	17
Cuadro 7: Variables en citotoxicidad y genotoxicidad.....	26
Cuadro 8: Variables en pruebas fúngicas	27
Cuadro 9. Fungicidas evaluados en fibroblastos humanos	29
Cuadro 10. Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato	31
Figura 1: Consumo de plaguicidas en México por tipo de producto (INEGI) y utilización de ingrediente activo de plaguicidas en México (FAO).....	4
Figura 2. Geografía del estado de México	11

Resumen

Los fungicidas son sustancias químicas que matan o inhiben el crecimiento de hongos y son utilizadas para proteger a los cultivos de plagas de hongos fitopatógenos. En México, durante el año 2018, se utilizaron más de 28 mil toneladas de ingrediente activo de fungicidas sintéticos. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* de fungicidas sintéticos en fibroblastos BJ; adicionalmente, fue aislar, evaluar e identificar hongos del Estado de México con potencial actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos. Se evaluó el efecto citotóxico y genotóxico de los fungicidas comerciales: A) Coraza[®]720 S (ingrediente activo clorotalonil), B) Cercobin[®]-M (ingrediente activo tiofanato metílico y C) Captan ultra[®] 50 WP (ingrediente activo captan), en diferentes concentraciones en fibroblastos BJ mediante un ensayo de exclusión de azul de tripano y citometría de flujo. Se recolectaron hongos fitopatógenos del Estado de México y se confrontaron en un ensayo dual contra cepas fúngicas saprofitas, previamente aisladas. Se seleccionaron las cepas saprofitas con mayor porcentaje de inhibición ($\geq 50\%$), se obtuvieron sus extractos secos y se evaluaron en micro dilución, las cepas fitopatógenas y las saprofitas con actividad antifúngica fueron identificadas taxonómicamente. Los fungicidas A y B a exposiciones de 1 h fueron citotóxicos (100 y 1000 μM) respectivamente. Después de 24 h de exposición, A y C causan efectos citotóxicos en fibroblastos (20-100 y 40-100 μM respectivamente), B a partir de 100 μM . A, B y C ocasionan daño al ADN en fibroblastos BJ, activando ATM y fosforilación de H2A.X. Un total de 5 cepas fitopatógenas se confrontaron contra 7 saprofitas, las cepas 57, 59 y 95 inhibieron el crecimiento ($\geq 50\%$) en más de dos cepas de fitopatógenos. La concentración mínima inhibitoria de los extractos se encontró entre 3.125 $\mu\text{g/ml}$ hasta 200 $\mu\text{g/ml}$, el extracto de la cepa 59 fue el más activo (3.125 $\mu\text{g/ml}$). De acuerdo con la taxonomía tradicional las cepas fitopatógenas pertenecen a los géneros *Alternaria* sp. (M1C3), *Chrysosporium* sp. (M3C7), *Pithomyces* sp.(M2C6), *Monilia* sp. (M2C1) y *Helicomyces* sp. (M3C8). Las cepas saprofitas a *Trichoderma* sp. (22 y 57), *Aspergillus* sp. (59), *Trichoderma* sp. (95), *Nigrospora* sp. (103 y 116) y un micelio estéril (130). Se concluye que las dosis evaluadas de los fungicidas son más tóxicas en concentraciones 30 veces menores a las dosis recomendadas por el fabricante para su aplicación en campo. Los hongos saprofitos del Estado de México tienen actividad antifúngica.

Introducción

1. Antecedentes

La utilización de plaguicidas (PGC) es indispensable para mantener o aumentar el rendimiento de la producción agrícola, con la finalidad de producir alimento para la población global en crecimiento [1,2]. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés U.S. Environmental Protection Agency), los PGC, son cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Los PGC están compuestos por ingredientes activos e ingredientes inertes, aunque “ingrediente inerte” no necesariamente significa “no tóxico” y ocasionalmente su identidad es confidencial. Los PGC son tóxicos para la salud humana, ya que fueron creados específicamente para interferir en sistemas biológicos, no selectivos, afectando simultáneamente y en diversos grados, tanto a la "especie objetivo" como a “especies no objetivo”, incluyendo al hombre [3,4]. En el mundo se utilizan más de 1000 PGC con la finalidad de evitar o disminuir el efecto nocivo de las plagas en la producción de alimentos, cada plaguicida tiene propiedades y efectos toxicológicos distintos [1]. Por sus características químicas, los PGC son contaminantes persistentes que resisten a la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que la vida media de estos compuestos en el ambiente sea indefinida [5], adicionalmente, los PGC presentan solubilidad en lípidos, lo que contribuye a su bio acumulación y bio magnificación en las cadenas alimenticias, incrementando el riesgo potencial en la salud humana [6,7]. En países en desarrollo, los PGC causan un millón de casos de intoxicación y cerca de 20,000 muertes anuales, se estima que anualmente 25 millones de casos de intoxicaciones agudas causadas por PGC en el trabajo no son registradas, ya que los trabajadores afectados no buscaron atención médica [8,9]. La exposición a los PGC puede alterar los procesos y la viabilidad de las células humanas, no obstante, únicamente 47% de los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene uno o más centros para tratar las intoxicaciones [10]. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), advierte sobre los riesgos carcinogénicos para los seres humanos, ocasionados por más de 1000 agentes, entre ellos los PGC [11].

1.1 Los plaguicidas

Los PGC están compuestos por ingredientes activos (i. a.) e ingredientes inertes (i. i.), aunque "ingrediente inerte" no significa "no tóxico" y ocasionalmente la identidad de los i. i. son información confidencial de los fabricantes [3]. De acuerdo con la Red de Acción en Plaguicidas (PAN, por sus siglas en inglés Pesticide Action Network) [12], actualmente se encuentra información de más de 100,000 productos de PGC y miles de "i. a.", de los cuales encuentran regulados aproximadamente 6,400 que incluyen sus productos de transformación, adyuvantes y disolventes.

1.1.1 Clasificación de los plaguicidas

Aunque existen diversas clasificaciones de los PGC, de manera general se pueden clasificar de acuerdo con el uso a los que están destinados [13], ya sea por los organismos que controlan (microorganismos, plantas, animales), su modo de acción y su composición química, (Cuadro 1). Aunque la OMS también los clasifica de acuerdo con su dosis letal al 50% (LD₅₀) en mg/kg (vía cutánea y oral en ratas como un valor comparable y reproducible); y de acuerdo a su peligrosidad (riesgo de una o múltiples exposiciones durante un período de tiempo relativamente corto), como: Ia (extremadamente peligroso); 1b (altamente peligroso); II (moderadamente peligroso); III (levemente peligroso) y U (poco probable de causar peligros agudos) [14].

Cuadro 1: Tipos de clasificaciones de los plaguicidas.

Por su control:	Por su modo de entrada:	Composición química:	Grupo químico:	Tipo de formulación:	Por su modo de acción:	Origen:	Por su objetivo:
Insecticidas (Insectos)	Sistémico	Inorgánicos	Organofosforados	Líquidas	Físico	Químico	Selectivo
Fungicidas (Hongos)	Contacto	Orgánicos	Organoclorados	Sólidas	Protoplasma	Biológico	Amplio espectro
Bactericidas (Bacterias)	Ingestión	Plaguicidas biológicos	Carbamatos	Gaseosas	Respiratorio		
Herbicidas (Plantas)	Fumigante		Piretroides	Polvos	Nervioso		
Rodenticidas (Roedores)	Repelente		Nicotinoides	Granulados	Inhibidor de la quitina		
Nematicidas (Nematodos)	Defoliante		Bencimidazoles				

Fuente: Elaborado con información de Yadav y Devi [13]; Akashe *et al.*, [15]; Hassaan y El Nemr [16].

1.2 Uso de plaguicidas en México

La cantidad de PGC que se utiliza en los diversos cultivos en México, es desconocida. Ante la carencia de datos concretos y específicos, solo se pueden estimar, basados en las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División de Estadística (FAOSTAT) y la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). La Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura (FAO) [17], estimó a través de la FAOSTAT, el promedio de PGC utilizados en México, que durante los años 2000-2016 fue de 1.5 kg/ha, adicionalmente estimó que en 2018 se utilizó de más de 53,000 toneladas de ingrediente activo, de los cuales 28,601 fueron de fungicidas y bactericidas, 11,552 de herbicidas y 12,991 de insecticidas. Por su parte, la SEMARNAT [18], a través del Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales (SNIARN), reporta el consumo nacional de PGC (clasificado por agrícola, líquido, polvo, herbicidas y defoliantes), informó que en 2016 se produjeron más de 59 mil toneladas de PGC, de los cuales 17,900 fueron agrícolas líquidos, 9,860 agrícola polvo y 31,300 herbicidas y defoliantes (Figura 1).

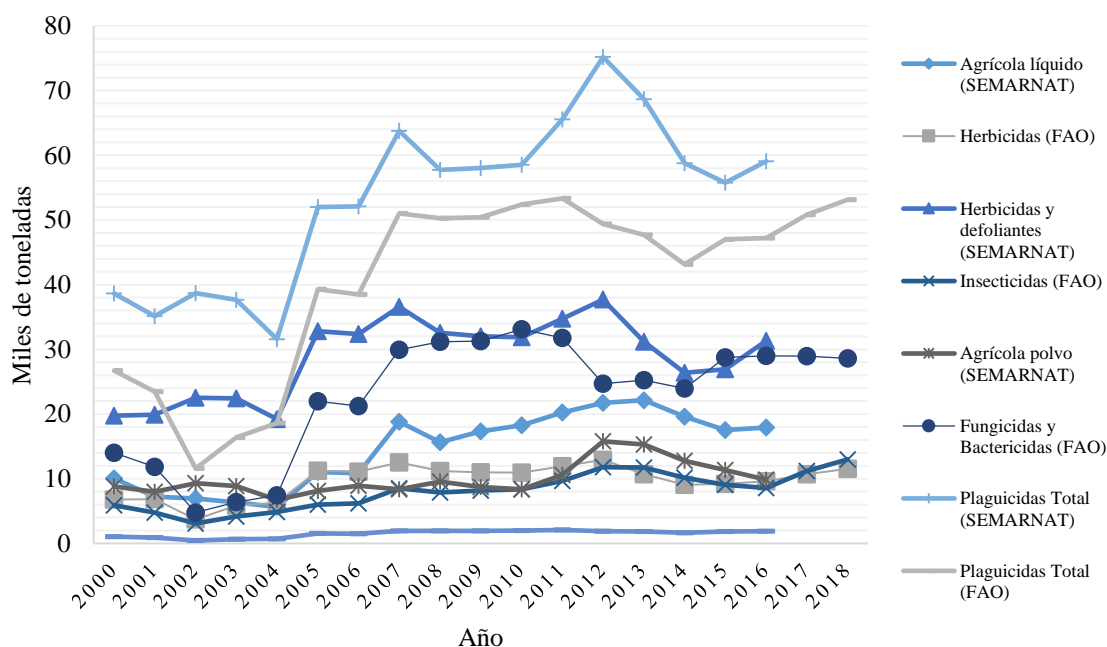


Figura 1: Consumo de plaguicidas en México por tipo de producto (INEGI) y utilización de ingrediente activo de plaguicidas en México (FAO), 2000-2018. Fuente: Elaborado con datos de la FAOSTAT, SEMARNAT-SNIAR [17,18].

1.3 Daños a la salud por el uso de plaguicidas

Los trabajadores agrícolas, generalmente utilizan las mayores concentraciones de PGC recomendadas por el fabricante, lo aplican con las manos descubiertas y sin mascarilla, debido a la falta de insumos [19,20]. La exposición humana a los PGC se ha relacionado con la incidencia de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, asma, bronquitis, infertilidad, defectos de nacimiento, enfermedades respiratorias y enfermedades de órganos, además de presentar un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, próstata, pulmón, estómago, colorrectal, hígado, vejiga urinaria, linfoma no Hodgkin y leucemia [21]. Aunque los PGC químicos son comprobadamente eficaces, pueden causar daños a la salud ya que son solubles en lípidos, lo cual incrementa el riesgo potencial a la salud humana [22,23]. El uso excesivo de PGC como el glifosato aumenta el riesgo potencial para la salud, ya que puede inducir efectos citotóxicos de células A549 *in vitro* a una concentración inferior al nivel de exposición ocupacional de los trabajadores [24]. La exposición a PGC en trabajadores de invernaderos puede causar daños al ADN, muerte celular e inestabilidad cromosómica en las células de la mucosa oral [25]; está asociada con la inestabilidad genómica, que se propone es sensible a la ingesta nutricional y también puede inducir cambios epigenéticos [26]; se relacionados con el cáncer, enfermedades de Parkinson y Alzheimer, trastornos de las vías respiratorias y reproductivas [27]. En México los daños causados por los PGC han sido estudiados y existe una relación estrecha entre exposición a PGC y problemas de salud [28]. La exposición crónica a PGC en trabajadores agrícolas del Estado de Baja California provocó una disminución considerable de la actividad de la acetilcolinesterasa en los glóbulos rojos, que puede generar trastornos neuropsiquiátricos como la ansiedad generalizada hasta un alto riesgo de suicidio [29]; en Yucatán en población de mujeres mayas, se encontró bioacumulación de PGC en muestras de sangre y leche materna [30]; en trabajadores agrícolas de Navolato, Sinaloa se encontraron altas concentraciones de transaminasas y fosfatasa alcalina, mientras que los niveles de hemoglobina y acetilcolinesterasa se encontraban deprimidos [31]; en Guerrero se reportó que en trabajadores agrícolas expuestos los PGC endosulfán, paratión metílico, azinfós metílico, metamidofos, aldícarb, cipermetrina y dicamba, entre otros, presentaron daño genético en muestras de exudados bucales, además de presentar anomalías como células binucleadas, cromatina condensada, protuberancia nuclear, picnosis (núcleos encogidos),

cariorrhexis (núcleos desintegrados) y cariolisis (núcleos disueltos); asociadas con efectos citotóxicos o genotóxico [32]; así como en floricultores de Morelos y Estado de México, se han observado una relación positiva entre las concentraciones de PGC en suero y los niveles de hormonas tiroideas [33].

1.4 Los fungicidas y su uso en México

Los fungicidas (FGC) son PGC que, por definición, matan hongos o esporas de hongos, desempeñan un papel importante en la protección de la calidad y el rendimiento de los cultivos [34]. El modo de acción de un FGC es la forma que mata o suprime el crecimiento un hongo, en otras palabras, es el proceso bioquímico específico del hongo objetivo que se ve afectado por un FGC, como el dañar las membranas celulares, inactivar enzimas o proteínas e interferir con procesos clave como la producción de energía o la respiración [35]. La lista de códigos de FGC del Comité de Acción de Resistencia a los Fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés Fungicide Resistance Action Committee), se basa en la evaluación científica del modo de acción de los ingredientes activos de los FGC, los cuales utilizan letras (A, B, C ...), con números añadidos para distinguir los grupos, según su mecanismo de acción bioquímico. Esta agrupación se realizó de acuerdo con los procesos en el metabolismo, iniciando desde la síntesis de ácidos nucleicos (A) hasta el metabolismo secundario, como la síntesis de melanina (I), seguida de inductores de defensa de la planta huésped (P), moléculas recientes con un modo de acción desconocido y un riesgo de resistencia desconocido (U) e inhibidores de sitios múltiples (M) y "Productos biológicos con múltiples modos de acción" (BM) [35].

De acuerdo con la FAO [17], a través de la FAOSTAT, los principales países que usan FGC y bactericidas son Brasil, Francia, España, Italia, México y Rusia (Cuadro 2); por lo que México es un importante consumidor de FGC y bactericidas, ocupando a nivel mundial el quinto lugar. La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en su base de datos de consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y límites máximos permitidos de residuos de plaguicidas, registra aproximadamente 100 productos de ingredientes activos de FGC, que se fabrican en diferentes empresas y que no proporcionan información detallada del producto, solo una etiqueta de registro; además de

tener más de 470 establecimientos registrados dedicados a la fabricación de PGC las cuales aproximadamente 120 cuentan con giro o línea autorizadas para FGC [36].

Cuadro 2: Principales países consumidores de fungicidas y bactericidas a nivel mundial.

País	Toneladas de ingrediente activo de fungicidas y bactericidas		
	2016	2017	2018
Brasil	59,124	59,124	59,124
Francia	31,929	29,789	39,112
España	38,919	37,999	38,067
Italia	34,978	32,517	31,398
México	29,200	28,958	28,601
Rusia	23,237	25,875	26,164

Fuente: Elaborado con datos de la FAO [17].

1.5 Toxicidad causada por fungicidas

La exposición a los FGC puede tener efectos agudos, crónicos y a largo plazo, el peligro que representa el uso generalizado de estos agentes ha demostrado daños como la capacidad carcinogénica y alteraciones reproductivas [37], algunos estudios sobre toxicidad de FGC se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Recientes estudios de la toxicidad y citotoxicidad causada por fungicidas.

Nombre	Efecto	Característica	Modelo	País	Referencia
Amistar® XTRA	Toxicidad	Disminución de supervivencia y reproducción.	Gusano blanco (<i>Enchytraeus crypticus</i>)	Portugal	[38]
Pristine®	Toxicidad	Reducción de vida útil y tamaño de población.	Abeja (<i>Apis mellifera</i>)	E.E. U.U.	[39]
Triazol	Citotoxicidad	Generación de especies reactivas en oxígeno y apoptosis.	Células humanas HeLa, A549, HCT116 y K562	China	[40]
Propiconazol Tebuconazol	Toxicidad	Disminución de viabilidad celular, alteración de caramidas y aumento de la N-estearoil-fitoesfingosina (CerNP).	Células de neuroblastoma SH-SY5Y	E.E. U.U.	[41]
Azoxistrobin	Desarrollo	Afecta la supervivencia, el desarrollo y los genes implicados en el sistema endocrino, el estrés oxidativo y la apoptosis en embriones F1.	Embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	China	[42]
Maneb	Metabolismo fisiológico	En combinación aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno.	Células madre neurales embrionarias (<i>Rattus</i>)	Suecia	[43]
Ciproconazol	Toxicidad	Alteración de las funciones mitocondriales e induce la acumulación de triglicéridos y la formación de células de hígado graso	Células de hepatocarcinoma HepaRG humano	China	[44]

1.6 Citotoxicidad

La toxicidad en tejidos y células se define como una alteración de las funciones celulares básicas, causadas por efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos [45], la viabilidad celular es usada para correlacionar el comportamiento de una muestra de células sanas frente a las células que sufren daños. Los ensayos de viabilidad celular se utilizan esencialmente para cribar la respuesta de las células frente a un fármaco o un agente químico [46]. Los ensayos *in vitro* se han utilizado durante mucho tiempo para las pruebas de toxicidad, los ensayos de dianas farmacológicas se utilizan ampliamente para identificar fármacos candidatos, pero también para probar compuestos para determinar la toxicidad fuera del objetivo [47]. La integridad de la membrana celular es la característica más utilizada para detectar si las células eucariotas cultivadas *in vitro* están vivas o muertas, las células que pierden la integridad de la membrana y permiten el movimiento de moléculas no permeables se clasifican como no viables o muertas [48]. El ensayo exclusión del colorante Azul de tripano se usa para determinar el número de células viables o muertas en una suspensión celular, este ensayo se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen el tinte, mientras que las células muertas no, las células viables tendrán un citoplasma claro, mientras que las células muertas tendrán un citoplasma azul. El número de células viables y/o muertas por unidad de volumen se determina mediante microscopía óptica como un porcentaje de células de control no tratadas [49].

1.7 Genotoxicidad

La genotoxicidad describe una propiedad de agentes químicos que pueden dañar la genética de una célula, afectando directamente o indirectamente el ADN, ya sea como inducción de mutaciones o daño directo del ADN. Las células evitan la expresión de la mutación genotóxica mediante reparación del ADN o apoptosis; sin embargo, es posible que el daño no siempre se solucione y produzca mutagénesis, esta puede manifestarse de varias formas como mutaciones, aberraciones cromosómicas y cambios en el número de cromosomas, estas características son debidas al aumento de la inestabilidad genómica en la célula [50,51].

Una técnica empleada para determinar el daño al ADN es la detección de la fosforilación de la histona H2A.X en la célula. La principal quinasa activada en respuesta a roturas de la doble hebra de ADN es la ataxia-telangiectasia mutada quinasa (ATM). Inactiva, la ATM existe

como un dímero, pero rápidamente se disocia y se fosforila en serina 1981 en respuesta a la radiación ionizante, una vez activada la ATM fosforila una serie de factores, incluyendo la histona H2A.X. La fosforilación de la variante de la histona H2A.X, en la serina 139 (γ H2A.X) por ATM es un indicador importante de daño del ADN. A medida que aumenta el nivel de daño en el ADN, el nivel de fosfo histona H2A.X aumenta y se acumula en los sitios de daño en el ADN y a menudo se usa para indicar el nivel de daño en el ADN presente en la célula [52]. Durante la respuesta celular a las roturas de doble cadena (RDC), la histona H2A.X se fosforila rápidamente en Ser139 por la proteína quinasa mutada de ataxia telangiectasia, que se activa a través de la fosforilación en Ser198. Por lo que los anticuerpos específicos para H2A.X y ATM pueden usarse para detectar ADN con RDC a nivel celular [53]. Comprender las consecuencias de la activación de ATM e Histona H2A.X en una población de células puede proporcionar al investigador información útil que será importante para comprender la naturaleza de la respuesta al daño del ADN.

1.8 Principales cultivos en el Estado de México

El estado de México cuenta con una superficie de 22,227 km² de extensión y cuenta con 125 municipios (Figura 2). En cada año agrícola se siembran en promedio 765 mil hectáreas (ha) de cultivos, con una producción total de 6, 800,772 toneladas, ocupando el décimo sexto de producción a nivel nacional. Los municipios con mayor superficie sembrada son Almoloya de Juárez (28,138 ha), San José del Rincón (25,151 ha), Villa Victoria (23,275 ha), Ixtlahuaca (23,160 ha) y San Felipe del Progreso (21,941) [54].

La producción agrícola en el Estado de México se centra en cinco principales productos debido a que son los que se producen en mayor cantidad y con un auge importante en la economía del estado, entre los principales productos producidos en la región (Cuadro 4), se encuentran las gramíneas como diversos pastos y el Maíz de grano (*Zea mays*), flores ornamentales como el Crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) y la Rosa (*Rosa* sp.); el aguacate (*Persea americana*) y la papa (*Solanum tuberosum*), todos con una importante producción y alto valor económico [54].



Figura 2. Geografía del estado de México [54].

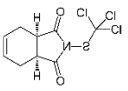
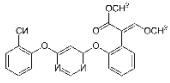
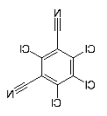
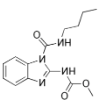
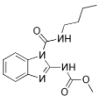
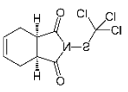
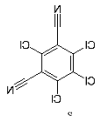
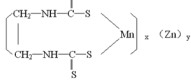
Cuadro 4. Principales cultivos del estado de México.

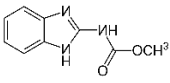
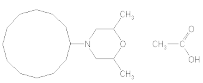
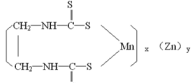
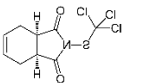
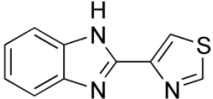
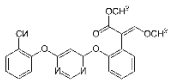
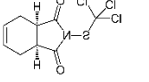
Producto	Cantidad	Valor (millones de pesos)
Maíz de grano	1,922,977 toneladas	7,376
Crisantemo	10,197,133 gruesas*	1,829
Aguacate	97,806 toneladas	1,725
Rosa	7,022,706 gruesas*	1,671
Papa	169,573 toneladas	1,263

*Gruesa= doce docenas, equivalente a 144 piezas. Fuente: datos de la SIAP [54].

Para prevenir la merma de la producción y garantizar la calidad de los productos en el mercado, el INIFAP recomienda la utilización de los PGC (Cuadro 5), consecuentemente los productores del Estado de México, los aplican regularmente con la finalidad de mitigar el daño ocasionado por los hongos fitopatógenos [55].

Cuadro 5. Enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos y fungicidas recomendados para su control en los principales cultivos del Estado de México.

Cultivo	Enfermedad y agente causal	Fungicida recomendado	Ingrediente Activo	Formula química	Modo de acción
Maíz grano	Hongos	Metacaptan	Captan: Cis-N-((triclorometil)tio)-4-ciclohexen-1,2 dicarboximida		Contacto
	Mildiu (<i>Peronospora sparsa</i>)	Amistar 50 WG	Azoxystrobin		Sistémico
Crisantemo (gruesa)	Pudrición de raicillas y/o cuello (<i>Phytophthora spp.</i>)	Clorotalonil (Bravo 720)	Clorotalonil: Tetracloroisofaltonitrilo 2,4,5,6-Tetracloro-1,3-bencenodicarbonitrilo C8Cl4N2		Contacto
	Pudrición de la raíz (<i>Rhizoctonia y Pythium</i>)	Benomilo	Bencimidazol: metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-il carbamato		Sistémico
	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloesporoides</i>),	Benomilo	Bencimidazol:metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-il carbamato		Sistémico
Aguacate	Antracnosis (<i>Coletotricum acutum</i>)	Captan	Captan: N-(triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida		Contacto
	Anillamiento del pedunculo (hongos de la familia <i>Botryosphaeriaceae</i>)	Daconil	Clorotalonil: Tetracloroisofaltonitrilo		Contacto
	Antracnosis (<i>Colletotrichum gloesporoides</i>)	Manzate	Mancozeb		Contacto

Rosa (gruesa)	(<i>Fusarium</i> sp.) Oídio (<i>Sphaerotheca pannosa</i>) y Verticilosis (<i>Verticillium dahliae</i>)	Carbendazim	Bencimidazol: metilbencimidazol-2-il carbamato,		Sistémico
	Cenicillas (<i>Sphaerotheca pannosa</i>)	Meltatox®	Acetato de dodemorf: Acetato 4-ciclododecil-2,6-dimetil morfolina		Sistémico
Tomate rojo (jitomate)	Mildiu (<i>Phytophthora infestans</i> .)	Mancozeb	Mancozeb		Contacto
	Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i> .)	Captan	Captan: N-(triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida		Contacto
	Marchitez (<i>Fusarium oxysporum</i>)	Tiabendazol	Bencimidazol: 2-(tiazol-4-il)bencimidazol, o bien 2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol		Sistémico
Papa	Cenicilla (<i>Leveillula taurica</i>)	Amistar (500)	Azoxystrobin		Sistémico
	Tizon (<i>Phytophthora infestans</i> .)	Captan	Captan: N-(triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida		Contacto

Elaborado con información del INIFAP [55]. Gruesa= doce docenas, 144 piezas.

1.9 Los Hongos y su diversidad

Los hongos son organismos eucariotas, importantes en la regulación de los ecosistemas, digieren su alimento secretando enzimas al medio ambiente y absorbiendo la materia orgánica disuelta nuevamente en sus células, poseen paredes celulares de quitina [56]. Son descomponedores de materia orgánica, mutualistas o patógenos de las plantas. Los hongos del suelo influyen en la producción de nutrientes de las plantas, la mineralización y el secuestro de carbono, la mayoría de los hongos del suelo son saprobios, estos obtienen sus nutrimentos de materiales orgánicos inertes como restos vegetales y animales. Los hongos participan en la descomposición de la materia orgánica, aportan CO₂ a la atmósfera y degradan los desechos de los ecosistemas, promoviendo el reciclaje de elementos esenciales para el crecimiento de las plantas [57]. Existen más de 144,000 especies nombradas y clasificadas a un ritmo de alrededor de 2,000 por año; la gran mayoría (más del 93%) de las especies de hongos que existen son desconocidas para la ciencia. El número total de especies de hongos en el mundo se estima en entre 2.2 y 3.8 millones [58], en México se estiman 200,000 especies, de las cuales sólo se conocen 7,000 (aproximadamente 5 %), las entidades con mayor número de registros son Veracruz, seguida de Jalisco y Estado de México [59,60].

1.10 Características de hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos (HF) son los principales agentes infecciosos en las plantas y causan alteraciones en sus diferentes etapas de desarrollo, afectando negativamente los cultivos agrícolas. Los HF causan hasta 60% de pérdidas en los cultivos, a pesar de que solo el 10% pueden afectar a las plantas, debido a que solo un pequeño porcentaje de hongos son patógenos de especies vegetales. Los hongos para nutrirse durante el proceso de infección de las plantas, utilizan la biotrofia (dependen del tejido vegetal vivo), la necrotrofia (matan las células vegetales para obtener nutrición) y la hemibiotrofia (fase inicial biotrófica y posteriormente una fase necrotrófica) [61, 62]. Los HF producen toxinas que pueden tener un papel clave en el desarrollo de enfermedades de las plantas, la mayoría de las toxinas fitopatógenas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que producen síntomas específicos como marchitez, inhibición del crecimiento, clorosis, necrosis y manchado de las hojas [63,64]. Los HF producen enzimas como la pectinasa, quitinasa, celulasa y proteasa, que degradan la pared celular y la cutícula de la planta huésped, lo que facilita la invasión,

colonización y expansión de hongos patógenos [65]; adicionalmente, también pueden producir reguladores del crecimiento de las plantas, como auxina, citoquininas, ácido giberélico, etileno, ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido salicílico, para alterar los niveles hormonales en las plantas y debilitarlas [66].

En México, más de 80 % de las unidades de producción agropecuaria manifiestan que los insumos agrícolas y servicios son costosos; 78.2 % reporta pérdidas debidas a causas climáticas, plagas y enfermedades. En el país, más del 70 % de los PGC utilizados son usados por 10 entidades y corresponden a herbicidas, insecticidas y FGC. Por lo que es importante proponer alternativas ambientalmente inocuas, como son los bio-plaguicidas; dentro de estos, se contemplan microorganismos y agentes patógenos de insectos, como virus, hongos, bacterias, así como insecticidas de origen vegetal [67].

1.11 Bio-plaguicidas y bio-fungicidas

El creciente interés sobre la seguridad alimentaria para la población humana y la obtención de sistemas sostenibles que preserven tanto el medio ambiente y la biodiversidad, imponen desafíos para todos los actores en materia de riesgos al ambiente y salud humana, por lo que es necesario una transformación de los sistemas alimentarios que permita la intensificación de la producción basada en matrices ambientales saludables [68]. Se consideran bio-plaguicidas a los organismos naturales o formulaciones con base biológica, que tienen como ingrediente activo es un microorganismo que actúa como patógeno para una plaga de interés. Los bio-plaguicidas son productos o subproductos derivados de animales, bacterias, hongos, algas virus o protozoos de origen natural o modificados genéticamente [69] como los nematodos (*Heterorhabditis* spp.), insectos (*Trichogramma* spp.), extractos de plantas (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) y las bacterias (*Bacillus thuringiensis*). Los bio-plaguicidas, tienen un efecto relativamente bajo sobre el medio ambiente, así como para aquellos que utilizan estos productos, y tienen pocas o ninguna consecuencia adversa para los organismos no objetivo [70].

Una alternativa para disminuir el uso de PGC, es la utilización de bio-fungicidas, los cuales utilizan microorganismos antagónicos o sus productos para la prevención de enfermedades fúngicas [71]. Los bio-fungicidas actúan a través de diferentes mecanismos, como la antibiosis (antibióticos, toxinas y enzimas que afectan el desarrollo de HF), el parasitismo, la

competencia por el espacio y el sustrato [72]. Por su origen biológico y la baja concentración de sustancias activas, las formulaciones de bio fungicidas se consideran amigables con el ambiente, además de presentar baja toxicidad, actúan en una amplia gama de efectos sobre varios fitopatógenos, aumentan la resistencia de las plantas a factores adversos y pueden ser menos costosos. Los bio-fungicidas se producen en forma de polvo humectable, concentrado en emulsión, concentrado en suspensión y tabletas, se aplican tratando el material de plantación, añadiéndolo al suelo o rociando la planta en crecimiento [73]. En México, la producción comercial de bio insecticidas y otros agentes de control biológico se realiza en más de 60 empresas en 25 entidades del país, trabajando con especies como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Bacillus thuringiensis*, *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocapsae* [74], en el Cuadro 6 se presentan investigaciones de organismos con potencial bio-plaguicida en México.

Cuadro 6. Reportes de microorganismos aislados en México con potencial bio-plaguicidas.

Especie bio-control	Obtención o aislamiento	Estado	Patógeno que controla	Origen/ aislamiento del patógeno	Método de detección	Concentración usada	Control utilizado	Ref.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Lombrices de suelo	Guanajuato	<i>Spodoptera Frugiperda</i>	N.R. ^a	Bioensayos de larvas, por inmersión	7.4×10^4 conidios mL ⁻¹	Solución de Tween ^d 80 al 0,1%.	[75]
<i>Isaria fumosorosea</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	Hemípteros	Morelos	<i>Meccus pallidipennis</i>	Colonias	Suspensión conidial en cajas Petri	3×10^5 conidios/ml	2 µl de Tween 80 al 0,5%,	[76]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Suelo, larvas y rastrojo	Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo	<i>Manduca sexta</i>	N.R.	Caja de Petri con la dieta artificial	10 µg.cm ⁻² de liofilizado del complejo espora-cristal	0.02% de Tween 80.	[77]
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Galleria mellonella</i>	Oaxaca	<i>Galleria mellonella</i>	N.R.	Bioensayos de infectividad en placas	Perlas de alginato de sodio	Suspensión de nematodos en agua bidestilada	[78]
<i>Salvia connivens</i>	<i>Salvia connivens</i>	Irapuato	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Colección	Bioensayo de extracto de aceite esencial	600 y 1000 ppm	Control negativo sin extracto	[79]
<i>Beauveria bassiana</i>	N.R.	Estado de México	<i>Tamarixia radiata</i>	SENASICA ^b Colima	Inoculación pos-esporas	1×10^7 y 1×10^8 conidios mL ⁻¹	0.03% Tween 80	[80]
<i>Trichoderma</i> sp. HRG-060	<i>Cicer arietinum</i>	Sinaloa	<i>Fusarium oxysporum</i>	Accesión KJ000584 del GenBank, INIFAP ^c	Actividad antagónica mediante cultivo dual	80 %	Patógeno sin antagonista	[81]

<i>Metarhizium anisopliae</i>	Colección de hongos	Colima	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Perros infestados naturalmente en Colima.	Técnica de inmersión	1x10 ⁸ conidios/mL	Controles sin tratar en agua destilada con Tween 80 al 0,1%.	[82]
<i>Clonostachys rosea</i> <i>Gliomastix masseei</i>	Colección	Yucatán	<i>Myzus persicae</i> <i>Rhopalosiphum padi</i>	<i>Capsicum annuum</i> L.	Extractos fúngicos en diluciones dosis respuesta	8-38 µg/cm ²	Hojas recubiertas con 10 µl de disolvente acetona o metanol	[83]
<i>Cladosporium cladosporioides</i> C. <i>pseudocladosporioides</i> .	<i>Chrysanthemum</i>	Estado de México	<i>Puccinia horiana</i>	Plantas de crisantemo colectadas en el Edo. de México	Ensayo antagónico	2x10 ⁵ conidios mL ⁻¹	Hojas infectadas con <i>P. horiana</i>	[84]
<i>Metarhizium anisopliae</i> .	Suelos	Veracruz	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Cultivo del patógeno en becerros Holstein	Prueba de inmersión	1 × 10 ⁸ conidios/mL por 1 min	Solución sin conidios	[85]
<i>Penicillium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Rhizoctonia solani</i>	Hojarasca sumergida en cenotes	Yucatán	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>X. campestris</i> aisladas de <i>Daucus carota</i> <i>M. fijiensis</i> de <i>Musa acuminata</i>	Micro dilución en placa de extractos orgánicos fúngicos	2000 -200 µg/mL,	Nitrato de miconazol al 0,15% y amikacina (5 µg).	[86]

^aN.R.= no registrado, ^b= Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, ^c= Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, ^d= polioxietilen(20)sorbitanmonooleato.

1.12 Identificación en hongos

Los hongos son organismos casi omnipresentes en los ecosistemas; tienen un gran impacto económico como patógenos de plantas y animales, los hongos tienen un ciclo de vida con dos formas de reproducción, la forma sexual que es llamada teleomorfo y la asexual llamada anamorfo, esta característica reproductiva es indispensable para su identificación, ya que esta se basa en las características morfológicas, aunque en la última década los esquemas de clasificación han variado, esto es debido al desarrollo de nuevas técnicas, como las moleculares, las cuales han permitido un acceso a sus secuencias de ADN, experimentando cambios dramáticos con el desarrollo de enfoques moleculares [87,88].

1.12.1 Identificación taxonómica morfológica

La clasificación taxonómica tradicional de los hongos se basa en la morfología de una colonia, que es el resulta del crecimiento de sus hifas, estructuras cilíndricas y filiformes de 2-10 μm de diámetro y hasta varios centímetros de largo, que presentan diferentes características entre colonias como el color, el tamaño y la forma, aunque también se basa a partir de la disposición de las esporas [89]. La taxonomía de hongos basada en la morfología es esencial para determinar la micota global. En las últimas dos décadas, se introdujeron nuevas especies descubiertas basadas en caracteres tanto fenotípicos como genotípicos. Los protocolos de taxones nuevos ahora requieren un diagnóstico en inglés (o latín) para su validación. Por tanto, la taxonomía fenotípica es básica, aplicable en muchos casos, rápida y económica [90]. Con la aplicación de microscopía óptica en 1840, se reportó la primera evidencia de enfermedad de las plantas (*Phytophthora infestans*). A mediados del siglo XIX, las esporas fueron aceptadas en la clasificación y en el siglo XX, se dio énfasis a estructuras de los hongos en los sistemas taxonómicos, se les dio nombres científicos, las observaciones ornamentales de las esporas, a través del microscopio electrónico de barrido a mediados de la década de 1960, ayudó en la separación de patógenos vegetales muy similares y también ayudó a aclarar los patrones de conidiogénesis; con la llegada de la microscopía electrónica de transmisión se condujo al descubrimiento de diferencias en grupos principales, entre 1960 y 1970, se utilizó la cromatografía en capa fina y los perfiles de isoenzimas; así las metodologías basadas en el ADN pasaron del uso ocasional al uso común [91]. La identificación de hongos se basa en la evaluación de las formas de las células observadas al

microscopio, así como en la tasa de crecimiento, tipo, forma, color y olor de las colonias. Esto permite la asignación al tipo de hongos; aunque, la identificación de algunas especies suele ser imposible por similitud entre ellas [92].

1.12.2 Identificación molecular

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando unos cebadores (secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación con una longitud de 15-30 nucleótidos). Se basa en la acción de diferentes enzimas, como la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación). El ADN se añade en un tubo Eppendorf con los cebadores, los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima, posteriormente, estos, se someterán a una serie de ciclos (25-40 ciclos), con cambios de temperatura específicos que permitirán amplificar la región concreta del ADN de la muestra. En la PCR de punto final, el diseño de oligonucleótidos específicos de hongos o cebadores universales para amplificar seguido de secuenciación permite la detección precisa de estos. Para cada secuencia de nucleótidos de aislados de hongos, su identidad puede determinarse mediante comparación en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés de National Center for Biotechnology Information, GenBank), utilizando el análisis de la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) [93,94]. La amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS, Internal transcribed spacer, por sus siglas en inglés) del locus del ADNr es el estándar internacional para la identificación de especies de hongos, esta región ITS es un marcador de código de barras útil que se puede secuenciar a partir de hongos descritos anteriormente. El uso de datos moleculares para la identificación de hongos inició con los cebadores del operón ribosómico nuclear fúngico. Las secuencias de ADN fúngico generadas con estos cebadores para la subunidad grande (nrLSU-26S o 28S), subunidad pequeña (nrSSU-18S) y toda la región espaciadora transcrita interna (ITS1, 5.8S, ITS2; ca. 0.45-0.80 kb). Para la identificación a nivel de especie, el ITS es el más útil, por la porción del cistrón (gen) del ARNr de evolución más rápida, la ITS puede utilizarse sola o junto con otros genes codificadores de proteínas para la identificación de especies [95,96].

2. Planteamiento del problema

México es uno de los países con mayor población en el mundo, uno de los principales retos de este crecimiento demográfico, es la producción de alimentos para la población. La utilización de fungicidas en México para mitigar el daño que ocasionan los hongos fitopatógenos en los cultivos de interés comercial es una práctica común, tan solo en el año 2018 se emplearon más de 28,000 t de fungicidas y el estado de México se encuentra entre los 16 principales productores de alimentos del país. Los fungicidas son tóxicos y pueden causar efectos nocivos en la salud humana en función de la dosis de exposición y tiempo a la que está expuesta una persona, ya sea por ingestión, inhalación o el contacto directo con la piel; el contacto con los plaguicidas puede ocasionar efectos adversos a largo plazo como intoxicación aguda, trastornos en la reproducción y cáncer, especialmente en aquellas personas en se encuentran en contacto directo.

La tendencia mundial en la producción de alimentos se ha enfocado en una producción orgánica y sostenible, mediante sistemas de producción que sean amigables con el ambiente y la salud humana. Una alternativa es la obtención de compuestos antifúngicos de origen natural derivados de los hongos que permita disminuir el uso de plaguicidas sintéticos.

Debido a esta situación, se formularon las siguientes preguntas:

¿Cuál es la toxicidad *in vitro* de los fungicidas comerciales Coraza[®] 720 S, Cercobin[®]-M y Captan ultra[®] 50 WP en fibroblastos humanos BJ?

¿Diversas especies de hongos saprofitos aislados del Estado de México tienen actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de cultivos de interés económico?

3. Justificación

Los plaguicidas son grupos químicos utilizados para proteger los cultivos agrícolas, animales domésticos y la salud pública de los organismos nocivos vectores de enfermedades. Aunque su efectividad es comprobada para eliminar diversos microorganismos, estos productos pueden ser tóxicos para el ambiente y la salud humana, debido a que fueron creados para interferir en sistemas biológicos, no selectivos, afectando tanto a la "especie objetivo" como otras categorías de seres vivos, incluyendo al hombre. Los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser prologada, presentan solubilidad en lípidos y contribuye a su bioacumulación incrementando el riesgo potencial en la salud. Se estima que en el año 2018 se utilizaron a nivel mundial más de 4 millones de toneladas de ingrediente activo de plaguicidas, esto ha ocasionado que en países en desarrollo se presenten un millón de casos de intoxicación y cerca de 20,000 muertes al año, en México en el año 2019 se registraron 3,062 casos de intoxicaciones causadas por plaguicidas. El daño que provocan los plaguicidas, especialmente los fungicidas, en la salud humana no son claros y no está debidamente registrado, por lo que es necesario identificar cuáles son los principales fungicidas utilizados en los cultivos agrícolas del estado de México y determinar cuál es su citotoxicidad en fibroblastos BJ. Adicionalmente, identificar hongos saprofitos con capacidad antifúngica contra fitopatógenos de cultivos de interés comercial en el Estado de México, permitirá proponer una alternativa en la disminución del uso de fungicidas sintéticos que dañan la salud humana y el ambiente.

4. Hipótesis

Hi: Los fungicidas Coraza® 720 S, Cercobin®-M y Captan ultra® 50 WP presentan efectos citotóxicos *in vitro* en fibroblastos BJ en concentraciones menores a las recomendadas para su uso en campo por el fabricante

Ho: Los fungicidas Coraza® 720 S, Cercobin®-M y Captan ultra® 50 WP no presentan efectos citotóxicos *in vitro* en fibroblastos BJ en concentraciones menores a las recomendadas para su uso en campo por el fabricante

Hi: Diversas especies de hongos saprofitos aislados del Estado de México tienen actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de cultivos de interés económico

Ho: Diversas especies de hongos saprofitos aislados del Estado de México no tienen actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de cultivos de interés económico

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* de los fungicidas Coraza[®] 720 S, Cercobin[®]-M y Captan ultra[®] 50 WP a diferentes concentraciones en fibroblastos BJ, e identificar hongos saprofitos aislados del Estado de México con potencial actividad antifúngica contra fitopatógenos.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la citotoxicidad del fungicida Coraza[®] 720 S
- Determinar la citotoxicidad del fungicida Cercobin[®]-M
- Determinar la citotoxicidad del fungicida Captan ultra[®] 50 WP
- Evaluar el daño al ADN de los fibroblastos BJ e identificar la CL₅₀.
- Reactivar cepas de hongos saprofitos conservadas del Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental del Estado de México.
- Aislar cepas fúngicas fitopatógenas de cultivos de interés económico en el Estado de México.
- Evaluar en ensayo antagónico *in vitro* de las cepas fúngicas saprobias vs cepas fitopatógenas.
- Obtener los extractos orgánicos de las cepas saprofitas activas.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos.
- Determinar la citotoxicidad de los extractos fúngicos en fibroblastos dérmicos humanos.
- Identificar taxonómicamente a los hongos saprobios con capacidad antifúngica.
- Identificar taxonómicamente a los hongos fitopatógenos.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño del estudio

El estudio es de tipo experimental, transversal y exploratorio.

6.2 Universo y muestra

Se utilizaron los fungicidas comerciales disponibles en el Estado de México: A) Coraza®720 S (ingrediente activo clorotalonil), B) Cercobin®-M (ingrediente activo tiofanato metílico y C) Captan ultra® 50 WP (ingrediente activo captan), se evaluaron por separado en 350,000 células de fibroblastos humanos BJ (ATCC® CRL-2522™). Para los hongos, se evaluaron 18 hongos fitopatógenos vs 25 cepas saprofitas, todas las cepas fúngicas aisladas en el Estado de México.

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión:

- Fungicidas usados en cultivos del Estado de México.
- Hongos con crecimiento micelial aislados en el Estado de México.
- Células viables de fibroblastos humanos BJ.

Exclusión:

- Células de fibroblastos contaminadas.
- Hongos que no presenten características filamentosas.
- Actinomicetos con pseudomicelio.

Eliminación:

- Células no viables.
- Cepas fúngicas contaminadas

6.4 Variables

Operacionalización de variables.

Cuadro 7: Variables en citotoxicidad y genotoxicidad.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Instrumento de medición y/o tipo de análisis
[Independiente] Concentración de Fungicidas	Cantidad de i. a. de fungicida químico por cada litro de disolución.	Concentraciones en μM (5-1000 μM)	Cuantitativa	Razón	CL ₅₀	Micro pipeta (ANOVA)
[Dependiente] % de Viabilidad	Porcentaje de células vivas	Determinación usando una cámara Neubauer y un microscopio invertido para calcular el número total de células viables en la suspensión	Cuantitativa	Razón	Porcentaje de células vivas	ANOVA
[Dependiente] Daño al ADN	Mediciones de la cantidad de ADN presentes en los fibroblastos	Alteración en la estructura del ADN o en la función de sus proteínas asociadas causada por la interacción con los fungicidas	Cuantitativa	Razón	% ADN	Clitómetro de flujo (ANOVA)

Cuadro 8: Variables en pruebas fúngicas.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Indicador	Instrumento de medición y/o tipo de análisis
[Independiente] Cepas con acción antifúngica.	Cepas fúngicas que presenten actividad antifúngica contra fitopatógenos	Capacidad antagónica del hongo saprofito de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno.	Cualitativa	Nominal	Halos de inhibición	Cultivo de hongos en cajas Petri.
[Dependiente] Grado de antagonismo	Espacio que ocupa en el sustrato el hongo antagonista y/o patógeno en enfrentamiento dual	Capacidad del hongo antagonista en ocupar mayor dimensión el medio de cultivo y la colonia del hongo adversario	Cualitativa	Nominal	De acuerdo a la escala de Bell <i>et al.</i> [97].	Tabla de Bell
[Dependiente] Porcentaje de inhibición del crecimiento radial	Inhibición del crecimiento del patógeno por efecto de antagonista expresada en porcentaje.	Medición del diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico, mediante la prueba de difusión en disco	Cuantitativa	Razón	Longitud del halo inhibitorio (mm) $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$ Donde, PICR: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial R1: Radio del patógeno testigo R2: Radio del patógeno en enfrentamiento [99].	Vernier ANOVA
[Independiente] Concentración de extractos fúngicos	Cantidad en μg de extracto extraído del exudado de micromicetos	Cantidad de $\mu\text{g/mL}$ adicionado a las células y determinar su toxicidad	Cuantitativa	Razón	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Micro pipeta ANOVA

6.5 Instrumentos

Los instrumentos utilizados serán los descritos en las tablas de variables de citotoxicidad y genotoxicidad y de pruebas fúngicas.

6.6 Procedimiento

6.6.1 Evaluación de la toxicidad de fungicidas en fibroblastos

Con la finalidad de evaluar los FGC, estos se obtuvieron por muestras proporcionadas por los productores en campo, los FGC utilizados se describen el Cuadro 9.

Para determinar la concentración de FGC a evaluar se realizaron ensayos preliminares en concentraciones de 0.5 a 1,000 μM basados en el i. a. para determinar la DL_{50} de los fibroblastos BJ. Se utilizaron fibroblastos humanos BJ (ATCC[®] CRL-2522[™]) para este estudio. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (GIBCO[™] Invitrogen Co, USA) suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (SBF) (GIBCO[™] Invitrogen Co, USA), bicarbonato de sodio (3.7 g/L), glutamina (2mM) (Sigma Aldrich, USA), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100 mg/mL) (GIBCO[™] Invitrogen Co, USA) ambos al 1 % y se incubaron a 37° C con 85 % de humedad y 5 % CO_2 . Cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia mayor al 80 % se trataron con tripsina (0.25 %) y PBS (GIBCO[™] Invitrogen Co, USA), se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 min para obtener las células [100].

Cuadro 9. Fungicidas evaluados en fibroblastos humanos.

Nombre y casa comercial	Formulación	Composición porcentual % en peso (ingrediente activo e ingrediente inerte)	Formula química	Modo de entrada	Familia química	Dosis	Categoría toxicológica
Coraza®720 S		Ingrediente Activo: Clorotamil: Tetracloroisofitanitrilo.....52 % (equivalente a 720 g de i. a./L)	$C_8C_{14}N_2$ P. M. 265.89 g/mol	Contacto	Cloronitrilo	125-350 ml/100 L de agua – 1.3-3.5 L/Ha	4 (Precaución)
Arysta LifeScence México, S.A. de C.V. Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México	Suspensión acuosa	Ingredientes Inertes Diluyente, humectante, dispersante y compuestos relacionados ...48 %					
CAPTAN ULTRA® 50 WP		Ingrediente Activo: Captan: N-(triclorometiltio) ciclohex-4-en- 1,2-dicarboximida...50 % (Equivalente a 500 g de i.a./kg)	$C_9H_8Cl_3NO_2S$ P. M. 300.59 g/mol	Contacto	Carboximidias	200 a 350 g/100 L de agua – 1.5- 4.0 Kg/Ha	4 (Precaución)
Promotora Técnica Industrial, S.A. de C.V., Morelos, México	Polvo humectable	Ingredientes Inertes Diluyente, humectante, dispersante y compuestos relacionados...50 %					
Cercobin®-M		Ingrediente activo: Tiofanato metílico: Dimetil-4,4-0-fenilenbis (3- tioalofanato): No menos de.....70 % (equivalente a 700 g de i.a./kg)	$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$ P. M. 342.4 g/mol	Sistémico	Tiocarbamato	2 – 3 gr / L de agua - 1 kg/ha	4 (Precaución)
BASF MEXICANA, S.A. de C.V., D.F. México	Polvo humectable	Ingredientes inertes: Humectantes, dispersantes, impurezas y compuestos relacionados: No más de..... 30 %					

Fuente: etiqueta del producto.

6.6.2 Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad

La prueba de citotoxicidad fue hecha con el ensayo de por exclusión con azul de tripano con la metodología de Calderón-Segura *et al.* [101], se calculó el número total de células viables en la suspensión, para obtener el porcentaje de viabilidad. La detección de la fosforilación de ATM y H2A.X se calculó mediante un citómetro Muse™ Cell Analyzer y el estuche comercial Muse™ Multi-Color DNA Damage, siguiendo la metodología de Lewinska *et al.* [102]. El porcentaje de células negativas (sin daño en el ADN), el porcentaje de células activadas por ATM, el porcentaje de células activadas por H2A.X y el porcentaje de roturas de doble hélice de ADN (activación dual de ATM y H2A.X) se calcularon utilizando el módulo de software Muse™ Multi-Color DNA Damage, los resultados se presentaron como diagramas de puntos.

6.6.3 Bioensayo de la actividad antagónica de hongos saprofitos vs fitopatógenos

Se recolectaron y aislaron de los principales cultivos de la región 18 hongos fitopatógenos, los cuales fueron confrontados contra 25 cepas fúngicas saprofitas, previamente aisladas y conservadas en el Laboratorio de Microbiología Medica y Ambiental de la Universidad Autónoma del Estado de México. Todas las cepas fúngicas, fitopatógenos y saprofitos, fueron recolectadas en el Estado de México.

La actividad antagónica de las cepas saprofitas vs las cepas fitopatógenos se avaluó con la metodología de confrontación en ensayo dual [103]. Las cepas se cultivaron en cajas de Petri (10 cm ø) con agar papa dextrosa (PDA) Bioxón™. A los siete días de cultivo un disco micelial (5 mm) del saprófito se depositó en un extremo de una caja de Petri (6 cm ø) conteniendo PDA y en el extremo opuesto otro disco con la cepa fitopatógena. Posteriormente, se incubaron a $25 \pm 2^\circ$ C. Después de siete días se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICR) con la fórmula $ICR = [(R1-R2) / R1] \times 100\%$, donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento. Se seleccionaron los saprobios que presentaron un porcentaje de ICR mayores al 50 %. Como control negativo se utilizó un disco con micelio del fitopatógeno más un disco estéril de PDA al otro extremo de la caja. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. Adicionalmente, se comparó la cepa saprobia con respecto a la capacidad antagónica según la escala propuesta por Bell *et al.* [97] (Cuadro 10).

Cuadro 10. Grado de antagonismo de agentes de control biológico respecto a la competencia por sustrato [97].

Grado antagonico	Capacidad antagonica (antagonista-patógeno)	% de cubrimiento del antagonista de la superficie del medio
I	Antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno.	100
II	Antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.	75
III	Antagonista y patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.	50
IV	Patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando dos terceras partes de la caja Petri.	25
V	Patógeno llega a cubrir totalmente la caja Petri.	0

6.6.4 Obtención de extractos

Cada cepa de hongo saprobio que inhibió al menos a un hongo fitopatógeno ($\geq 50\%$) se cultivó en cajas Petri (10 cm) con medio PDA después de 7 días de crecimiento, a cada caja se le añadió 6 mL de agua destilada estéril y se raspó la superficie para obtener las esporas, se recuperaron 4 mL, con una pipeta estéril en un matraz se agregó agua destilada estéril (1:1) a la suspensión y con una micropipeta se tomó 5 μL y fueron inoculadas en frascos (400 mL) que contenían 40 mL de caldo papa dextrosa Bioxón™ (PDB) y se incubaron a 26° C por 14 días.

Para la producción de los extractos, se prepararon 500 mL de PDB y se esterilizó en autoclave. Posteriormente se adicionaron en cajas de cultivo celular (200 mL), 40 mL de PDB y el medio se inoculó con cultivo de hongos, se incubó a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 2 semanas. El caldo se separó del micelio mediante papel filtro (Whatman®, No 5), un matraz y una bomba de vacío. Posteriormente, al caldo recuperado fue depositado en un embudo de separación y se le agregó acetato de etilo en proporción 1:1, se dejó a temperatura ambiente por 15 min. La fase de disolvente orgánico se transfirió a un matraz de fondo redondo para su concentración al vacío utilizando un evaporador rotatorio (IKA® RV8) a 40 ° C. El disolvente residual, con los compuestos extraídos se vertieron en un vial y se dejó secar bajo flujo laminar [104], hasta obtener el peso seco de los extractos que fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.6.5 Evaluación antifúngica de los extractos orgánicos por método de dilución en placa

Los hongos fitopatógenos se inocularon en PDB e incubaron a 26°C durante 7 días. Posteriormente, a cada caja con hongo fitopatógeno, se le añadieron 6 mL de agua destilada estéril, se raspó la superficie para obtener las esporas, se recuperaron (4 mL) con una pipeta estéril y se agregó en un matraz con agua destilada estéril a proporción 1:1. El bioensayo se realizó en una microplaca estéril de 96 pozos descrita por Morales-Ubaldo *et al.* [105], con ligeras modificaciones. A todos los pozos de la microplaca se les adiciono 100 µL de medio PDB estéril, enseguida al primer pozo de cada columna de la microplaca se le adicionaron 90 µL de PDB y 10 µL del extracto orgánico (40 µg/mL), homogenizando el contenido con ayuda de una micropipeta y transfiriendo 100 µL de esta mezcla al segundo pozo, así sucesivamente del pozo A al pozo H, reduciendo la concentración inicial del extracto en cada pozo, obteniendo un volumen final de 200 µL en cada pozo y concentraciones de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL de cada extracto en cada uno de los fitopatógenos evaluados, la placa se incubó a temperatura de 26 ± 1 ° C por 7 días.

6.6.6 Determinación de la actividad inhibitoria

El crecimiento fúngico se determinó mediante la lectura de la absorbancia (Abs) respectiva a 595 nm utilizando el lector de micro placas (EPOCH[®]) a los 7 días posteriores a la incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control positivo se utilizó captan 2 mL/L y caldo nutritivo como control negativo. La inhibición del crecimiento se determinó con base en la ecuación $[(\Delta C - \Delta T) / \Delta C] \times 100$, donde ΔC es la absorbancia corregida del micro cultivo de control en 595 nm y ΔT es la absorbancia corregida de la prueba micro cultivo [106]. Al mismo tiempo, transcurridos los 7 días de incubación se adicionaron en cada pozo 50 µL de cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% (SIGMA-ALDRICH, No. T8877-5G), como un indicador redox de la degradación de compuestos orgánicos por oxidación. Después de 30 minutos de la adición del TTC, se observó si hubo presencia de hongos vivos en los pozos debido al cambio de coloración. La ausencia de color, indica un resultado negativo (ausencia de bacterias viables) [107].

6.6.7 Efecto de citotoxicidad de los extractos fúngicos en fibroblastos

Para determinar la citotoxicidad de los extractos fúngicos, se usaron fibroblastos dérmicos humanos de muestras de tejido de individuos sanos, sometidos a procedimientos de cirugía plástica, donados por el Dr. Roberto Sánchez-Sánchez del Instituto Nacional de rehabilitación de la Secretaria de Salud. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbeccós/Mezcla de Nutrientes F-12 (DMEM-F12) suplementado con SBF (10%, GIBCO™ Life Technologies, Alemania), penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml a una concentración final de 1%. Se incubaron en frascos de cultivo de 75 cm² a 37° C con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad; el medio se cambió tres veces a la semana [100]. Para la obtención de fibroblastos se agregó una solución de tripsina-EDTA (0.25%) en PBS por 3 min y se obtuvieron los fibroblastos en suspensión (1.8 x 10⁵ células/ml). Se tomaron 50 µL de la suspensión celular (9,000 células) y se colocaron en un microtubo cónico de 600 µL y se adicionó 10 µL del extracto fúngico (40 µg/µL) por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 25 µL de la suspensión y se mezclaron con 225 µL del reactivo de conteo y viabilidad celular (MCH100102, Merck™ millipore, USA) incubando 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se evaluó la viabilidad por citometría de flujo usando el analizador celular Muse (Merck millipore, USA), las mediciones fueron validadas mediante el ensayo por exclusión de azul de tripano. Los parámetros poblacionales para hacer la discriminación entre las células vivas y muertas por citometría de flujo se establecieron usando una suspensión celular fresca con un porcentaje de viabilidad mayor al 90% y células tratadas con H₂O₂ (5M) por 24 h, estas muestras fueron usadas para establecer los diagramas registro de viabilidad y tamaño celular para los fibroblastos humanos que se utilizaron para la evaluación del daño citotóxico por citometría de flujo [108].

6.6.8 Identificación taxonómica de hongos

Para cada cepa se hicieron cámaras de cultivo en placas Petri, se colocó un triángulo de vidrio con un portaobjetos y un disco de medio PDA (Bioxon™) de 15 mm de diámetro, posteriormente se inoculó con una asada de esporas de la cepa de interés, luego fue depositada un cubreobjetos y se agregó 10 mL de agua-glicerina (10:1) cerrando la caja, y se

incubó a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ por siete días. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos que contenía micelio y esporas del hongo y se colocó sobre un portaobjetos y fue teñida con azul de algodón [109]; las observaciones se hicieron en un microscopio óptico (LeicaTM) a seco débil (10x) y seco fuerte (40x), para lo cual se utilizó la guía de identificación de Barnett y Hunter [110] y Watanabe [111] para la descripción.

6.7 Recolección de datos

Registro visual de los experimentos, anotaciones en bases de datos de las mediciones obtenidas y mediante software ya establecido.

6.8 Análisis estadístico

Para las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, el crecimiento radial del patógeno y de los antagonistas se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con medidas repetidas y se realizará la prueba *post hoc* de Tukey ($P < 0,05$), para determinar CL_{50} se realizó el ajuste de curva de Hill mediante el software de GraphPad Prism. Los resultados de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, serán transformado con la fórmula $\arcsen(\sqrt{x/100})$ y se someterá a análisis de varianza (ANOVA) y prueba *post hoc* de Tukey ($P < 0,05$). Los datos de las pruebas mencionadas, serán analizadas utilizando el paquete estadístico IBM[®] SPSS statistics 25. Para los casos correspondientes se aplicará la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. Los resultados de inhibición de los extractos se realizó ANOVA de 2 vías con una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ($P < 0,05$, $< 0,001$ y $< 0,0001$) utilizando GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California EE. UU.

6.9 Ética de estudio

La realización de este proyecto respetará las siguientes Normas, Convenios y Protocolos: Se seguirán los parámetros bioéticos establecidos en la declaración de Helsinki con el uso de células y tejidos de origen humano en procesos de investigación [112].

Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Que tiene por objeto determinar las especificaciones mínimas que deben tener los medios de cultivo para microorganismos en general [113].

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo general [114].

7. Resultados

7.1 Artículo publicado

7.1.1 Título del artículo

Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of the captan-based fungicides, chlorothalonil-based fungicides and methyl thiophanate-based fungicides in human fibroblasts BJ

7.1.2 Página frontal del manuscrito



Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of the captan-based fungicides, chlorothalonil-based fungicides and methyl thiophanate-based fungicides in human fibroblasts BJ

Andy J. Moo-Muñoz^a, Erika P. Azorín-Vega^b, Ninfa Ramírez-Durán^a, and Pablo Antonio Moreno-Pérez^a

^aLaboratory of Medical and Environmental Microbiology University, Autonomous of the State of Mexico, Paseo Tollocan, State of Mexico;

^bNational Radiopharmaceutical Research and Development Laboratory, National Institute for Nuclear Research, La Marquesa-Ocoyoaca, State of Mexico

ABSTRACT

The objectives of this study were to examine cytotoxic and genotoxic damage in human BJ fibroblasts caused by three pesticides used worldwide by trypan blue dye exclusion assays and to measure the relative level of phosphorylated histone H2A.X by flow cytometry at different concentrations. Captan-based fungicide and methyl thiophanate-based fungicide (100 and 1000 μM) showed immediate cytotoxic effects; furthermore, after 24 h, captan-based fungicide, chlorothalonil-based fungicide and methyl thiophanate-based fungicide caused cytotoxic effects in the concentration ranges of 40–100 μM , 30–100 μM and 150–1000 μM , respectively. All fungicides generated DNA damage in the treated cells by activating ATM and H2A.X sensor proteins. The three fungicides tested generated DNA double-stranded breaks and showed cytotoxicity at concentrations 33, 34, and 5 times lower (captan, chlorothalonil and thiophanate-methyl respectively) than those used in the field, as recommended by the manufacturers.

ARTICLE HISTORY

Received 30 October 2020
Accepted 17 August 2021

KEYWORDS

Genotoxicity; cytotoxicity; fungicide; viability; phosphorylation

Introduction

Pesticides are important for food production as they maintain or increase agricultural production yields to feed the rising world population.^[1] Among these pesticides are fungicides, such as captan-based fungicides [N-(trichloromethylthio)-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide], chlorothalonil-based fungicides (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile), and methyl thiophanate-based fungicides [1, 2-bis-(3-methoxy carboxy-2-thioureidobenzene)], which are widely used in the pre- and postharvest of crops to control of phytopathogenic fungi, greenhouses, foliar treatment, soils, seeds, cereals, fruits, vegetables, and ornamentals.^[2–4] These fungicides are used in Germany, Australia, Austria, Belgium, Spain, the United States, France, Holland, Mexico and Portugal, among others countries.^[5]

Recently, it was reported that 530,000 tons of fungicides and bactericides were used for agricultural applications worldwide,^[6] but there is insufficient information on their toxicity since manufacturers do not provide it. The World Health Organization estimated 3 million cases of acute poisoning, including suicides, and more than 2 million deaths caused by pesticides.^[7] These figures have led to the study of the effects of pesticides in biological models such as their effects on the development of zebrafish (*Danio rerio*),^[8] physiological metabolism and metabolic disturbances in Sprague Dawley rats,^[9,10] and genotoxicity

in blood cells and hepatoma (HepG2) cells and toxicity in *Daphnia magna*.^[11,12]

Cell toxicity assays are widely used to detect a variety of agents that show direct cytotoxic effects.^[13] The main kinase activated in response to DNA double-strand breaks is ataxia telangiectasia mutated protein kinase (ATM). The ATM protein exists as a dimer, but it is rapidly dissociated and phosphorylated at serine 1981 in response to damage from ionizing radiation. Once activated, ATM phosphorylates several factors, including histone H2A.X. Phosphorylation of the variant histone H2A.X at serine 139 (phospho-H2A.X) by ATM is an important indicator of DNA damage. As the level of DNA damage increases, the degree of phosphorylation of histone H2A.X increases and accumulates at sites where a DNA double-strand break has occurred, which is often used as an indicator of the level of DNA damage present in the cell.^[14]

This work evaluated cytotoxic and genotoxic damage in human BJ fibroblasts exposed to three pesticides used worldwide by trypan blue dye exclusion assays and measured the relative level of phosphorylated histone H2A.X by flow cytometry.

Materials and methods

Chemical fungicides evaluated

CAPTAN ULTRA® 50 WP (captan-based fungicide) as a wettable powder (with 500 g a.i./kg) was purchased from

7.1.3 Carta de aceptación

Dr. Pablo Moreno
Integrante del laboratorio de Microbiología Médica y ambiental.
Facultad de medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.

De: em.jeshb.0.7561be.2ba0a254@editorialmanager.com <em.jeshb.0.7561be.2ba0a254@editorialmanager.com> en nombre de Journal of Environmental Science and Health, Part B <em@editorialmanager.com>

Enviado: martes, 17 de agosto de 2021 12:44 p. m.

Para: Pablo Moreno Pérez <saieto@hotmail.com>

Asunto: 201323899 (Journal of Environmental Science and Health, Part B) Your submission has been accepted

RE: Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of the captan-based fungicides, chlorothalonil-based fungicides and methyl thiophanate-based fungicides in human fibroblasts BJ

201323899

Manuscript ID JESHB-2020-0359R1

Journal of Environmental Science and Health, Part B

Dear Dr. Perez,

We are pleased to inform you that your paper has been accepted for publication in the Journal of Environmental Science and Health, Part B. Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Your paper will be sent to the publisher and placed into production. Proofs of the paper along with the copyright agreement and offprint order form will be sent by the Taylor & Francis to the corresponding author by e-mail. Publication of the manuscript may be delayed if the copyright agreement and corrected proof copy are not returned promptly to the publisher.

Taylor & Francis strives to be compliant with the open access (OA) policies of the major national and international funding bodies. Information about funder compliance and OA policies can be found on our [Author Services](#) website. Details of our Green OA policy, including deposit in institutional and subject repositories, can be found on the [Sharing your work](#) page. **We recommend that you retain your Accepted Manuscript for this purpose.**

For **more** information regarding the versions of your article that can be used to meet Green OA requirements, and the embargo period that applies, please see the [open access journal finder](#) page

We thank you for choosing this journal for publishing your research and hope that you will consider doing so again in the future.

Sincerely yours,
Shahamat U. Khan
Editor-in-Chief
Journal of Environmental Science and Health, Part B

7.1.4 Resumen

Abstract

The objectives of this study were to examine cytotoxic and genotoxic damage in human BJ fibroblasts caused by three pesticides used worldwide by trypan blue dye exclusion assays and to measure the relative level of phosphorylated histone H2A.X by flow cytometry at different concentrations. Captan-based fungicide and methyl thiophanate-based fungicide (100 and 1000 μM) showed immediate cytotoxic effects; furthermore, after 24 h, captan-based fungicide, chlorothalonil-based fungicide and methyl thiophanate-based fungicide caused cytotoxic effects in the concentration ranges of 40–100 μM , 30–100 μM and 150–1000 μM , respectively. All fungicides generated DNA damage in the treated cells by activating ATM and H2A.X sensor proteins. The three fungicides tested generated DNA double-stranded breaks and showed cytotoxicity at concentrations 33, 34, and 5 times lower (captan, chlorothalonil and thiophanate-methyl respectively) than those used in the field, as recommended by the manufacturers.

Keywords: Genotoxicity, cytotoxicity, fungicide viability, phosphorylation

7.1.5 Apartados del artículo

El artículo publicado puede visualizarse en el siguiente link:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03601234.2021.1972721?scroll=top&needAccess=true>

La revista *The Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* proporciona una salida para informes de investigación originales sobre técnicas analíticas o mejoras en métodos existentes aplicables a residuos de PGC, medicamentos veterinarios, antibióticos, contaminantes de alimentos (naturales y aditivo), y otros contaminantes orgánicos y químicos emergentes, y sus metabolitos en la ecosfera, posee un con un factor de impacto JCR de 1.990 (2020), 2.116 (2020) 5 year IF, 2.9 (2020) CiteScore, Q2 (2020) CiteScore Best Quartile, 0.771 (2020) SNIP y 0.445 (2020) SJR.

El artículo publicado cuenta con la cita siguiente:

Andy J. Moo-Muñoz, Erika P. Azorín-Vega, Ninfa Ramírez-Durán & Pablo Antonio Moreno-Pérez. (2021). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of the captan-based fungicides, chlorothalonil-based fungicides and methyl thiophanate-based fungicides in human fibroblasts BJ, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, DOI: 10.1080/03601234.2021.1972721

7.2 Artículo publicado

7.2.1 Carta de aceptación

ESTADO DE LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PLAGUICIDAS EN MÉXICO
[STATE OF THE PRODUCTION AND CONSUMPTION OF PESTICIDES IN MEXICO]

7.2.2 Pagina frontal del manuscrito

Forum [Foro]



ESTADO DE LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PLAGUICIDAS EN MÉXICO † [STATE OF THE PRODUCTION AND CONSUMPTION OF PESTICIDES IN MEXICO]

Andy J. Moo-Muñoz¹, Erika P. Azorín-Vega², Ninfa Ramírez-Durán¹
and Martín P. Moreno-Pérez^{1*}

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza
s/n. Toluca, Estado de México. Email: saieto@hotmail.com

²Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México Toluca-La
Marquesa s/n, Ocoyoacac, Estado de México.

* Corresponding author

SUMMARY

Background. One of the problems in Mexico about the use and quantification of pesticides, is that there is a lack of efficient regulation and monitoring because there is no detailed information on its use, so this work analyzes the use of pesticides in Mexico. **Objective.** To know the current situation of the use of chemical pesticides used in Mexico. **Methodology.** A search and systematic review of scientific publications related to pesticides in Mexico during the last 20 years in indexed or arbitrated journals. **Results.** The analysis of these investigations indicates that in Mexico in 2018 > 61,000 tons of pesticides were imported, although in 2017 the production was greater than 106 thousand tons. One of the problems in Mexico, as in other countries, is that there is a lack of efficient regulation and monitoring of the use of pesticides. During the last two decades the total consumption of pesticides in Mexico increased between 57-65%, the data from the available sources of their consumption show differences of the annual average of 27%, equivalent to 14,000 t per year, greater than the consumed in 2016 by countries such as Uruguay, Greece, Portugal, the Netherlands and Honduras. **Implications.** In order to reduce this problem, it is proposed to implement a "national logbook for the registration and use of pesticides" that includes the type of pesticide used, brand, active ingredient, applied dose (Kg / ha) and frequency of application. **Conclusions.** The obvious inconsistency of thousands of tons between national and international statistics is due to an inadequate quantification of pesticide use, a characteristic that occurs not only in Mexico. This situation is a serious global threat with environmental, economic and social implications, since the potential ecological damage is underestimated. Knowing the actual amount of pesticides used and will allow promoting real strategies aimed at reducing their use.

Keywords: Consumption; pesticides; environment; ecosystems; toxic.

RESUMEN

Antecedentes. Una de las problemáticas en México sobre la utilización y cuantificación de plaguicidas, es que se carece de una eficiente regulación y monitoreo al no existir información detallada sobre su uso, por lo que este trabajo analiza el uso de plaguicidas en México. **Objetivo.** Conocer la situación actual del uso de plaguicidas químicos utilizados en México. **Metodología.** Se realizó una búsqueda y revisión sistemáticamente de publicaciones científicas relacionadas con plaguicidas en México durante los últimos 20 años en revistas indizadas o arbitradas. **Resultados.** El análisis de estas investigaciones indica que en México en el año 2018 se importaron >61,000 toneladas de plaguicidas, a pesar de que en el año 2017 la producción fue mayor a 106 mil toneladas. Una de las problemáticas en México, como en otros países, es que se carece de una eficiente regulación y monitoreo del uso de plaguicidas. Durante las dos últimas décadas el consumo total de plaguicidas en México se incrementó entre 57-65 %, los datos de las fuentes disponibles de su consumo presentan diferencias del promedio anual del 27 %, que equivalen a 14,000 t por año, cantidad mayor a la consumida en 2016 por países como Uruguay, Grecia, Portugal, Holanda y Honduras. **Implicaciones.** Con la finalidad de disminuir esta problemática, se propone implementar una "bitácora nacional de registro y utilización de plaguicidas" que incluya, el tipo de plaguicida utilizado, marca, ingrediente activo, dosis aplicada (Kg/ha) y frecuencia de aplicación. **Conclusiones.** La evidente incongruencia de miles de toneladas entre las estadísticas nacionales con las internacionales, es debido a una inadecuada cuantificación del uso de plaguicidas, característica que se presenta no solo en México. Esta situación es una grave amenaza mundial con implicaciones ambientales, económicas y sociales,

† Submitted March 11, 2020 – Accepted March 30, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

7.2.3 Carta de aceptación

← [TSAES] Editor Decision
Reenvió este mensaje el Vie 27/03/2020 12:55 PM.
Traducir mensaje a: Español | No traducir nunca de: Inglés

CS Carlos A. SANDOVAL-CASTRO <revistaccba_boletines@correo.uady.mx>
Jue 26/03/2020 06:00 PM
Para: Usted

Andy Jose Moo Muñoz:

We have reached a decision regarding your submission to Tropical and Subtropical Agroecosystems, "ESTADO DE LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE PLAGUICIDAS EN MÉXICO".

I am pleased to inform you that your manuscript would be accepted after changes.

Please log into your account and download the files containing the reviewers comments.

Please make corrections as appropriate using the track changes tool of word. Once you have the revised version, please upload the DOC files containing the revised and a clean version into your account and notify the editor.

while uploading the revised version please be sure to include/update in the Journal online system information (follow the link EDIT METADATA):

Author(s) (order, affiliation, email), title, summary and keywords.

for all authors use capital letter only at the beginning of each name and surname (i.e.: J. Paredes, Juan Paredes)

Please verify that the manuscript information (title, summary and titulo y resumen)
* it is captured in both languages windows (spanish and english)
*Please use capital letters for "title" and "titulo" along the phrase except for scientific names

*update summary and keywords
Please be sure keywords are separated by ";" and not ";

Dr. Carlos A. Sandoval Castro
Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuaria, Universidad Autónoma de Yucatán
carlos.sandoval@correo.uady.mx

Tropical and Subtropical Agroecosystems
<http://www.veterinaria.uady.mx/pjs/index.php/TSA>

7.2.4 Resumen

SUMMARY

Background. One of the problems in Mexico about the use and quantification of pesticides, is that there is a lack of efficient regulation and monitoring because there is no detailed information on its use, so this work analyzes the use of pesticides in Mexico. **Objective.** To know the current situation of the use of chemical pesticides used in Mexico. **Methodology.** A search and systematic review of scientific publications related to pesticides in Mexico during the last 20 years in indexed or arbitrated journals. **Results.** The analysis of these investigations indicates that in Mexico in 2018> 61,000 tons of pesticides were imported,

although in 2017 the production was greater than 106 thousand tons. One of the problems in Mexico, as in other countries, is that there is a lack of efficient regulation and monitoring of the use of pesticides. During the last two decades the total consumption of pesticides in Mexico increased between 57-65%, the data from the available sources of their consumption show differences of the annual average of 27%, equivalent to 14,000 t per year, greater than the consumed in 2016 by countries such as Uruguay, Greece, Portugal, the Netherlands and Honduras. **Implications.** In order to reduce this problem, it is proposed to implement a "national logbook for the registration and use of pesticides" that includes the type of pesticide used, brand, active ingredient, applied dose (kg/ha) and frequency of application. **Conclusions.** The obvious inconsistency of thousands of tons between national and international statistics is due to an inadequate quantification of pesticide use, a characteristic that occurs not only in Mexico. This situation is a serious global threat with environmental, economic and social implications, since the potential ecological damage is underestimated. Knowing the actual amount of pesticides used and will allow promoting real strategies aimed at reducing their use.

Keywords: Consumption; pesticides; environment; ecosystems; toxic.

7.2.5 Apartados del artículo

El artículo publicado puede visualizarse en el siguiente link:

<https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/3225>

La revista *Tropical and Subtropical Agroecosystems* es una revista de publicación internacional revisada por pares de carácter multidisciplinario de su alcance y fomenta la presentación de manuscritos originales de todas las disciplinas involucradas en esta área. La revista pertenece a los índices: CONACYT-México, Matriz de Información para el Análisis de Revistas (MIAR), Google Académico, REDIB, Puerta de la investigación, SJR 2019 0.156 e ISSN: 1870-0462 y en el artículo se exponen aspectos relevantes del análisis y producción

de PGC en México, su uso y comparación estadística internacional derivado del proyecto de tesis doctoral, y cuenta con la cita siguiente:

Moo-Muñoz, A.J.; Azorín-Vega, E.P.; Ramírez-Durán, N.; Moreno-Pérez, M.P. State of the production and consumption of pesticides in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. (2020), 23, #43.

8. Discusión general

México es un importante productor agrícola a nivel mundial, pero también se encuentra entre los principales consumidores de PGC, en el año 2018 se utilizaron más de 53,000 toneladas de estos productos [17]. La OMS [1], reconoce que la utilización de PGC es una necesidad indispensable para producir alimentos para la población mundial en crecimiento, aunque son eficaces para el control de plagas, causan contaminación al ambiente, persisten en el ambiente y sistemas biológicos, son solubles en lípidos, además de causar daños a especies no objetivo, incrementando potencialmente el riesgo en la salud humana [6,22,115,116].

Debido a la gran cantidad de PGC utilizados en México y a su importante incremento, se requiere implementar estrategias inmediatas para disminuir su utilización. Es necesario fortalecer los controles sobre los PGC debido a que causan enfermedades crónicas, intoxicaciones y muertes, por lo que se sugiere la adopción de alternativas más seguras. Ante el panorama ambiental y de salud, es urgentemente necesario implementar estrategias inmediatas para disminuir la utilización y control de PGC, por que causan enfermedades crónicas, intoxicaciones y muertes. La utilización bio-plaguicidas, a diferencia de los PGC convencionales, son derivados de origen natural como, animales, plantas y microorganismos; los bio-plaguicida son efectivos en pequeñas cantidades y menos tóxicos para el ambiente, ya que se degradan rápidamente [117].

La implementación de bio-plaguicidas, puede reducir el uso de PGC sintéticos en México, ya que se encuentra evidencia de que en México se encuentran microorganismos con capacidad antifúngica. Adicionalmente, las tasas de adopción de bio-plaguicidas van surgiendo como línea de investigación y desarrollo en expansión en México y América Latina [118]. Aunque el potencial del uso de bio-plaguicidas en México es subestimado, su futuro es prometedor.

9. Conclusiones generales.

Los bio-plaguicidas son una opción, debido a que son una alternativa tecnológica para el control de plagas.

Los fungicidas comerciales Coraza[®]720 S, Cercobin[®]-M y Captan ultra[®] 50 WP, son fungidas que se encuentran disponibles en el mercado y son utilizados en el Estado de México.

Los fungicidas comerciales Coraza[®]720 S, Cercobin[®]-M y Captan ultra[®] 50 WP, ocasionan daño al ADN en fibroblastos BJ, activando ATM y fosforilación de H2A.X.

Las dosis evaluadas de los fungicidas son más tóxicas en concentraciones 30 veces menores a las dosis recomendadas por el fabricante para su aplicación en campo.

Los hongos fitopatógenos encontrados son de gran relevancia debido dañan cultivos de interés comercial y pueden ser de prioridad científicas y económicas en el Estado de México.

Diversos géneros de hongos saprofitos del Estado de México tienen actividad antifúngica.

10. Biblioheerografía utilizada

1. OMS, Organización Mundial de la Salud. Residuos de los plaguicidas en los alimentos. [Internet] [19-Feb-2018] [Consultado: 22 Ene. 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
2. Yang Y, Liu W, Wang J, Zhang Y, Xu W, Tao L. The different effects of natural pyrethrins and beta-cypermethrin on human hepatocyte QSG7701 cells by ROS-mediated oxidative damage. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25(24):24230–24240. doi:10.1007/s11356-018-2503-3
3. EPA, United States Environmental Protection Agency. Basic Information about Pesticide Ingredients. 2018. [Internet] [Consultado: 23 Ene. 2019]. Disponible en: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>
4. Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini, J-B. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Front Endocrinol.* 2019; 10:743. doi: 10.3389/fendo.2019.00743.
5. Cruz-González G, Julcour C, Jáuregui-Haza U. El Estado actual y perspectivas de la degradación de pesticidas por procesos avanzados de oxidación. *Rev. cuba. quim.* 2017; 29(3):492-516.
6. Arellano-Aguilar O, Rendón von Osten, J. La huella de los plaguicidas en México. Greenpeace México A. C, México. 2016. [Internet] Disponible en: <https://www.greenpeace.org/archive-mexico/es/Footer/Descargas/reports/Agricultura-sustentable-y-transgenicos/La-huella-de-los-plaguicidas-en-Mexico/>
7. Gupta S, Gupta K. Bioaccumulation of Pesticides and Its Impact on Biological Systems. In *Pesticides in Crop Production* (eds P.K. Srivastava, V.P. Singh, A. Singh,

D.K. Tripathi, S. Singh, S.M. Prasad and D.K. Chauhan). 2020.

<https://doi.org/10.1002/9781119432241.ch4>

8. OMS, Organización Mundial de la Salud. Plaguicidas. Informe Técnico No. 12. Ginebra. Toxicidad de los plaguicidas para el hombre: 12 informe del Comité de Expertos en Insecticidas. [Internet] [Consultado 7 Sep. 2018]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/37744>.
9. Boedeker W, Watts M, Clausing P, Marquez E. The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. *BMC Public Health*. 2020; 20(1):1875. doi: 10.1186/s12889-020-09939-0.
10. WHO, World Health Organization. The Public Health Impact of Chemicals: Knowns and Unknowns International Programme on Chemical Safety; WHO Document Production Services, Ginebra Suiza. 2016. [Internet] [Consultado 8 Sep 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/ipcs/publications/chemicals-public-health-impact/en/>
11. IARC, International Agency for Research on Cancer. Agents classified by the IARC Monographs volumes 1-122. 2018. [Internet] [Consultado 03 Oct 2018]. Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>
12. PAN, Pesticide Action Network, North America. Pesticide Database. Berkeley, CA, 2019. [Internet] [Consultado: 01 Feb 2019]. Disponible en: <http://www.pesticideinfo.org>
13. Yadav IC, Devi NL. Chapter: 7 Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment Environmental. En: Anil Kumar, J C Singhal, Kuaanan Techato, Luisa T. Molina, Neetu Singh, Prashant Kumar, Pravinder Kumar, Ram Chandra, Santiago Caprio, Seema Upadhye, Seiichiro Yonemura, Surampalli Y Rao, Tian C Zhang, U C

- Sharma y Y P Abrol editores. Environmental science and engineering. Edición: Vol. 6: Toxicology, Publisher: Studium Press LLC, USA. 2017. p. 140-158.
14. Bonvoisin T, Utyasheva L, Knipe D, Gunnell D, Eddleston M. Suicide by pesticide poisoning in India: a review of pesticide regulations and their impact on suicide trends. *BMC Public Health*. 2020; 20(1):251. doi: 10.1186/s12889-020-8339-z.
 15. Akashe MM, Pawade UV, Nikam, AV. CLASSIFICATION OF PESTICIDES: A REVIEW. *Int J Res Ayurveda Pharm*. 2018; 9(4):144–150. doi:10.7897/2277-4343.094131
 16. Hassaan MA, El Nemr A. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *Egypt J Aquat Res*. 2020. doi:10.1016/j.ejar.2020.08.007
 17. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Plaguicidas Uso. FAOSTAT- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Roma, Italia. 2020. [Internet] [Consultado: 11 Ene 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>
 18. SEMARNAT-SNIAR, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales. Agua Indicador básico 2.2-5. Consumo aparente de plaguicidas. [Internet] [Consultado: 03 Feb 2020]. Disponible en: https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/indicadores16/conjuntob/indicador/02_agua/2_2_5.html
 19. Bhandari G, Atreya K, Yang X, Fan L, Geissen V. Factors affecting pesticide safety behaviour: The perceptions of Nepalese farmers and retailers. *Sci Total Environ*. 2018; 631-632:1560-1571. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.144.

20. Ali MP, Kabir MMM, Haque SS, Qin X, Nasrin S, Landis D, Holmquist B, Ahmed N. Farmer's behavior in pesticide use: Insights study from smallholder and intensive agricultural farms in Bangladesh. *Sci Total Environ.* 2020; 747:141160. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141160.
21. Riaz Shah. Pesticides and Human Health [Online First], *IntechOpen.* 2020. DOI: 10.5772/intechopen.93806. Disponible en: <https://www.intechopen.com/online-first/pesticides-and-human-health-1>
22. Amizadeh M, Safari-Kamalabadi M, Askari-Saryazdi G, Amizadeh M, Reihani-Kermani H. Pesticide Exposure and Head and Neck Cancers: A Case-Control Study in an Agricultural Region. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2017; 29(94):275-285.
23. FAO and WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Pesticide residues in food 2019 - Report 2019 - Joint FAONZHO Meeting on Pesticide Residues. 2020. Rome.
24. Hao Y, Chen H, Xu W, Gao J, Yang Y, Zhang Y, Tao L. Roundup® confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. *Environ Pollut.* 2019; 252(Pt A):917-923. doi:10.1016/j.envpol.2019.05.128
25. Cobanoglu H, Coskun M, Coskun M, Çayir A. Results of buccal micronucleus cytome assay in pesticide-exposed and non-exposed group. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019; 26(19):19676-19683. doi:10.1007/s11356-019-05249-0
26. Kahl VFS, Dhillon V, Fenech M, de Souza MR, da Silva FN, Marroni NAP, Nunes EA, Cerchiaro G, Pedron T, Batista B, Cappetta M, Martínez-López W, Simon D, da Silva J. Occupational Exposure to Pesticides in Tobacco Fields: The Integrated Evaluation of Nutritional Intake and Susceptibility on Genomic and Epigenetic Instability. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 1–13. doi:10.1155/2018/7017423.

27. Sabarwal A, Kumar K, Singh RP. Hazardous Effects of Chemical Pesticides on Human Health- Cancer and Other Associated Disorders. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018; 63:103-114. doi: 10.1016/j.etap.2018.08.018.
28. Sabarwal A, Kumar K, Singh RP. Hazardous Effects of Chemical Pesticides on Human Health- Cancer and Other Associated Disorders. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018; 63:103-114. doi: 10.1016/j.etap.2018.08.018.
29. Serrano-Medina A, Ugalde-Lizárraga A, Bojorquez-Cuevas MS, Garnica-Ruiz J, González-Corral MA, García-Ledezma A, Pineda-García G, Cornejo-Bravo JM. Neuropsychiatric Disorders in Farmers Associated with Organophosphorus Pesticide Exposure in a Rural Village of Northwest México. *Int J Environ Res Public Health.* 2019; 16(5):689. doi: 10.3390/ijerph16050689.
30. Polanco Rodríguez AG. Impact of the Pesticides in the Environment and Public Health: The Case of Yucatan, Mexico. *Int Arch Public Health Community Med.* 2018; 2:005. doi.org/10.23937/iaphcm-2017/1710005
31. Galindo-Reyes JG, Alegria H. Toxic effects of exposure to pesticides in farm workers in Navolato, Sinaloa (Mexico). *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2018; 34(3):505-516. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.03.12>
32. Carbajal-López Y, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Calderón-Segura ME, Martínez-Arroyo A. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015; 23(3):2513-20. doi: 10.1007/s11356-015-5474-7.
33. Blanco-Muñoz J, Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, González-Alzaga B, Bassol S, Cebrian ME, López-Carrillo L, Aguilar-Garduño C. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture

- workers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016; 243(1):19-26. doi: 10.1016/j.taap.2009.11.008
34. Kuai X, Barraco C, Després C. Combining Fungicides and Prospective NPR1-Based “Just-in-Time” Immunomodulating Chemistries for Crop Protection. *Front Plant Sci*. 2017; 8:1715. doi:10.3389/fpls.2017.01715
35. FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. FRAC. Code List © (2020): Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). 2020. [Internet] [Consultado 3 Mar 2021]. Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2
36. COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. [Internet] [Consultado: 07 Feb 2021]. Disponible en: <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
37. Bojarski B, Witeska M. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish—a review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020; 27(16):19236-19250 doi:10.1007/s11356-020-08248-8
38. Gomes SIL, Ammendola A, Casini S, Amorim MJB. Toxicity of fungicides to terrestrial non-target fauna - Formulated products versus active ingredients (azoxystrobin, cyproconazole, prothioconazole, tebuconazole) - A case study with *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta). *Sci Total Environ*. 2021; 754:142098. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142098
39. Fisher A 2nd, DeGrandi-Hoffman G, Smith BH, Johnson M, Kaftanoglu O, Cogley T, Fewell JH, Harrison JF. Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mito-toxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Pollut*. 2021; 269:115964. doi:10.1016/j.envpol.2020.115964.

40. Xu J, Xiong H, Zhang X, Muhayimana S, Liu X, Xue Y, Huang Q. Comparative cytotoxic effects of five commonly used triazole alcohol fungicides on human cells of different tissue types. *J Environ Sci Health B*. 2020;55(5):438-446. doi:10.1080/03601234.2019.1709377
41. Sanchez CL, Souders CL 2nd. Pena-Delgado CJ, Nguyen KT, Kroyter N, Ahmadie NE, Aristizabal-Henao JJ, Bowden JA, Martyniuk CJ. Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochondrial oxidative respiration and lipids in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*. 2020; 80:76-86. doi: 10.1016/j.neuro.2020.06.009.
42. Cao F, Li H, Zhao F, Wu P, Qian L, Huang L, Pang S, Martyniuk CJ, Qiu L. Parental exposure to azoxystrobin causes developmental effects and disrupts gene expression in F1 embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ*. 2019; 646:595-605. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.331
43. Colle D, Farina M, Ceccatelli S, Raciti M. Paraquat and Maneb Exposure Alters Rat Neural Stem Cell Proliferation by Inducing Oxidative Stress: New Insights on Pesticide-Induced Neurodevelopmental Toxicity. *Neurotox Res*. 2018; 34(4):820-833. doi:10.1007/s12640-018-9916-0.
44. Pan X, Cheng Y, Dong F, Liu N, Xu J, Liu X, Wu X, Zheng, Y. Stereoselective bioactivity, acute toxicity and dissipation in typical paddy soils of the chiral fungicide propiconazole. *J Hazard Mater*. 2018; 359:194-202. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.061
45. Salih-Istifli E, Tahir Hüsünet M, Basri Ila H. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. *Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds*. *IntechOpen*. 2019. doi:10.5772/intechopen.88368

46. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 2020; 1–18. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
47. Judson RS, Thomas RS, Baker N, Simha A, Howey XM, Marable C, Kleinstreuer NC, Houck KA. Workflow for defining reference chemicals for assessing performance of in vitro assays. *ALTEX.* 2019; 36(2): 261–276. <https://doi.org/10.14573/altex.1809281>
48. Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene, J. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Caaveiro JMM, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanaryan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kahl SD, Kales SC, Kirshner S, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Trask OJ Jr, Weidner JR, Wildey MJ, Xia M, Xu X, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–. 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>
49. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity. IntechOpen.* 2018. doi:10.5772/intechopen.71923
50. Mohamed S, Sabita U, Rajendra S, Raman D. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob J Pharmaceu Sci.* 2017; 1(5):555575. DOI: 10.19080/GJPPS.2017.02.555575
51. Wilson A, Grabowski P, Elloway J, Ling S, Stott J, Doherty A. Transforming early pharmaceutical assessment of genotoxicity: applying statistical learning to a high throughput, multi end point in vitro micronucleus assay. *Sci Rep.* 2021; 11(1):2535. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82115-5>
52. Hershman JM, France B, Hon K, Damoiseaux R. Direct quantification of gamma H2AX by cell-based high throughput screening for evaluation of genotoxicity of

- pesticides in a human thyroid cell lines. *Environ Mol Mutagen*. 2017; 58(7):522-528. doi:10.1002/em.22103
53. Al-Aamri HM, Ku H, Irving HR, Tucci J, Meehan-Andrews T, Bradley C. Time dependent response of daunorubicin on cytotoxicity, cell cycle and DNA repair in acute lymphoblastic leukaemia. *BMC Cancer*. (2019), 19(1):179. doi: 10.1186/s12885-019-5377-y.
54. SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Infografía Agroalimentaria 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2019. 53 pp. [Internet] [Consultado Feb 2021] Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Infografias-2018
55. INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Agenda Técnica Agrícola de Estado de México. Ciudad de México, México. 2017. p. 423.
56. Větrovský T, Kohout P, Kopecký M, Machac A, Man M, Bahnmann BD, Brabcová V, Choi J, Meszárošová L, Human ZR, Lepinay C, Lladó S, López-Mondéjar R, Martinović T, Mašínová T, Morais D, Navrátilová D, Odriozola I, Štursová M, Švec K, Tláskal V, Urbanová M, Wan J, Žifčáková L, Howe A, Ladau J, Peay KG, Storch D, Wild J, Baldrian, P. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nat Commun*. 2019; 10(1):5142. doi:10.1038/s41467-019-13164-8
57. Heredia AG, Arias MRM. Los hongos microscópicos saprobios: un valioso recurso ignorado en un país megadiverso. CONABIO. *Biodiversitas*. 2021; 154:12-16.
58. Cannon P, Aguirre-Hudson B, Aime M, Ainsworth A, Bidartondo M, Gaya E, Hawksworth D, Kirk P, Leitch I, Lücking R. Definition and diversity. In: K. J. Willis (ed.), *State of the World's Fungi. Report*. Royal Botanic Gardens, Kew. 2018. p. 4–11.

59. Cannon P, Aguirre-Hudson B, Aime M, Ainsworth A, Bidartondo M, Gaya E, Hawksworth D, Kirk P, Leitch I, Lücking R. Definition and diversity. In: K. J. Willis (ed.), *State of the World's Fungi. Report*. Royal Botanic Gardens, Kew. 2018. p. 4–11.
60. Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. Biodiversidad de hongos en México. *Rev. Mex. Biodiv.* 2014; 85(Supl. ene):S76-S81. DOI: <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.33649>
61. Gurjar G, Kanade M. Analysis of phytopathogenic fungi isolated from some important crop plants using morpho-molecular tools-Foldscope and ITS region sequencing. *Mycol Progress.* 2020; 19:1475–1493. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01640-1>
62. García Romero IA. Genómica de hongos fitopatógenos como herramienta para el desarrollo de estrategias de manejo. *Rev. colomb. biotecnol.* 2019; 21(2):3-5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.84132>
63. Yang J, Guo W, Wang J, Yang X, Zhang Z, Zhao Z. T-2 Toxin-Induced Oxidative Stress Leads to Imbalance of Mitochondrial Fission and Fusion to Activate Cellular Apoptosis in the Human Liver 7702 Cell Line. *Toxins.* 2020; 12(1):43. doi:10.3390/toxins12010043
64. Jajić I, Dudaš T, Krstović S, Krska R, Sulyok M, Bagi F, Savić Z, Guljaš D, Stankov A. Emerging Fusarium Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, and Moniliformin in Serbian Maize. *Toxins.* 2019; 11(6):357. doi:10.3390/toxins11060357
65. Peng Y, Li SJ, Yan J, Tang Y, Cheng JP, Gao AJ, Yao X, Ruan JJ, Xu BL. Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *Front. Microbiol.* 2021; 12:670135. doi: 10.3389/fmicb.2021.670135
66. Jaroszuk-Scise J, Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Majewska M, Hanaka A, Tyśkiewicz K, Pawlik A, Janusz, G. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC

deaminase in vitro synthesized by the Mycoparasitic Trichoderma DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(19):4923.
doi:10.3390/ijms20194923

67. Zepeda-Jazo I. Manejo sustentable de plagas agrícolas en México. *Agric. soc. desarro.* 2018; 15(1):99-108.
68. Hainzelin E, Daviron B. The effects of agriculture's environmental externalities on food systems. In: Food systems at risk. New trends and challenges. Dury Sandrine (ed.), Bendjebbar Pauline (ed.), Hainzelin Etienne (ed.), Giordano Thierry (ed.), Bricas Nicolas (ed.). Rome: CIRAD-FAO. 2019. p. 63-66.
69. Fenibo EON, Ijoma G, Matambo T. Biopesticides in Sustainable Agriculture: Current Status and Future Prospects. *Preprints.* 2020. 2020110588.
70. Oguh CE, Okpaka CO, Ubani CS, Okekeaji U, Joseph PS, Amadi E. Natural Pesticides (Biopesticides) and Uses in Pest Management- A Critical Review. *Asian J Biotechnol Genet Eng.* 2019; 2(3):1-18.
71. Shin TS, Yu NH, Lee J, Choi GJ, Kim JC, Shin CS. Development of a biofungicide using a mycoparasitic fungus *Simplicillium lamellicola* BCP and its control efficacy against gray mold diseases of tomato and ginseng. *Plant Pathol J.* 2017; 33(3):337-344. doi:10.5423/PPJ.FT.04.2017.0087
72. Santos CA dos, Amaral Sobrinho NMB do, Costa ESP, Diniz CS do, Carmo MGF. Liming and biofungicide for the control of clubroot in cauliflower. *Pesqui. Agropecu. Trop.* 2017; 47(3):303-311.

73. Khakimov A, Omonlikov AU, Bobomurod S, Utaganov U. Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases. *GSC Biol. Pharm. Sci.* 2020;13(03):119-126. DOI: 10.30574/gscbps.2020.13.3.0403
74. Pacheco Hernández M de L, Reséndiz Martínez JF, Arriola Padilla VJ. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Rev. Mex. Cien. For.* 2019; 10(56):4-32.
<https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>
75. Cruz-Avalos AM, Bivián-Hernández MLÁ, Ibarra JE, Del Rincón-Castro MC. High Virulence of Mexican Entomopathogenic Fungi Against Fall Armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* 2019; 112(1):99-107. doi: 10.1093/jee/toy343.
76. Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Pérez-Torres A, Córdoba-Aguilar A, Salazar-Schettino PM, Hernández-Velázquez VM, Toriello C. Effects on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) Eggs Exposed to Entomopathogenic Fungi: Exploring Alternatives to Control Chagas Disease. *J Med Entomol.* 2019;56(1):284-290. doi:10.1093/jme/tjy186
77. García-Ramírez A, Reyes-Ramírez A, Ruíz-Sánchez EE, Ibarra J. Aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 2018; 9(3):539-551.
78. Ruiz-Vega, J.; Cortés-Martínez, C.I.; García-Gutiérrez, C. Survival and Infectivity of Entomopathogenic Nematodes Formulated in Sodium Alginate Beads. *J Nematol.* 2018; 50(3):273-280. doi:10.21307/jofnem-2018-037.
79. Zamora-Avella D, Ramos-López MA, González-Chávez MM, Moustapha-Bah M, Campos-Guillen J, Pérez-Moreno V. Actividad insecticida y juvenomimética de *Salvia*

- connivens* (Epling, 1939) sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). *Entomología mexicana*. 2018; 85:100–105.
80. Ibarra-Cortés KH, Guzmán-Franco AW, González-Hernández H, Ortega-Arenas LD, Villanueva-Jiménez JA, Robles-Bermúdez A. Susceptibility of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and Its Parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) to Entomopathogenic Fungi under Laboratory Conditions. *Neotrop Entomol*. 2018; 47(1):131-138. doi:10.1007/s13744-017-0539-6
81. Oliva-Ortiz LC, Velázquez-Alcaraz T de J, Sosa-Pérez R, Partida-Ruvalcaba L, Díaz-Valdés T, Arciniega-Ramos J, López-Orona CA. Control de la fusariosis vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por microorganismos nativos de Sinaloa, México. Controlling fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with native microorganisms of Sinaloa, México. *Agrociencia*. 2017; 51:683-695.
82. Prado-Rebolledo OF, Molina-Ochoa J, Lezama-Gutiérrez R, García-Márquez LJ, Minchaca-Llerenas YB, Morales-Barrera E, Tellez G, Hargis B, Skoda SR, Foster JE. Effect of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycete), Cypermethrin, and D-Limonene, Alone and Combined, on Larval Mortality of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 2017; 54(5):1323-1327. doi:10.1093/jme/tjx092
83. Ruiz-Jiménez AL, González-Coloma A, Andrés-Yeves MF, Ruiz-Sánchez E, Heredia G, Peraza-Sánchez SR, Medina-Baizabal IL, Reyes-Estebanez M, Canto-Canché B, Gamboa-Angulo M. Insect deterrent and nematicidal screening of microfungi from Mexico and anti-aphid compounds from *Gliomastix masseei*. *Rev. argent. microbiol*. 2017; 49(1), 83–92. doi:10.1016/j.ram.2016.08.009
84. Torres DE, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Guevara-Fefer P, Márquez-Guzmán GJ, Pérez-Martínez C. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn.,

- the causal agent of Chrysanthemum white rust. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0170782. doi:10.1371/journal.pone.0170782
85. Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Alonso-Morales RA, Lezama-Gutiérrez R, Rodríguez-Rodríguez JC, Cervantes-Chávez JA. Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Med Vet Entomol*. 2017; 31(1):36-43. doi:10.1111/mve.12203
86. Moreno-Pérez P, Gamboa-Angulo M Heredia G, Canto-Canché B, Rodríguez-García CM, Medina-Baizabal IL, Peraza Echeverría L. Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de micromicetos tropicales contra fitopatógenos. *φYTON*. 2016; 85: 7-14
87. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm. infecc. microbiol. clín*. 2012; 30(1):33-39. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.006
88. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawksworth DL, Hyde KD, Irinyi L, Jeewon R, Johnston PR, Kirk PM, Malosso E, May TW, Meyer W, Öpik M, Robert V, Stadler M, Thines M, Vu D, Yurkov AM, Zhang N, Schoch CL. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus*. 2020; 11:14. doi: 10.1186/s43008-020-00033-z
89. Alsohaili S, Bani-Hasan BM. Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in Northern Eastern Jordan Deseret. *Jordan J Biol Sci*. 2018; 11:329-337.
90. Senanayake IC, Rathnayaka AR, Marasinghe DS, Calabon MS, Gentekaki E, Lee HB, Hurdeal VG, Pem D, Dissanayake LS, Wijesinghe SN, Bundhun D, Nguyen TT, Goonasekara ID, Abeywickrama PD, Bhunjun CS, Jayawardena RS, Wanasinghe DN, Jeewon R, Bhat DJ, Xiang MM. Morphological approaches in studying fungi:

collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere*. 2020; 11(1):2678–2754. Doi 10.5943/mycosphere/11/1/20

91. Crous PW, Hawksworth DL, Wingfield MJ. Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. *Annu Rev Phytopathol*. 2015; 53(1):247–267. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120245
92. Zieliński B, Sroka-Oleksiak A, Rymarczyk D, Piekarczyk A, Brzychez-Włoch M. Deep learning approach to describe and classify fungi microscopic images. *PLoS One*. 2020; 15(6):e0234806. doi:10.1371/journal.pone.0234806
93. Mellado OM. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*. 2020; 3(30):88-111.
94. Hariharan G, Prasannath, K. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 10:600234. doi:10.3389/fcimb.2020.600234
95. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod*. 2017; 80(3):756-770. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085
96. Consortium OPATHY, Gabaldón T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev*. 2019; 43(5):517-547. doi:10.1093/femsre/fuz015
97. Bell D, Wells H, Markam C. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. *Phytopathology*. 1982; 72:379-382.

98. Calvo-Araya JA, Rivera-Coto G Orozco-Cayasso S, Orozco-Rodríguez R. Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agromeso*. 2012; 23(2):225-231.
99. Rodríguez-García D, Wang-Wong A. Efectividad a nivel *in vitro* de *Trichoderma* spp. nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agron. costarric*. 2020; 44(2). <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>.
100. Koohpeima. F.; Mokhtari, M.J.; Doozandeh, M.; Jowkar, Z.; Yazdanshenas, F. Comparison of Cytotoxicity of New Nanohybrid Composite, Giomer, Glass Ionomer and Silver Reinforced Glass Ionomer using Human Gingival Fibroblast Cell Line. *J Clin Pediatr Dent*. 2017; 41(5):368-373. doi: 10.17796/1053-4628-41.5.368.
101. Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Cortés-Eslava J, Martínez-Valenzuela C, Mojica-Vázquez LH, Sosa-López M, Flores-Ramírez D, Romero-Velázquez ZE. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of Furia®180 SC (zeta-cypermethrin) and Bulldock 125®SC (β -cyfluthrin) pyrethroid insecticides in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Mech Methods*. 2018; 28(4):268-278. doi:10.1080/15376516.2017.1402977.
102. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Kwasniewicz E, Deregowska A, Wnuk M. Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. *Apoptosis*. 2017; 22(6):800-815. doi: 10.1007/s10495-017-1353-7.
103. Michel-Aceves A, Hernández-Morales J, Toledo-Aguilar R, López J, Romero-Rosales T. Antagonic capacity of native trichoderma spp. against phytophthora parasitica and fusarium oxysporum isolated from roselle crops. *Rev. Fitotec. Mex*. 2019; 42:235-241. doi: 10.35196/rfm.2019.3.235-241.
104. Nisa S, Khan N, Shah W, Sabir M, Khan W, Bibi Y, Jahangir M, Ul Haq I, Alam S, Qayyum A. Identification and Bioactivities of Two Endophytic Fungi *Fusarium*


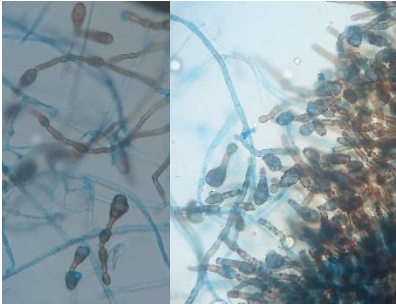

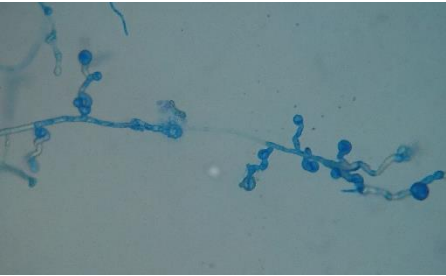


- fujikuroi* and *Aspergillus tubingensis* from Foliar Parts of *Debregeasia salicifolia*. *Arab J Sci Eng*. 2020; 45:4477–4487. <https://doi.org/10.1007/s13369-020-04454-1>
105. Morales-Ubaldo A, Hernández-Alvarado J, Valladares-Carranza B, Velázquez-Ordoñez V, Delgadillo-Ruiz L, Rosenfeld-Miranda C, Rivero-Pérez N, Zaragoza-Bastida A. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitaria. *Abanico Vet*. 2020; 10, e1. Doi: <https://doi.org/10.21929/abavet2020.2>.
106. Díaz Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla Rizza M. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chil J Agric Res*. 2011; 71(2):231-239. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392011000200008>
107. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016; 6(2):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
108. Jinfeng EC, Mohamad Rafi MI, Chai Hoon K, Kok Lian H, Yoke Kqueen C. Analysis of chemical constituents, antimicrobial and anticancer activities of dichloromethane extracts of *Sordariomyces* sp. endophytic fungi isolated from *Strobilanthes crispus*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(1):5. doi:10.1007/s11274-016-2175-4
109. García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR, Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ, González-Esquivel CE. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. *Rev. mex. fitopatol*. 2017; 35:58-79. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1605-4
110. Barnett H, Hunter B. Illustrated genera of imperfect fungi. EE. UU. Burgess Publ. Co. 1972. pp 241. <http://dx.doi:10.2307/3757954>


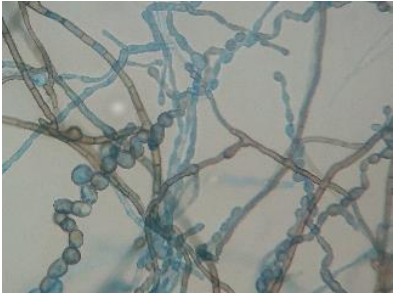

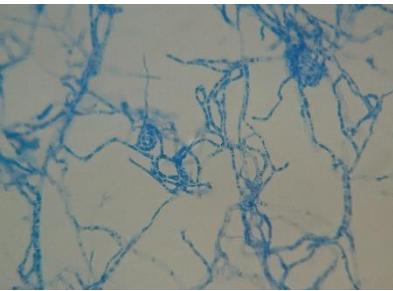
111. Watanabe T. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Second Edition. 2002. 10.1201/9781420040821.
112. AMM, Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2017. [Internet] [Consultado 7 Mar 2021]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
113. DOF, Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades. Ciudad de México. 27/02/1995. [Internet] [Consultado 10 Feb 2021]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4869946&fecha=27/02/1995
114. DOF, Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Ciudad de México. 17/02/2003. [Internet] [Consultado 11 Feb 2021]. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=704675&fecha=17/02/2003
115. Carvalho FP. Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.* 2017; 6(2):48–60.
116. Özkara A, Akyil D, Konuk M. Pesticides, Environmental Pollution, and Health. Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species. Marcelo L. Larramendy and Sonia Soloneski. *IntechOpen*. 2016. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/environmental-health-risk-hazardous-factors-to-living-species/pesticides-environmental-pollution-and-health>

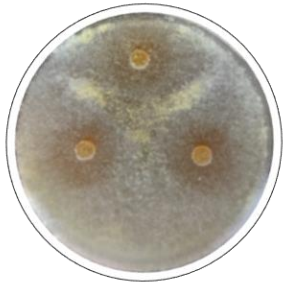
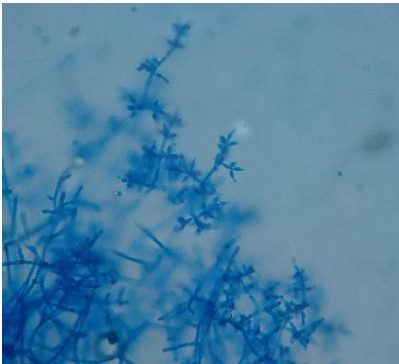
117. FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. Codex looks to harmonise regulation of biopesticides. [06/04/2019]. [Internet] [Consultado 28 May 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/news-and-events/news-details/es/c/1189277/>
118. Bautista EJ, Mesa L, Gómez Álvarez MI. Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria*. 2018; 9(4), 585-604.
<https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>

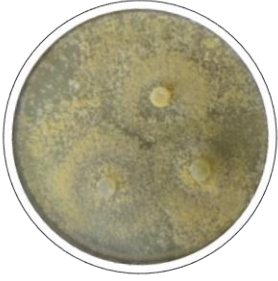
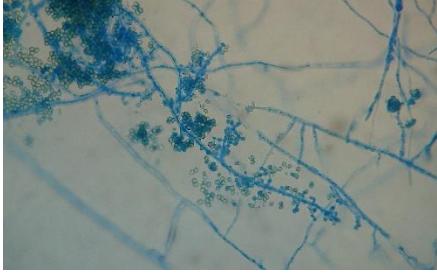

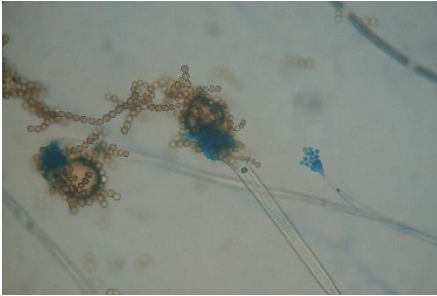
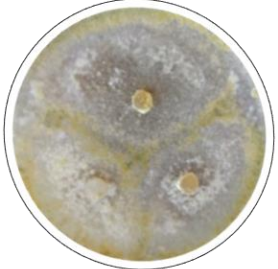

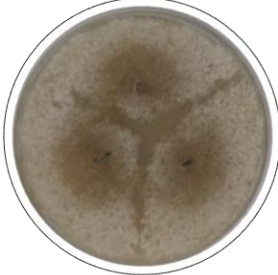
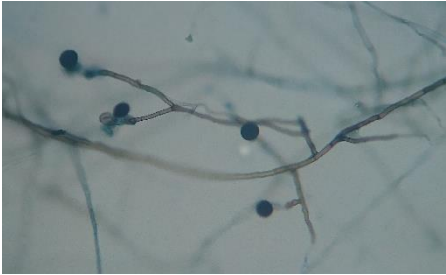
11. Anexos




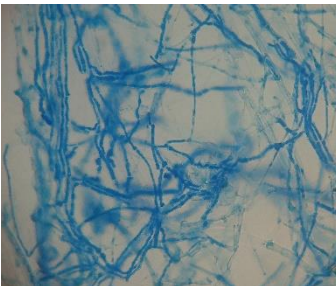
11.1 Identificación de cepas colectadas

Cepa fitopatógena	Genero	Descripción
<p data-bbox="354 457 435 485">M1C3</p> 	<p data-bbox="716 457 894 485"><i>Alternaria sp.</i></p> 	<p data-bbox="1062 457 1370 995">Conidióforos de color marrón claro, simples o ramificados, con conidios catenulados en el ápice y partes fértiles apicales. Los conidios catenulados, en su mayoría hasta 9 en una cadena, a menudo ramificados. Conidios porosporos, acropetalmente desarrollados, café (oscuro), cilíndricos o fusiformes, a menudo con picos cilíndricos, muriformes compuestos de 3-4 (-8) paredes transversales y 1-2 paredes longitudinales.</p>
<p data-bbox="354 1035 435 1062">M2C1</p> 	<p data-bbox="688 1035 927 1062"><i>Chrysosporium sp.</i></p> 	<p data-bbox="1062 1035 1370 1486">Conidióforos que carecen o son muy cortos, simples o ramificados, hialinos, con conidios en las partes apicales o raramente directamente en las hifas. Conidios aleuriosporos, solitarios (raramente, 2-3 conidios en una cadena), globosos, elipsoidales, unicelulares, cilíndricos, apiculados o truncados en un extremo, de color amarillo pálido, fácilmente desprendibles.</p>
<p data-bbox="354 1524 435 1551">M2C6</p> 	<p data-bbox="711 1524 899 1551"><i>Pithomyces sp.</i></p> 	<p data-bbox="1062 1524 1370 1879">Conidióforos hialinos, simples, cortos, con conidios únicos apicalmente. Conidios aleuriosporos, pardos, ovados o elipsoidales, muriformes, generalmente compuestos de 3 tabiques transversales y 1-2 tabiques longitudinales, lisos marginalmente, constreñidos en o cerca de los tabiques transversales.</p>

<p>M3C7</p> 	<p><i>Monilia sp.</i></p> 	<p>Conidióforos ausentes o indistintos, no bien diferenciados de las hifas. Hifas hialinas, no aéreas, rastreras, con conidios catenulados que se desarrollan por gemación directamente de las hifas: cadenas conidiales simples o ramificadas. Conidios hialinos, blastosporosos, unicelulares, elipsoidales.</p>
<p>M3C8</p> 	<p><i>Helicomyces sp.</i></p> 	<p>Conidióforos no diferenciados de las hifas ordinarias (micronematosas), cortos, simples, hialinos a subhialinos, con conidios individuales lateralmente en las hifas. Conidios simpodulosporosos, hialinos a subhialinos, de masa blanca, enrollados en un plano en su mayoría 3 veces, filamentos conidiales alargados cuando están húmedos (higroscópicos), numerosos septados.</p>

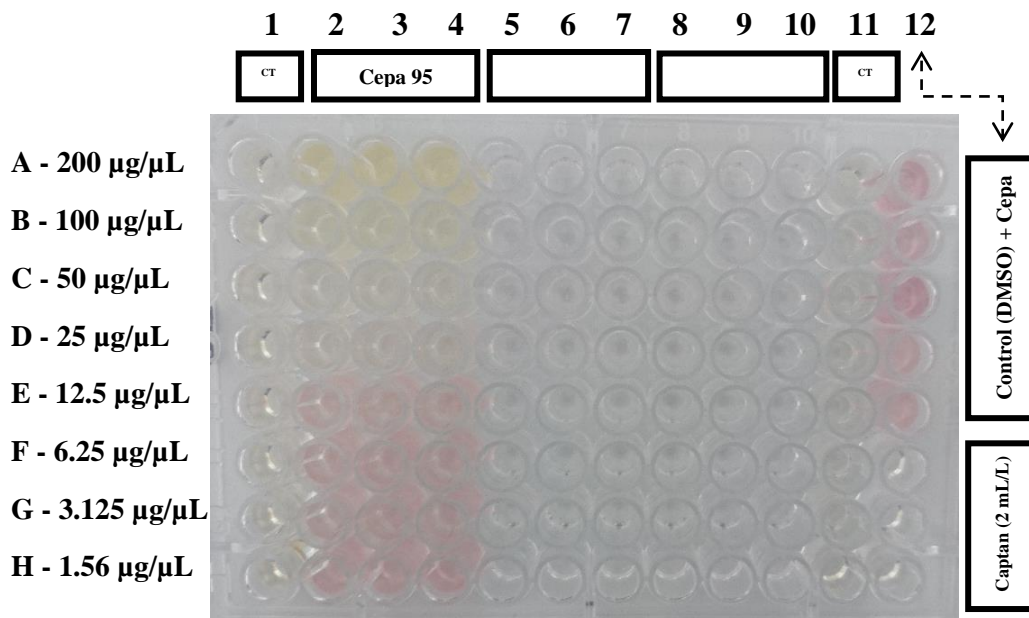
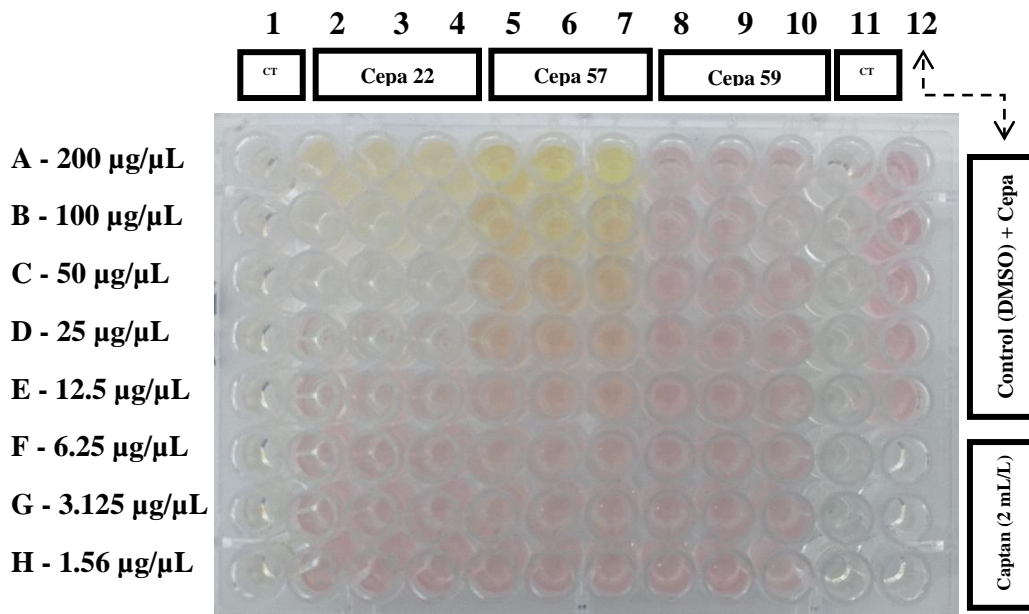
Cepa saprobia	Genero	Descripción
<p>22</p> 	<p><i>Trichoderma sp. (koningi Oud)</i></p> 	<p>Conidióforos hialinos, erectos, ramificados, con masas de esporas apicalmente en las fialidas: fialidas que se estrechan hacia el ápice. Conidios fialosporosos, hialinos, ovados o elipsoidales, unicelulares. Clamidosporas de color marrón pálido, subglobosas.</p>
<p>57</p>	<p><i>Trichoderma sp. (harzianum Rifai)</i></p>	<p>Conidióforos hialinos, erectos, ramificados, con masas de esporas apicalmente en fialides verticilados: fialides cortos y gruesos. Conidios fialosporosos, hialinos, globosos, subglobosos u</p>

		<p>ovados, unicelulares. Clamidosporas marrones, subglobosas.</p>
<p>59</p> 	<p><i>Aspergillus sp.</i></p> 	<p>Conidióforos de color marrón pálido, erectos, simples, lisos en la superficie, con masas de esporas esféricas de color marrón grisáceo compuestas de conidios catenulados sobre fialidos uniseriados desarrollados sobre vesículas globosas de color marrón pálido. Conidios fialosporosos, pardo amarillento, globosos o elipsoidales, rugosos en la superficie.</p>
<p>95</p> 	<p><i>Trichoderma sp. (pseudokoningi Rifai)</i></p> 	<p>Conidióforos hialinos, erectos, ramificados, con masas de esporas apicalmente en fialides dispuestos irregularmente: fialides cortos y gruesos. Conidios fialosporosos, verde pálido, elipsoidales u ovados, unicelulares, apiculados en un extremo. Clamidosporas marrones, subglobosas.</p>
<p>103</p> 	<p><i>Nigrospora sp. sacchari (Speg.)</i></p> 	<p>Conidióforos simples, hialinos, globosos, con conidios únicos apicalmente. Conidios aleuriosporosos, negros, subglobosos o en forma de disco, ocasionalmente apiculados en la parte superior.</p>

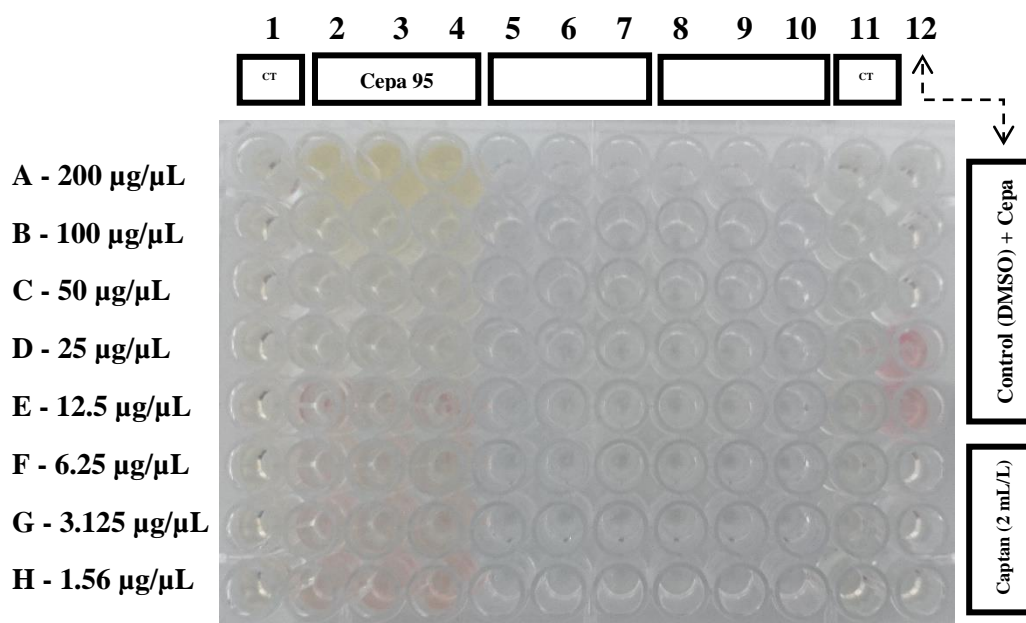
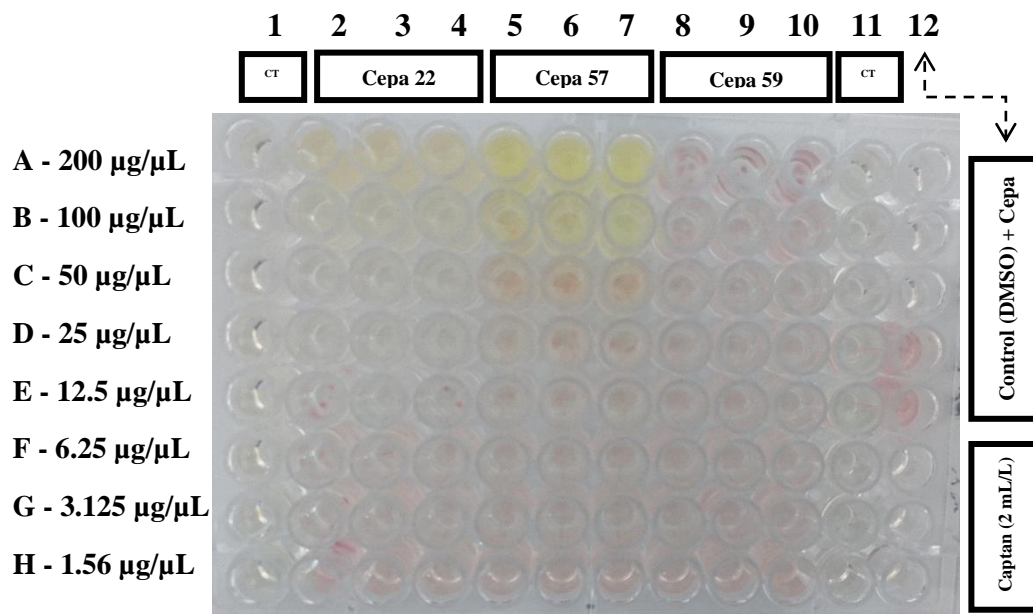
<p>116</p> 	<p><i>Nigrospora sp. (Zimmerm)</i></p> 	<p>Conidióforos simples, hialinos, globosos, con conidios únicos apicalmente. Conidios aleuriosporosos, negros, subglobosos o en forma de disco, ocasionalmente apiculados en la parte superior.</p>
<p>130</p> 	<p>No Identificado</p> 	

11.2 Prueba en microplacas de extractos de cepas saprobias frente a fitopatógenos colectados.

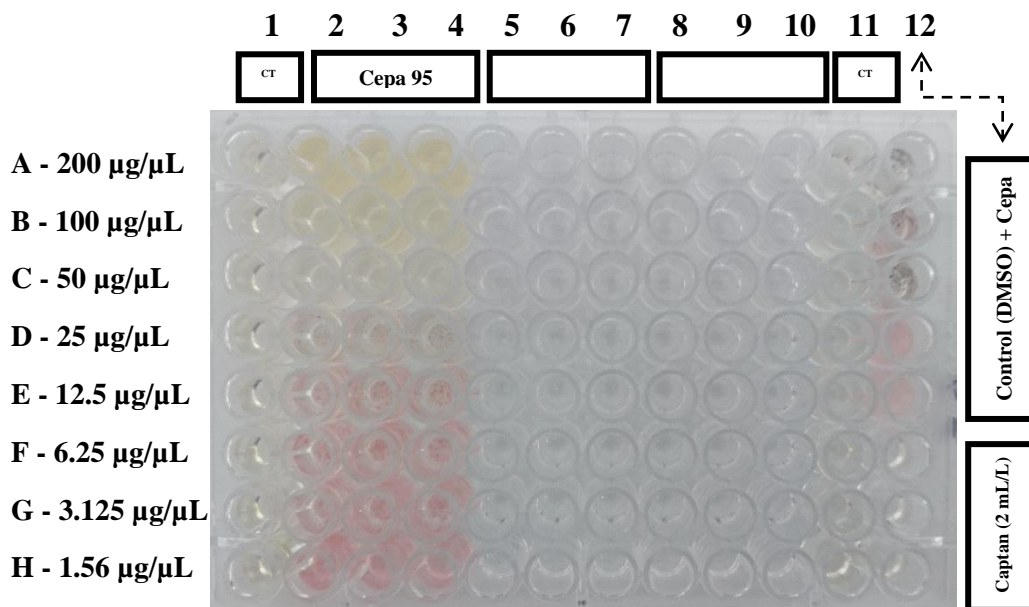
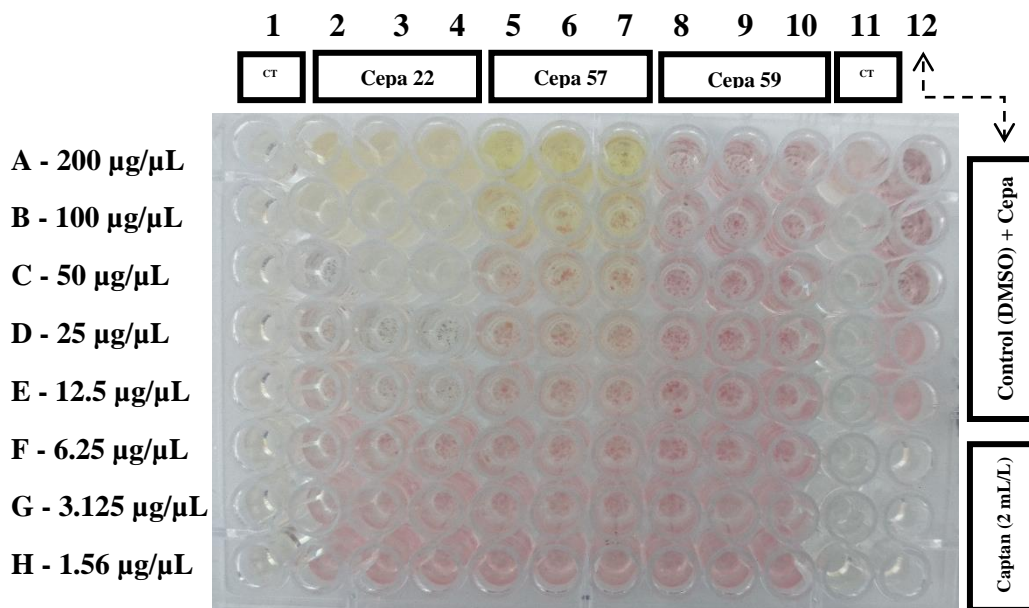
Prueba 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en microplaca de fitopatógeno M3C8 (*Helicomyces sp.*)



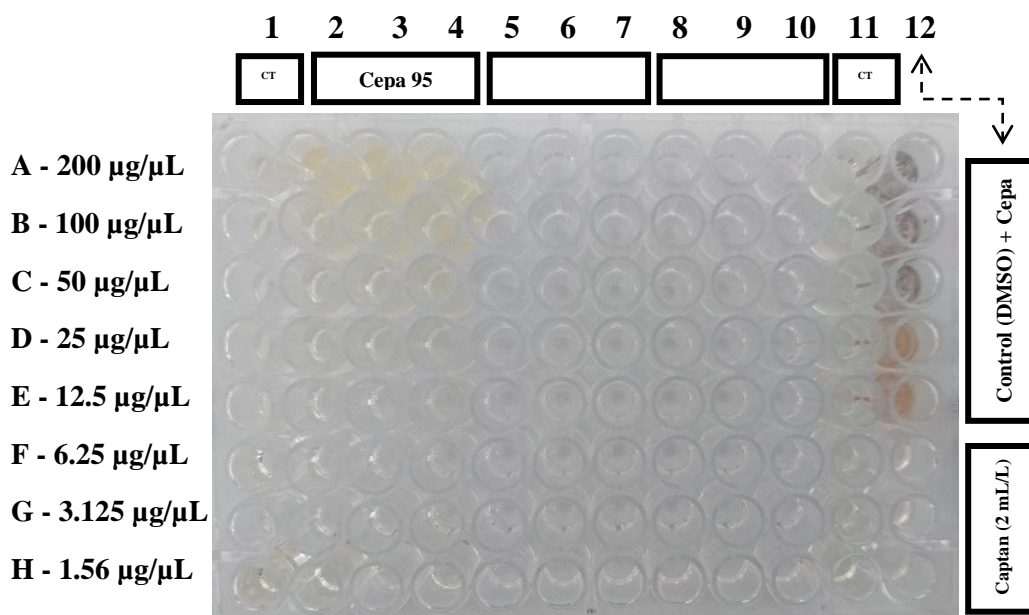
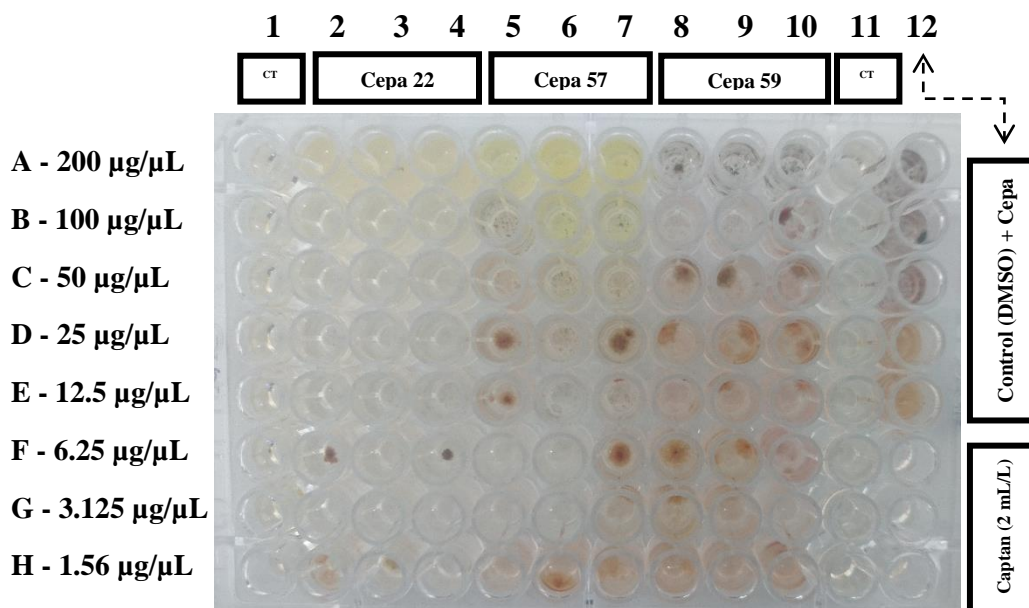
Prueba 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en microplaca de fitopatógeno M2C1 (*Monilia sp.*)



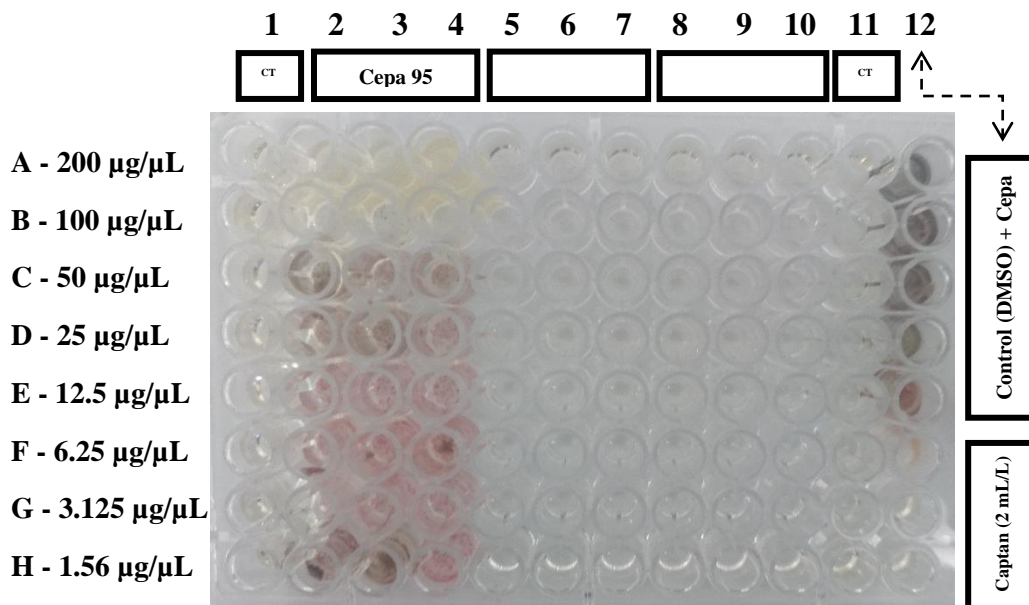
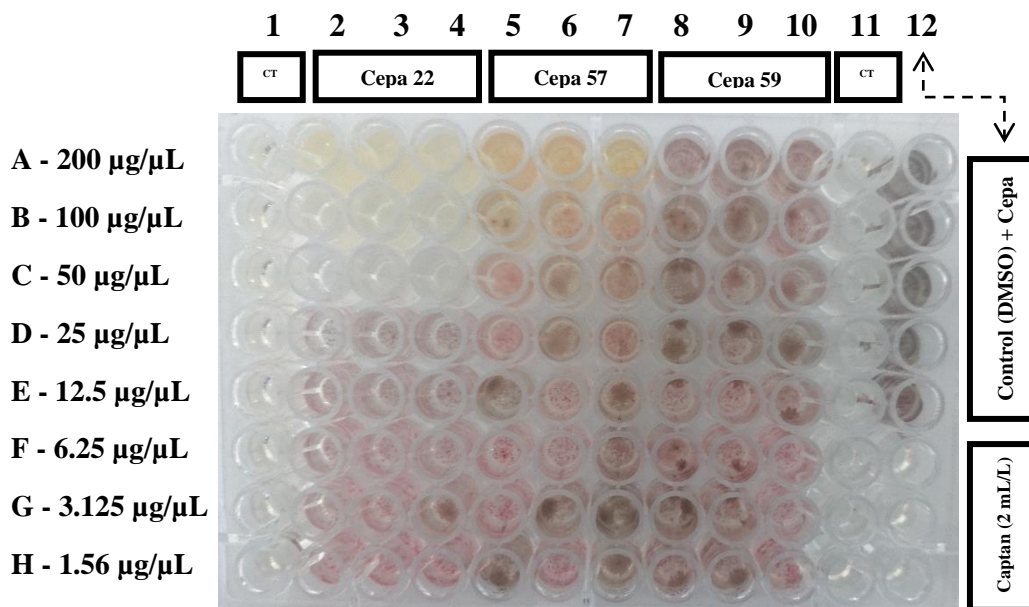
Prueba 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en microplaca de fitopatógeno M2C6 (*Phytophthora sp.*)



Prueba 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en microplaca de fitopatógeno M3C7 (*Chysosporium sp.*)



Prueba 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio en microplaca de fitopatógeno M1C3 (*Alternaria sp.*)



NOTAS