



UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

PROTECCION VEGETAL

**DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE HONGOS
MICOTOXIGÉNICOS EN GRANOS ALMACENADOS DE
MAÍZ**

**TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

MARCO MAIDANA OJEDA

Chapingo, Texcoco, Edo. De México, noviembre, 2015.

La presente Tesis, titulada: **DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN GRANOS ALMACENADOS DE MAÍZ** realizada y presentada por el alumno: Marco Maidana Ojeda bajo la dirección del comité asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



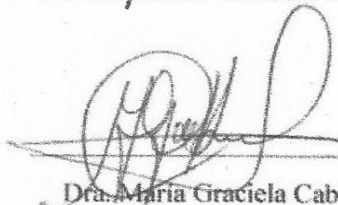
Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR:



Dr. Geronimo Arámbula Villa

ASESORA:



Dra. Maria Graciela Cabrera

Chapingo, Edo. De México, Noviembre 2015.

AGRADECIMIENTOS

- ✓ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que a través del financiamiento de mis estudios de Posgrado me dio la oportunidad de superación profesional, científica y espiritual.
- ✓ Al pueblo mexicano, por el acogimiento y enseñanza de convivencia en la diversidad cultural.
- ✓ A la Universidad Autónoma Chapingo, Programa Maestría en Protección Vegetal, por permitirme ser parte de ella.
- ✓ A los Doctores Marcelo Acosta Ramos, Gerónimo Arámbula Villa y María Graciela Cabrera, por sus orientaciones, apoyo y valiosa aportación intelectual en el desarrollo de esta investigación.
- ✓ Al Instituto de Biotecnología Agrícola (INBIO), por ser la institución que financió mi venida a México y retorno a Paraguay.
- ✓ A mis amigos de la generación 54 y de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal por brindarme su amistad, su apoyo y su compañerismo durante este tiempo con ellos.

DEDICATORIAS

- ✓ A mi madre, quien es mi inspiración en fortaleza y perseverancia.
- ✓ A mi hermana Ana, por su complicidad para lograr cada uno de mis sueños.
- ✓ A mis hermanos/as Perla, María, Andrés y Francisco, por cada momento de felicidad, y por los que aún faltan.
- ✓ A mis amigos, por aventurarse conmigo en cada iniciativa por una sociedad más humanitaria.
- ✓ A la Ing. Agr. MsC. Lidia Quintana de Viedma, por ser una guía constante en mis andanzas por el camino de la ciencia.

DIAGNÓSTICO Y MANEJO DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN GRANOS
ALMACENADOS DE MAÍZ
DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF MYCOTOXIGENIC FUNGI IN STORED
CORN GRAIN

Marco Maidana Ojeda, Marcelo Acosta Ramos, Gerónimo Arámbula Villa, María Graciela Cabrera

RESUMEN

Las micotoxinas constituyen un problema que comienza en el campo y continúa durante el acopio y la comercialización, y cuya única solución es prevenir el crecimiento fúngico. Durante los años 2014/2015 se realizó una investigación con el objetivo de analizar la interacción de las condiciones de almacenamiento con la incidencia de hongos micotoxigénicos y la concentración de aflatoxinas, y evaluar estrategias para su manejo en granos almacenados de maíz. Se realizaron estudios de identificación y cuantificación de hongos y aflatoxinas en granos almacenados de maíz y su relación con las condiciones de almacenamiento, pruebas *In Vitro* de inhibidores fúngicos, y la evaluación de inhibidores aplicados en grano con diferentes niveles de humedad. Se encontraron con una alta incidencia a las especies de *Fusarium* y *Aspergillus*, pero bajos niveles de aflatoxinas. En la prueba *In Vitro* la mezcla de Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25% en 1000 ppm inhibió el 100% de *Fusarium* y *Aspergillus*. En la evaluación en grano la residualidad de los inhibidores no fue mayor a 10 días después de su aplicación, ya que hubo una alta influencia del % de humedad en los granos.

Palabras clave: Aflatoxinas, *Aspergillus*, inhibidores fúngicos

ABSTRACT

Mycotoxins are a problem that begins in the field and continues during gathering and marketing, and whose only solution is to prevent fungal growth. During the years 2014/2015, a study was conducted in order to analyze the interaction of storage conditions with the incidence of mycotoxigenic fungi and the concentration of aflatoxins, and to evaluate strategies for the management of stored corn grains. Studies involving identification and quantification of fungi and aflatoxins in stored corn grains and their relationship with storage conditions, *In Vitro* testing of fungal inhibitors and evaluation of inhibitors applied in grain with different moisture levels were conducted. We found a high incidence of *Fusarium* and *Aspergillus* species, but low levels of aflatoxins. In the *in vitro* test the mixture of 1% Ascorbic acid with 0.25% Citric acid and 0.25% Lactic acid at 1000 ppm inhibited *Fusarium* and *Aspergillus* by 100%. In the grain evaluation, the inhibitors persisted for no more than 10 days after application, and the moisture content % had a high influence on the grains.

Keywords: Aflatoxins, *Aspergillus*, fungal inhibitors

¹Tesista

²Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 36.5. Chapingo, Texcoco, Estado de México, MÉXICO.

³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-Instituto Politécnico Nacional. Libramiento Norponiente 2000, Fraccionamiento Real de Juriquilla, 76230 Santiago de Querétaro, Qro. MÉXICO.

⁴Universidad Nacional del Nordeste. 25 de Mayo 868, Corrientes, ARGENTINA.

INDICE

Contenidos	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	
2.2 General	3
2.3 Específicos	3
3. HIPÓTESIS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	
4.1 El maíz. Importancia, producción mundial y nacional	5
4.2 Almacenamiento de granos	7
4.3 Hongos en granos almacenados de maíz	8
4.4 Micotoxinas y hongos micotoxigénicos	10
4.4.1 <i>Fusarium</i>	13
4.4.2 <i>Aspergillus</i>	15
4.5 Estrategias de manejo de micotoxinas	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Lugar y periodo de ejecución del estudio	20
5.2 Identificación y cuantificación de hongos y aflatoxinas en granos almacenados de maíz y su relación con las condiciones de almacenamiento	
5.2.1 Toma de muestra	20
5.2.2 Aislamiento, purificación y cuantificación	21
5.2.3 Identificación morfológica	22
5.2.4 Identificación molecular	22
5.2.5 Cuantificación de aflatoxinas	23
5.2.6 Procesamiento de datos	23
5.3 Prueba <i>In vitro</i> de inhibidores	
5.3.1 Unidad, diseño, material y tratamiento experimental	24
5.3.2 Variables evaluadas y metodología utilizada	24
5.3.3 Procesamiento de datos	25
5.4 Evaluación de inhibidores aplicados en granos con diferentes niveles de humedad	
5.4.1 Unidad, diseño, material y tratamiento experimental	25
5.4.2 Variables evaluadas y metodología utilizada	26
5.4.3 Procesamiento de datos	27

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Cuantificación de hongos y aflatoxinas en granos almacenados de maíz	
6.1.1 Características generales de la muestra	28
6.1.2 Incidencia de hongos	29
6.1.3 Niveles de aflatoxinas	31
6.2 Prueba <i>In Vitro</i> de inhibidores	
6.2.1 <i>Aspergillus flavus</i>	32
6.2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
6.2.3 <i>Fusarium verticillioides</i>	35
6.3 Evaluación de inhibidores aplicados en grano con diferentes niveles de humedad	
6.3.1 Incidencia de hongos en cámara húmeda	38
6.3.2 Incidencia en granos almacenados	40
6.3.3 Niveles de aflatoxinas	43
7. CONCLUSIONES	45
8. LITERATURA CITADA	46

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Contenidos	Página
Cuadro 1. Superficies sembradas, cosechadas y siniestradas, producción y rendimiento de maíz en los principales estados productores de México.	6
Cuadro 2. Temperatura óptima en el grano para la producción de micotoxinas	13
Cuadro 3. Requerimiento de humedad en el grano para el crecimiento de especies de <i>Aspergillus</i> .	16
Cuadro 4. Número de muestras evaluadas por estado	20
Cuadro 5. Características de las muestras de granos de maíz provenientes de distintos estados de México	29
Cuadro 6. Crecimiento radial del micelio en centímetros de <i>A. flavus</i> a los 6 días después de la inoculación con diferentes concentraciones de inhibidores. Texcoco, 2015.	32
Cuadro 7. Porcentaje de crecimiento micelial relativo al testigo de <i>A. flavus</i> con diferentes concentraciones de inhibidores. Texcoco, 2015.	33
Cuadro 8. Crecimiento radial de micelio en centímetro de <i>A. fumigatus</i> con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Texcoco, 2015.	34
Cuadro 9. Porcentaje de crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de <i>A. fumigatus</i> con diferentes concentraciones de inhibidores. Texcoco, 2015.	35
Cuadro 10. Crecimiento radial de micelio en centímetros de <i>F. verticillioides</i> con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Texcoco, 2015.	36
Cuadro 11. Porcentaje de crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de <i>F. verticillioides</i> con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Texcoco, 2015.	37
Cuadro 12. Incidencia de hongos por inhibidor aplicado en granos. Texcoco, 2015.	38
Cuadro 13. Incidencia de hongos por humedad de almacenamiento en granos. Texcoco, 2015.	39
Cuadro 14. Incidencia de hongos por humedad de almacenamiento en granos. Texcoco, 2015.	41
Cuadro 15. Incidencia de hongos en granos almacenados de maíz a los 90 DDI. Texcoco, 2015.	42
Cuadro 16. Incidencia promedio de hongos (<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>F. verticillioides</i>) en granos almacenados de maíz con distintas humedad. Texcoco, 2015.	42
Cuadro 17. Incidencia promedio de hongos (<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>F. verticillioides</i>) en granos almacenados de maíz con distintos inhibidores aplicados en los granos. Texcoco, 2015.	43
Cuadro 18. Niveles de aflatoxinas a los 90 días en granos de maíz inoculados con <i>A. flavus</i> y <i>A. fumigatus</i> bajo distintas humedades relativas de almacenamiento. Texcoco, 2015.	44
Figura 1. Frecuencia de aislamiento de hongos (%) en granos de maíz almacenados bajo diferentes condiciones en México.	30
Figura 2. Niveles de aflatoxinas en muestras de granos almacenados de maíz provenientes de distintos estados de México.	31

1. INTRODUCCIÓN

El maíz, es uno de los principales cultivos en muchos países, compartiendo esta importancia con el trigo, arroz y avena en la producción mundial de cereales (Malavolta *et al.*, 1974; Suleiman *et al.*, 2013).

Para México, comprende el 72% del total de cereales consumidos en el país, durante el 2013 el consumo promedio diario fue de 274 gramos *per cápita* (SIAP, 2014a).

La superficie estimada de siembra de maíz para grano durante el año 2012 fue de 7,37 millones de hectáreas, con un volumen de producción de 22,07 millones de toneladas (SIAP, 2014b), insuficiente para la demanda local, y ubicó a México como el segundo importador mundial después de Japón (USDA, 2015).

Indistintamente del origen del producto (producción local o importación) el almacenamiento temporal de los granos de maíz en depósitos, silos bolsas, costales, etc. es un requerimiento de manejo para los productores, acopiadores e industriales (Bishop Lack *et al.*, 1983).

Los granos almacenados de maíz, dependiendo de las condiciones de almacenamiento y sanitarias del cultivo de donde provienen, pueden ser atacados por hongos patógenos (Crhistensen y López, 1962).

Los géneros de hongos más importantes que infectan a los granos en almacenamiento son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las semillas son un medio de diseminación de patógenos. Por otra parte algunos de éstos hongos pueden ocasionar efectos dañinos en el cultivo, así como en la salud de los consumidores por efecto de las micotoxinas que ellos generan (Binder ,2007; Cabañes, 2000; Pitt, 2000; Moreno Martínez y Benavides Ocampo, 1988).

La infestación, crecimiento y desarrollo de estos hongos en el grano pueden originar la síntesis de metabolitos fúngicos, primarios y secundarios (micotoxinas), las cuales poseen efectos inmunosupresor, carcinogénico, mutagénico y teratogénico, caracterizándose por una acción rápida de intoxicación y una acción lenta de cancerización (Cabañes, 2000).

Las micotoxinas en la mesa del consumidor constituyen un problema que comienza en el campo y continúa durante el acopio y la comercialización, y cuya única solución es prevenir el crecimiento fúngico (Tefera, 2012; Carrillo, 2003).

Debido al riesgo que acarrea la presencia de hongos sintetizadores de micotoxinas en los granos almacenados, se han planteado regulaciones como la norma oficial mexicana (NOM-188-SSA1-2002), que establece límites del contenido de aflatoxinas en los granos de cereales para el consumo humano y animal (Secretaría de Salud, 2002).

Las concentraciones de micotoxinas están en función de los hongos desarrollados en los granos almacenados y la competencia entre éstos, siendo determinante las condiciones de humedad, tiempo de almacenamiento, la actividad del agua, temperatura, pH, composición del sustrato y presencia de plagas (Sanchis *et al.*, 2007; Shapira y Paster, 2004). El estudio de las interacciones entre estos factores permitirá una mejor comprensión de la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de micotoxinas en los granos almacenados de maíz, y en consecuencia el diseño de estrategias de manejo que reduzcan los niveles de micotoxinas con la prevención del desarrollo de hongos en los almacenes de granos.

Esto se podrá lograr corroborando la presencia de hongos micotoxigénicos y micotoxinas en los granos almacenados provenientes de varios estados productores de maíz en México, y almacenarlos bajo distintas condiciones de humedad, sanidad, tiempo y tipo de almacenes; y a partir de las mismas, evaluar el manejo de los hongos en diferentes variables de almacenamiento mediante la regulación de la humedad en los granos y el uso de inhibidores.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Analizar la interacción de las condiciones de almacenamiento con la incidencia de hongos micotoxigénicos y la concentración de aflatoxinas, y evaluar estrategias para su manejo en granos de maíz almacenados.

2.2. Específicos

- ✓ Identificar y cuantificar los hongos micotoxigénicos que infectan a los granos almacenados de maíz y su relación con las condiciones de almacenamiento.
- ✓ Detectar los niveles de aflatoxinas en los granos almacenados de maíz y su relación con las condiciones de almacenamiento.
- ✓ Evaluar inhibidores de los hongos micotoxigénicos a distintos niveles de humedad y tiempos de almacenamiento y por tanto, la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz.

3. HIPÓTESIS

- 3.1. Los hongos con mayor frecuencia son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* limitados por las condiciones de almacenamiento de donde fueron extraídas las muestras.
- 3.2. Los niveles de aflatoxinas detectados varían de acuerdo a las condiciones de donde proviene las muestras y condiciones de almacenamiento.
- 3.3. El uso de inhibidores fúngicos puede disminuir el desarrollo de hongos micotoxigénicos en granos almacenados con humedad relativa elevada.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. El maíz. Importancia, producción mundial y nacional

Actualmente el maíz, junto con el trigo y el arroz constituyen a nivel mundial el 75% de los granos producidos. Proveen el 56% de los carbohidratos y 50% de las proteínas de la alimentación en el mundo, además de suministrar elementos nutritivos para los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación (Simopoulos, 2002; Morris y López-Pereira, 2000; FAO, 1993; Stoskopf, 1985).

Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total (Paliwal *et al.* 2001; Harlan, 1992).

La difusión del maíz desde América a otros continentes se inició con la Conquista y llegó a constituir uno de los alimentos más importantes de los países europeos y posteriormente africanos y asiáticos, mostrando su alta versatilidad y potencial (Ribairo, 2003).

La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo (Paliwal *et al.* 2001).

El maíz se cultiva en altitudes que van desde el nivel del mar Caspio y hasta los 3,800 (metros sobre el nivel del mar) msnm en la cordillera de los Andes, a temperaturas extremadamente frías (58° de latitud norte en Canadá y Rusia, y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile), o muy cálidas cerca del Ecuador, con climas que fluctúan desde los excesivamente húmedos a los semiáridos, en terrenos que abarcan desde llanuras a las laderas más empinadas, con variados tipos de suelo y usando una gran variedad de tecnología de producción (Morris y López-Pereira, 2000; Paliwal *et al.*, 2001).

Sus usos incluyen la producción de almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y, tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan hoy en día como forraje de calidad relativamente buenas para alimentar a los rumiantes de muchos

pequeños agricultores de los países en desarrollo. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos (FAO, 1993).

La producción mundial de maíz durante el año 2013/2014 fue de 988,25 millones de toneladas, donde el mayor productor es Estados Unidos con 351,27 millones de toneladas, seguido por Brasil, Argentina y Sudáfrica, con producciones de 80, 26 y 14,98 millones de toneladas de producción respectivamente (USDA, 2015).

El maíz es por mucho el cultivo más importante de México, tanto desde el punto de vista alimentario, industrial y político además del social (SIAP, 2013).

Durante el año agrícola 2012, incluyendo los ciclos agrícolas otoño/invierno y primavera/verano, se registró una producción de maíz en grano de una superficie sembrada de 7,372,218 hectáreas, habiéndose cosechado 6,923,899 hectáreas, (superficie siniestrada 448,318 hectáreas), con una producción de 22,069,254 toneladas y un rendimiento de 3,19 t.ha⁻¹ (SIAP, 2014b).

En el cuadro 1 se detallan las superficies de siembra y volúmenes de producción en los principales estados productores de maíz, registrados durante el año agrícola 2012.

Cuadro 1. Superficies sembradas, cosechadas y siniestradas, producción y rendimiento de maíz en los principales estados productores de México.

Estado	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Sup. Siniestrada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t.ha⁻¹)
Sinaloa	409,402	388,198	21,204	3,646,875	9.39
Jalisco	605,082	584,027	21,054	3,235,188	5.54
Michoacán	481,600	464,620	16,979	1,801,964	3.88
México	556,325	529,849	26,475	1,575,300	2.97
Chiapas	705,241	705,066	175	1,404,679	1.99
Guerrero	469,896	466,062	3,834	1,304,132	2.80
Veracruz	573,904	553,276	20,628	1,275,317	2.30
Guanajuato	381,571	331,393	50,178	1,217,706	3.68

Fuente: SIAP (2014b).

4.2. Almacenamiento de granos

Una vez que se ha realizado la recolección, el almacenamiento de las cosechas constituye la fase esencial hasta que los productos recolectados se empleen ya sea en el consumo directo o en la industria de procesamiento intermedio y contribuye una parte importante de la seguridad alimentaria (Mejía, 2003; Cruz y Diop, 1990).

Esto es debido a que existen limitaciones físicas en el consumo inmediato y la capacidad de aprovechamiento industrial de la producción total de las cosechas de granos. Por lo tanto, se tiene imperiosa necesidad de conservar y almacenarlos para garantizar la disponibilidad en la oportunidad y calidad requerida (Ramírez, 1974).

Durante el almacenamiento, los granos almacenados sufren pérdidas que no siempre son evidentes, y el deterioro de la calidad rara vez se aprecia en toda su gravedad. Las pérdidas pueden ser cuantitativas o cualitativas y pueden ocurrir separadamente las unas de las otras. Se traduce en pérdidas económicas con la rebaja del precio del producto debido a la reducción en calidad y cantidad (FAO, 2010; Hall, 1971).

Con un rango de 1-100% para maíz, la estimación mundial de pérdida para todos los granos en pos cosecha es de 5 -50%, con un promedio de 0.5-1% en Estados Unidos y África en 30% (Desai, 2004), estimándose en África una pérdida de entre 14 a 36% de granos de maíz en post cosecha (Villers, 2015; Tefera, 2012).

En México no existen cifras precisas que indiquen el volumen de pérdida de granos y semillas; sin embargo, se estima que anualmente se pierde entre el 5% y el 25% de la producción total de maíz, trigo y frijol, principales granos básicos del país (Ramírez, 1974), llegando hasta un 50% entre los pequeños productores (IICA, 2012).

Los principales factores que determinan y acentúan las pérdidas de los granos que se almacenan en la mayoría de las áreas de producción del mundo, son físicos (temperatura, contenido de humedad e impurezas del grano), biológicos (insectos, ácaro, roedores, y microorganismos como hongo y bacteria), ingeniería y mecánica (tipo y eficiencia de las herramientas, equipamientos y maquinarias de cosecha, secado y almacenaje, transporte, etc.), socioeconómico (carencia de almacenes adecuados y facilidades de almacenamiento,

tipo de establecimiento y almacén y sistema de comercialización), (Folayan, 2013; Ramírez, 1974).

El principal objetivo de condicionamiento y almacenamiento es proteger a los granos de los factores físicos, manteniéndolos secos, con temperatura estable y protegiendo de los ataques de insectos, roedores y pájaros exclusivamente (Bengtsson y Whitaker, 1988).

En los países en desarrollo, los pequeños productores usan diferentes estructuras de almacenamiento, que no garantizan la protección contra la mayor parte de las plagas de almacén, desconociendo el tipo, el costo y las pérdidas de los granos (Tabitha, 2013; Tefera *et al.* 2011).

La necesidad de tecnología que sea efectivo, accesible y segura llevó al desarrollo de los silos bolsas y metálicos. Los silos metálicos han sido bastante promovidos por ser una tecnología que reduce las pérdidas durante el almacenaje, sin embargo no fue sometido a un análisis económico antes de ser promovido, y en algunos casos fueron inaccesibles para los pequeños productores (Tabitha, 2013; Tefera *et al.*, 2011).

4.3. Hongos en granos almacenados de maíz

La contaminación de granos con mohos y hongos es reconocida como uno de los problemas más importantes en los países tropicales en todo el mundo (Kaaya y Kyamuhangire, 2006).

Los hongos que afectan a granos y semillas en almacenamiento pueden ser diferenciados en dos grupos: de campo y de almacén; en ambas circunstancias el origen es desde el cultivo (Suleiman *et al.*, 2013; Miller, 2008; Jouany, 2007; Carrillo, 2003; Arbeláez Torres, 1978; Christensen y Kaufmann, 1969).

En el primer grupo se encuentran aquellas especies que son adquiridos en el campo, con desarrollo limitado en almacenamiento, entre los cuales se destacan algunos parásitos como *Cladosporium*, *Diplodia maydis*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium*, o bien son simples como *Pullularia* (*Aureobasidium*), *Acremonium* (*Cephalosporium*) y *Epicoccum* (Krnjaja *et al.*, 2013; Carrillo, 2003; Moreno Martínez y Benavides Ocampo, 1988; Bustamante, 1984).

Para crecer requieren generalmente una humedad relativa entre el 90 y 100% y un contenido de agua en los granos de 22 a 23%, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30°C, aunque algunos se pueden desarrollar a 35°C o más (Carrillo y Gómez Molina, 2007; Christensen y Kaufmann, 1969).

Los daños causados por este grupo de hongos, pueden ser observados inclusive antes de la cosecha con una inspección de rutina (Christensen y Kaufmann, 1969).

Los hongos que atacan a los granos en el almacén, conocidos como hongos de almacén, e invaden de preferencia el embrión, y para localizar sus principales fases de infección es necesario el cultivo del grano en medios de cultivo especiales, con el fin de provocar su crecimiento (Ramayo Ramírez, 1977).

En el segundo grupo, los hongos de almacenamiento se caracterizan porque no atacan a la planta o lo hacen a niveles muy bajos (5%) antes de la cosecha y solo aparecen si se retarda la cosecha, o soportan periodos muy lluviosos, o después de un período de almacenamiento (Arbeláez Torres, 1978; Christensen y Kaufmann, 1969).

Invaden principalmente el embrión ocasionando la pérdida total o parcial de los granos atacados y algunos de ellos tienen la capacidad de producir toxinas (Arbeláez Torres, 1978).

Desde los estudios realizados por Christensen y López (1962), se ha observado que en México los principales géneros de hongos que atacan a los granos de almacén corresponden a los géneros *Fusarium* (Arrúa Alvarenga *et al.*, 2012; García y Martínez, 2010; Hernández *et al.*, 2007; Gallardo *et al.*, 2006; Bucio *et al.*, 2005), *Aspergillus* y *Penicillium* (Arrúa Alvarenga *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2007; Gallardo *et al.*, 2006; Bucio *et al.*, 2005).

Con menor frecuencia suelen ser reportados otros géneros como *Rhizopus* (Arrúa Alvarenga *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2007; Gallardo *et al.*, 2006), *Mucor* (Arrúa Alvarenga *et al.*, 2012; Gallardo *et al.*, 2006) y *Alternaria* (Gallardo *et al.*, 2006).

Estos mismos grupos de hongos y en el mismo orden son hallados en los granos almacenados de maíz en otras partes del mundo (Venkataramana *et al.*, 2014; Stumpf *et al.*, 2013; Maširević *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2012; Ghiasian *et al.*, 2004; Orsía *et al.*, 2000), pero

además de éstos, también se observaron especies de *Rhizomucor* y *Trichoderma* (Kim *et al.*, 2013).

Requieren menor humedad relativa (70 - 90%) y menor contenido de agua en las semillas (15 - 20%), pero el rango de temperatura es más amplio (0 - 45°C) y pueden crecer a una concentración de oxígeno más baja (Carrillo y Gómez Molina, 2007; Christensen y Kaufmann, 1969).

4.4. Micotoxinas y hongos micotoxigénicos

Los hongos que crecen sobre los materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos, pueden formar metabolitos secundarios que actúan como antibióticos, favoreciendo la prevalencia del hongo frente a otros microorganismos, muchas de tales sustancias son tóxicas para plantas y/o animales (Carrillo y Gómez Molina, 2007; Bennett y Klich, 2003; Swanson, 1987).

Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo de los hongos, formando parte de este grupo los antibióticos y las micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

El término micotoxinas, deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente, son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Soriano del Castillo, 2007). Se conocen unas 300 toxinas fúngicas (Carrillo, 2003; Binder, 2007; Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

La presencia de las micotoxinas en los vegetales se puede deber a la infección de la planta en el campo por el hongo patógeno o a la colonización por los saprobios, al crecimiento de los mohos saprobios o patógenos postcosecha sobre los frutos y granos almacenados o al desarrollo fúngico saprobio durante el almacenamiento de los productos ya procesados (Chulze, 2010; Bennett y Klich 2003; Swanson, 1987).

Las micotoxinas más importantes que contaminan granos de maíz y granos pequeños (trigo, triticale, cebada, etc.) son aflatoxina, ochratoxina, deoxynivalenol (conocido en algunas

áreas por nivalenol o DON), zearalenona y fumonisina (Miller, 2008; Binder, 2007; Pitt, 2000).

La aflatoxina es problema para muchos productos, sin embargo, cuando se trata de granos, es principalmente un problema en maíz. Esto es porque en maíz dependiendo de las condiciones ambientales la contaminación puede venir desde el campo (Miller, 1995).

Las intoxicaciones producidas por las micotoxinas se denominan micotoxicosis (Swanson, 1987; Soriano del Castillo, 2007). La incidencia de micotoxicosis aguda es un problema de salud animal, ya que los alimentos deteriorados por hongos se desechan o se destinan a consumo animal. Mientras que para el hombre tiene mayor importancia la micotoxicosis crónica, asociada al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas durante periodos prolongados (Soriano del Castillo, 2007; Hussein y Brasel, 2001).

En general, los efectos de las micotoxinas en los seres humanos son limitados a estudios de casos, por lo que se recurre a la asociación epidemiológica de las micotoxinas en poblaciones con micotoxicosis (Bennett y Klich, 2003; Hussein y Brasel, 2001).

En seres humanos, la aflatoxina es la toxina más comúnmente asociada con efectos mutagénicos, con desarrollo de carcinomas hepáticos, encefalopatías y deterioro visceral. En tanto la ochratoxina se ha demostrado como causante de tumores epiteliales, y la fumonisina B1 se relaciona con cáncer de estómago y múltiples afecciones (Hussein y Brasel, 2001). La aflatoxina B1 es considerada como el carcinógeno natural más peligroso conocido (Widstrom, 1996).

Debido al peligro que representan las micotoxinas para la salud pública, diversas instituciones nacionales y organizaciones internacionales (Comisión Europea, *Food and Drug Administration*) han tomado medidas regulatorias con el fin de prevenir las afecciones causadas por estos compuestos (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014; Liu *et al.* 2006).

El reglamento aplicado por la Comisión Europea (2006) para los países miembros establece que las concentraciones de aflatoxina B1 para todos los cereales destinados al consumo humano no deben superar 2 ppm, mientras que las demás aflatoxinas (B2, G1 y G2), se tolera

hasta 4 ppm. Para las fumonisinas (B1 y B2) los límites son de hasta 2000 ppm (European Commission, 2006).

En Estados Unidos, la FDA (*Food and Drug Administration*), en noviembre de 2001 ha establecido que los niveles de Fumonisin no debe sobrepasar 4 ppm para productos derivados de maíz destinados al consumo humano, y dependiendo de la especie, entre 5 a 100 ppm para aquéllos destinados al consumo animal (FDA, 2001). Los Estados Unidos y el Canadá no tienen un valor límite único para la aflatoxinas (FAO, 2004).

La regulación del Ministerio de Salud de Brasil, establece como límite máximo tolerado para aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) 5 ppm, mientras que para fumonisinas (B1 + B2) desde enero de 2014 el límite máximo tolerado es de 2000 ppm, límite que para 2016 se reducirá a 1500 ppm, todo esto en granos de maíz destinado al procesamiento o consumo (Misterio de Saúde, BR, 2011).

En México la norma oficial mexicana (NOM-188-SSA1-2002), para los cereales de consumo humano establece un límite de aflatoxinas totales de 20 ppm, y en concentraciones de hasta 300 ppm para consumo animal (Secretaria de Salud, 2002).

Los límites de aflatoxinas tolerados en los alimentos a nivel mundial varían de 0 a 35 ppm, siendo con mayor frecuencia de entre 4 a 20 ppm. El límite para las fumonisinas estaban reglamentadas en pocos países, aunque actualmente son más los que reglamentan en el maíz en un intervalo entre 1000 a 3000 µg/kg (FAO, 2004).

En la producción de micotoxinas se destacan tres géneros fúngicos, pudiendo ser asociados cada uno de ellos con micotoxinas específicas. Los respectivos géneros y micotoxinas son: *Aspergillus*, que comúnmente produce aflatoxinas del tipo B1, M1 y G1 (*Aspergillus flavus* Link. Fr.), sterigmatocistina y ocratoxina A; *Fusarium*, importante productor de fumonisinas, zearalenona, tricotecenos (deoxynivalenol, toxina T2 y DAS), fusarina y moniliformina; y *Penicillium*, que se destaca como sintetizador de fatulina, la citrina y ocratoxina (Munkvold, 2003; Araújo Santana, 2012).

La producción de micotoxinas, especialmente en granos almacenados, es altamente dependiente de las condiciones ambientales, tanto antes de la cosecha como en el

almacenamiento. Las principales condiciones que influyen en el desarrollo de los hongos de almacén y consecuente producción de micotoxinas son la humedad del sustrato, temperatura adecuada, tiempo de almacenamiento, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento, cuerpos extraños, daño físico en los granos y la actividad de insectos y ácaros que facilitan la diseminación (Milani, 2013; Suleiman 2013; Moreno Martínez y Benavides Ocampo, 1988; Christensen y Kaufmann, 1969).

No siempre las condiciones ambientales que permiten a los hongos tener un buen crecimiento vegetativo, son las condiciones que se requieren para la producción de micotoxinas, ya que éstas son metabolitos secundarios de los hongos, que se generan bajo condiciones más específicas que las requeridas para el crecimiento vegetativo (Moreno Martínez y Benavides Ocampo, 1988; Shapira y Paster, 2004).

En el cuadro 2 se presentan las condiciones de temperatura y actividad del agua óptima para producción de las principales micotoxinas según Milani (2013).

Cuadro 2. Temperatura óptima en el grano para la producción de micotoxinas

Micotoxina	Temperatura (°C)	Actividad del agua en el grano
Aflatoxina	33	0.99
Ochratoxina	25-30	0.98
Fumonisin	15-30	0.9-0.995
Zearalenona	25	0.96
Deoxynivalenol	26-30	0.995
Citrinina	20-30	0.75-0.85

Fuente: Milani (2013).

4.4.1. *Fusarium*

Fusarium es el género más común causante de pudrición de mazorca y granos de maíz. La importancia de estas enfermedades ha sido reconocida por muchas décadas, pero el problema permanece debido a que no se ha encontrado altos niveles de resistencia a ser incorporados a los híbridos agrónomicamente deseados. Entre las principales especies se encuentran *F.*

verticillioides, *Fusarium subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* y *F. culmorum*, (Munkvold, 2003).

Por muchos años, estos hongos fueron reconocidos por presentarse sistemáticamente en hojas, tallos, raíces y granos, y puede ser encontrado en los granos en todas partes del mundo, inclusive en granos sanos. La podredumbre de granos causado por *Fusarium* es asociado con alta temperatura, años secos y daños por insecto (Miller, 2008).

Los rastrojos de cultivos son las principales fuentes de inóculo para la infección, siendo los macroconidios y microconidios los inóculos más importantes. Pueden sobrevivir en rastrojos de otras plantas no hospederas, que son invadidas cuando las mismas poseen tejidos en senescencia (Smith y White, 1988; Parry *et al.*, 1995; Jouany, 2007).

Con las prácticas actuales de producción de semillas, la transmisión por semillas ha perdido importancia en relación a la diseminación por el viento a partir de otras fuentes de inóculo (Munkvold, 2003b).

Fusarium verticillioides y *Fusarium proliferatum* son los más importantes productores de micotoxinas, básicamente producen las micotoxinas fumonisina y deoxynivalenol siendo las demás de importancia secundaria (Miller, 2008; Shephard *et al.* 1996). Se estima a nivel mundial una pérdida del 25% de los productos agroalimentarios contaminados por micotoxinas de *Fusarium* (Charmley *et al.* 1994).

Son pocos los estudios realizados referentes a la interacción entre la producción de micotoxinas por *Fusarium* y las condiciones ambientales. La producción de micotoxinas ocurre principalmente en el campo durante la infección de las plantas, y se van acumulando en los granos (Munkvold, 2003b).

Para la ocurrencia natural de fumonisina en el campo ha sido demostrado que es más importante una condición de sequía más que de temperaturas de estrés (Miller, 2008).

Durante el almacenamiento, los fusarios son desplazados por los hongos de almacenamiento que soportan contenidos de humedad más bajo (Birzele y Prange, 2003). Especies de *Fusarium* pueden desarrollar crecimiento micelial a partir de 15% de contenido de humedad

en los granos, dependiendo del tiempo de almacenamiento, y se desarrolla rápidamente por encima de 18% de contenido de humedad. Si las condiciones de humedad son adecuadas para el desarrollo del hongo, la producción de zearalenona ya depende de la temperatura, para que esta micotoxina se produzca siendo la óptima entre 12-18°C (Sherwood y Peberdy, 1974).

La condición óptima para la producción de fumonisina B1 es de 30 °C a 0.97 a_w para *F. verticillioides* y 15°C a 0.97 a_w para *F. proliferatum* (Marín *et al.* 1999). Mientras que en otras especies la producción óptima de fumonisina se da a temperatura de 15-30° C y a_w de 0.9-0.995 (Milani, 2013). En una temperatura constante de 25°C, esto corresponde a una humedad relativa de los granos de 18-23% (Musser y Plattner, 1997).

4.4.2. *Aspergillus*

Aspergillus comprende a un diverso grupo de especies clasificadas de acuerdo características morfológicas, fisiológicas y filogenéticas, las cuales poseen importancia en biotecnología, producción de alimentos, ambientes cerrados y enfermedades en humano. Actualmente cuenta con 339 especies (Samson *et al.*, 2014).

Los aspergilos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, y ser diseminado por el viento o insectos (Richard, 2007; Abarca, 2000).

Son considerados habitantes naturales del suelo, saprófitos con un amplio rango de substratos, frecuentemente colonizan rastros de plantas y cultivos, también alimentos, y varias especies se encuentran entre los más típicos patógenos de poscosecha en frutales, granos y otros vegetales (Pitt, 2000; Barkai-Golan, 1980; Gregory, 1973). Un limitado número de especie puede causar infección a las plantas (Kozakiewicz, 1989).

Causan el deterioro de muchos productos alimenticios, además de los metabolitos secundarios (micotoxinas), producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean

en la fermentación de alimentos en ciertas regiones. Aunque las especies de *Aspergillus* generalmente no son considerados como un importante patógeno de plantas, es el más frecuente encontrado en los productos vegetales. Las especies más comunes son *A. niger* y *A. flavus*, seguido por *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. alliaceus*. La más importante consecuencia es la presencia de contaminación por micotoxinas. Las principales micotoxinas elaboradas por *Aspergillus* son: aflatoxina, ochratoxina A y patulina, las cuales son producidas por varias especies de *Aspergillus* en diferentes productos de origen vegetal (Perrone *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2004; Kozakiewicz, 1989).

Las aflaxotinas B1, B2, G1, G2 son los metabolitos fúngicos más tóxicos y carcinógenos que se encuentran en mayor frecuencia naturalmente, y las especies productoras más importantes son especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi*, que incluyen a *A. flavus* y *A. parasiticus* y varias otras especies (Richard, 2007; Bennett y Klich 2003; Miller, 1995).

En granos almacenados con alta humedad (>14%) y temperatura (>20 °C), y/o inadecuadamente secados pueden ser potencialmente contaminados (Ominski *et al.*, 1994).

Las condiciones ambientales requeridas para la germinación, crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, muestran que la germinación ocurre en un rango más amplio que las requeridas para el crecimiento, y que el rango de condiciones para producción de aflatoxina es menor que las del crecimiento (Milani, 2013).

En el cuadro siguiente se presentan los requerimientos de humedad para el crecimiento de algunas especies de hongos en cereales almacenados, a temperatura de 25° a 27° C, según Montross *et al.* (1999).

Cuadro 3. Requerimiento de humedad en el grano para el crecimiento de especies de *Aspergillus*.

Especies de hongos	Humedad relativa (%)	Contenido de humedad (%)
<i>Aspergillus halophilieus</i>	68	12-14
<i>Aspergillus restrictus</i>	70	13-15
<i>Aspergillus glaucus</i>	73	13-15
<i>Aspergillus candidus</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i>	80	14-16
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	82	15-18

Fuente: Montross *et al.* (1999).

Mureithi (2010) observó que *A. flavus* infecta a granos almacenados de maíz a partir del 13% de humedad relativa, ocurriendo la infección más alta del endosperma con humedad relativa de 18%.

Las condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus* es de 33° C y 0.99 a_w; mientras que para el crecimiento del hongo es de 35° C y 0.95 a_w (Milani, 2013).

4.5. Estrategias de manejo de micotoxinas

La producción de micotoxinas es específica por especies; por lo tanto, la correcta identificación y caracterización del hongo es de primordial importancia para el desarrollo de alguna estrategia de prevención (Samson *et al.*, 2014).

Para manejar la producción, tipo y cantidad de micotoxinas, en primer término se tendrá en cuenta lograr la sanidad del cultivo (apropiado rotación de cultivo y la aplicación de fungicidas en el momento necesario), seguida del acondicionamiento adecuado de los almacenes (correcta combinación del contenido de humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento). Estos factores no actúan por separado, y el grado de la invasión fúngica dependerá de una interacción entre las mismas (Christensen y Kaufmann, 1969; Binder, 2007).

La sanidad de cultivo depende de las prácticas culturales, incluyendo la rotación de cultivos, labranza, fecha de siembra, manejo del riego y fertilización, éstos tienen efectos reducidos en la infección y en la subsecuente acumulación de micotoxinas (Munkvold, 2003a; Jouany, 2007).

La actual infraestructura y prácticas de almacenaje de granos en países desarrollados pueden prevenir el desarrollo de micotoxinas en postcosecha, pero este aspecto sigue siendo una amenaza en los países en desarrollo, especialmente en áreas tropicales (Munkvold, 2003a; Jouany, 2007).

Son utilizados como alternativa el método físico de separación mecánica de granos quebrados por densidad de segregación, clasificación por color, o el simple lavado con

solución de carbonato de calcio, que producen alguna reducción de las micotoxinas en granos de maíz y otros granos (Binder, 2007).

Otros métodos que también pueden ser aplicados, son el descascarado, tratamiento térmico, molienda, irradiación, biológicos y absorbentes (Jouany, 2007). Para intentar disminuir el efecto de las micotoxinas en piensos se ha propuesto el empleo de compuestos secuestrantes o detoxificantes (considerados como nueva categoría de aditivos) (Arroyo Manzanares *et al.*, 2014).

Sin embargo estos tratamientos en evaluaciones comerciales han fallado, debido a que además de reducir bajos niveles de micotoxinas, están limitados a micotoxinas específicas (Binder, 2007).

En el almacenaje el desarrollo del moho puede surgir debido a la variabilidad de la humedad dentro de la masa de granos o la migración de la humedad que resulta del enfriamiento rápido del grano a lo largo de las paredes del silo. Por lo tanto, una estrategia de manejo de postcosecha de micotoxinas, que puede ser implementado, es mantener las condiciones apropiadas de almacenaje, incluyendo el control de insectos (Munkvold, 2003).

La temperatura de almacenaje es el factor más crítico en el manejo de los problemas potenciales de micotoxinas en el secado de grano. Idealmente el grano puede ser enfriado después del secado y mantenerse entre 1° a 4°C durante el almacenamiento. A esta temperatura, el metabolismo del hongo es mínimo. Durante los meses de verano, la temperatura del grano puede ser mantenida entre 10° y 15°C. El control de la temperatura se logra mediante la aireación del grano del silo, donde la temperatura exterior del aire está dentro del rango deseado y la humedad es baja. La aireación es esencial para mantener la calidad del grano en almacenaje, mediante el control de la temperatura y la evaporación de la humedad que ha migrado y condensado en el silo (Midwest Plan Service, 1987).

Debido a la imprevisibilidad de humedad y temperatura asociada al grano almacenado, no importa que tan cuidadosamente se secó o aireó. Las observaciones frecuentes son necesarias para interceptar el desarrollo de problemas por hongos y micotoxinas. Las observaciones semanales son recomendadas durante los meses calurosos, y cada dos semanas durante el invierno. Las observaciones pueden incluir la inspección de la temperatura, costras o mohos

en el grano, humedad en el silo, olor a moho y puntos calientes. Si algún problema es detectado, se deben tomar medidas inmediatas para reducir la temperatura, airear el silo, deshacer los puntos calientes o eliminar el grano dañado (Munkvold, 2003a).

Otras alternativas para el control del crecimiento de hongos en granos almacenados es posible mediante atmosferas controladas, conservantes o inhibidores naturales (Chulze, 2010).

Los estudios que utilizan antioxidantes, aceites esenciales sobre diferentes condiciones de aw, temperatura y atmósfera controlada han sido evaluados como posibles estrategias para la reducción del crecimiento de hongos y micotoxinas (aflatoxinas y fumonisinas), en almacenamiento de maíz, siendo el costo con estos tratamientos una limitación para el uso en gran escala (Chulze, 2010).

El uso de inhibidores de hongo solo reduce la cantidad de hongos pero no influencia sobre el contenido de micotoxinas producidos antes del tratamiento (Binder, 2007).

Más de 280 especies de plantas han sido investigadas por sus efectos inhibitorios sobre especies de *Aspergillus* toxigénicos, y aproximadamente 100 de estas plantas poseen algún efecto sobre el crecimiento o producción de micotoxinas (Montes-Belmont y Carvajal, 1998).

También han sido evaluados otros inhibidores derivados de diferentes fuentes: Nesci *et al.* (2007), evaluaron el efecto del ácido transcinámico y el ácido ferúlico solos y en mezcla; Cota-Arriola *et al.* (2011), concentraciones de 6.71 y 10.66 g.L⁻¹ de quitosano; Moreno-Martínez *et al.* (2000) evaluaron la efectividad de los propionatos de amonio, de calcio, y de sodio; Giorni *et al.* (2008), atmósfera modificada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar y periodo de ejecución del estudio

Las investigaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Chapingo, ubicado en el km 38.5 de la carretera México - Texcoco, Chapingo, Estado de México, y el laboratorio de materiales orgánicos del CINVESTAV Querétaro, ubicado en el Fraccionamiento Real de Juriquilla, Santiago de Querétaro, Estado de Querétaro.

El periodo de ejecución de los estudios fue entre los meses de julio 2014 hasta septiembre de 2015.

5.2. Identificación y cuantificación de hongos y aflatoxinas en granos almacenados de maíz y su relación con las condiciones de almacenamiento

5.2.1. Toma de muestra

Se tomaron muestras en almacenes de grano maíz de los principales estados productores (Cuadro 4). Las mismas se realizaron de acuerdo a lo establecido en la norma oficial mexicana (NOM-188-SSA1-2002) que establece límites de contenido de aflatoxinas en los granos de cereales.

Cuadro 4. Número de muestras evaluadas por estado

Estado	Número de muestras
Chiapas	6
Guanajuato	3
México	5
Morelos	2
Oaxaca	2
Puebla	4
Sinaloa	3
Tabasco	1
Veracruz	1
Total	27

Durante e inmediatamente después del muestreo, se determinaron las principales condiciones (humedad, tipo de almacenamiento, daños en los granos, peso volumétrico, tiempo de almacenamiento y material genético) en que se encontraban los granos.

5.2.2. Aislamiento, purificación y cuantificación

Se emplearon 12 semillas de cada muestra, las que fueron inicialmente desinfectadas en su superficie, durante 2 minutos, con hipoclorito de sodio al 2%, se enjuagaron con agua destilada y secaron con papel estérilizado. Posteriormente se colocaron en placas de Petri (3 semillas por cada placa de Petri) con medio de cultivo papa-dextrosa-agar e incubadas alrededor de 7 días a 27 (± 2) °C (Hernández *et al.*, 2007; Carrillo, 2003; Quiñones Martínez, 2011).

Se realizaron aislamiento y purificación mediante cultivo de punta de hifa de cada cepa de hongos para su posterior identificación (Morales *et al.* 2007; Castañeda Ruiz, 2001; French y Teddy, 1980).

5.2.3. Identificación morfológica

La identificación morfológica de los hongos se realizó mediante observación microscópica de montajes con la técnica de cinta pegante (adhesiva) (Arenas, 2003), provenientes de aislamientos desarrollados en cajas de Petri sobre medio de cultivo PDA y AA con clavel.

Las observaciones fueron comparadas con claves descriptivas de identificación (Sampson *et al.*, 2014; Leslie y Summerell, 2006; Carrillo, 2003; Moreno-Martínez y Benavides Ocampo, 1988; Nelson *et al.*, 1981; Booth, 1971).

Las características morfológicas consideradas durante la identificación fueron: velocidad de crecimiento, pigmentación y aspecto del micelio aéreo, presencia o ausencia, arreglo, tamaño, forma y coloración de micronocios; tamaño, forma, coloración y número de células de los macroconidios, presencia o ausencia de clamidosporas, tamaño y forma de la cabeza y vesícula y presencia o ausencia de métula.

5.2.4. Identificación molecular

Para esta técnica se considero la frecuencia de aislamiento, seleccionandose 8 cepas que presentaron la mayor frecuencia, y se identificaron a nivel de especie.

Para la extracción del DNA fúngico, se siguió el protocolo descrito por la empresa MACROGEN del Kit DNeasy y Plant Mini Kit, Marca Quiagen, que consiste en lo siguiente: De cada hongo purificado e incubado durante 7 días en medio de cultivo PDA, se transfirieron de 50 a 100 mg de micelio a un tubo de microcentrifuga (Eppendorf), se adicionaron 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL de RNasa, se agitó en vortex, se incubaron las muestras en Baño María por 10 min a 65 °C, agitando por inversión 2 o 3 veces; se adicionaron 130 µL de Buffer AP2 y se mantuvieron 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm. Se transfirió el líquido que pasó por la columna a un nuevo tubo de microcentrifuga, al que se le adicionaron 1.5 volúmenes del buffer AP3/E; se colocó en una columna DNeasy Mini spin, se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se pasó a un nuevo tubo, se agregaron 500 µL del buffer AW; se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se agregaron otros 500 µL del buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14, 000 rpm, con el propósito de lavar el ADN; finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo nuevo, se pusieron 100 µL de buffer AE del DNeasy para la elución, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm (Qiagen, 2012).

Una vez obtenido el ADN de las 8 cepas, el producto fue enviado a los Laboratorios de MACROGEN en Korea para la amplificación de dos regiones universales, una correspondiente a la región ITS, así como la región de los genes que codifican para el factor de elongación.

Para cepas del género *Aspergillus* se realizó la amplificación de la región ITS y se utilizaron los iniciadores universales ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') de genes rRNA, de las subunidades 18S, 5.8S y 28S. Los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 550 y 585 pares de bases (pb) aproximadamente (Samson *et al.* 2014).

Por su parte, para cepas con características morfológicas correspondientes al género *Fusarium*, se amplificaron los genes que codifican para el factor de elongación EF1 ATGGGTAAGGAGGACAAGAC y EF2 GGAAGTACCAGTGATCATGTT, que generan un producto de 700 pares de bases (O'Donnell *et al.*, 1998).

5.2.5. Cuantificación de Aflatoxinas

Se realizó utilizando cromatografía de afinidad basada en anticuerpos monoclonales, que detecta las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en granos (Aflatest/VICAM), validado por AOAC (1995). Para la misma se siguió el procedimiento siguiente: se molieron 50 g de la muestra y se agregó 5 g de sal libre de Iodo, éstos fueron mezclados en una solución de metanol/agua destilada 80:20 en una licuadora, durante 1 minuto. Posteriormente se pasó por filtro de papel en un vaso de precipitado; 10 mL de esa solución se diluyó en 40 mL de agua destilada. Posteriormente, se filtró 2 mL del extracto y se lo pasó por la columna de afinidad Aflatest a una velocidad de 1-2 gotas.seg⁻¹, de la misma manera la columna de afinidad Aflatest fue lavada 2 veces haciendo pasar agua destilada a una velocidad de 1-2 gotas.seg⁻¹ de 5 mL. Las aflatoxinas se eluyeron de la columna de afinidad, haciendo pasar por la misma 1 mL de metanol grado HPLC, a una velocidad de 1-2 gotas.seg⁻¹, recogiendo el resultante en tubo de 10 mL; se agregó 1 mL de revelador Aflatest; y se colocó durante 30 segundos en un fluorómetro VICAM Serie 4 E, previamente calibrado.

5.2.6. Procesamiento de datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en una planilla electrónica (Excel), y posteriormente se realizaron pruebas de regresión lineal múltiple con el software SAS versión 9.3, entre la frecuencia de aislamientos, los niveles de aflatoxinas y las condiciones de almacenamiento registradas durante el muestreo. Se consideró como criterio que la variable represora para entrar y permanecer en el modelo debe tener un error tipo I menor a 0.05, y en los casos que fuese necesario, no se incluyó el intercepto en el modelo.

5.3. Prueba *In Vitro* de inhibidores

5.3.1. Unidad, diseño, material y tratamientos experimentales

Las unidades experimentales fueron placas de Petri de 90 mL, con 20 mL de medio de cultivo PDA, dispuestos en un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. Fue realizado el mismo experimento en dos ocasiones (2 repeticiones).

Las especies de hongos utilizados en la experiencia fueron: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium verticillioides*, previamente purificados con cultivo monospórico y multiplicados en medio de cultivo PDA.

Los inhibidores utilizados fueron extracto de *Larrea tridentata* 95%; Azadiractina 85%; y Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%.

Los tratamientos consistieron en concentraciones de 0, 1, 10, 100, 1,000 y 10,000 ppm para los inhibidores extracto de *Larrea tridentata* 95% y Azadiractina 85%, y concentraciones 0, 1, 10, 100 y 1,000 ppm para el inhibidor conformado por la mezcla de Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%.

Los tratamientos se aplicaron agregando diluciones requeridas de cada uno de los extractos en el medio de cultivo PDA, para obtener las respectivas concentraciones, que inmediatamente se vertieron en las placas Petri (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007) y se dejó solidificar durante 24 horas. Después se inocularon las placas colocando en el centro una porción de la colonia cultivada de la cepa de 0.4 cm de diámetro.

5.3.2. Variables evaluadas y metodología utilizada

Para el experimento se evaluaron:

- ✓ Crecimiento radial: se trazó una línea diametral que pasara por el centro del crecimiento y cada 48 horas se midió el crecimiento radial en sentido de la línea con una regla centimetrada. Se expresó en centímetros.

- ✓ Crecimiento micelial relativo al testigo absoluto: el porcentaje de crecimiento micelial en relación al testigo absoluto (0 ppm) se determinó en base al diámetro de las colonias y al testigo absoluto, que fue considerado como el 100% de crecimiento.

5.3.3. Procesamiento de datos

Se realizó análisis de varianza, y en el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Al corresponder los datos de dos experimentos iguales, en un primer análisis se metió como factor las dos réplicas, pero al no haber diferencias significativas entre la réplica I y II, se concatenó en un solo experimento para el análisis de varianza final.

5.4. Evaluación de inhibidores aplicados en grano con diferentes niveles de humedad

5.4.1. Unidad, diseño, material y tratamientos experimentales

Las unidades experimentales fueron botellas plásticas de 600 mL en las que se colocaron 350 gramos de granos, mantenidas a 27° C (± 2 ° C), tapada con película delgada de polietileno para evitar la pérdida de humedad.

El estudio del manejo fue experimental, en un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial (3x3x5) y dos repeticiones. Los factores fueron: A) especies de hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium verticillioides*); B) contenido de humedad (12, 15 y 18%); y C) empleo de anti fúngicos (Extracto de *Larrea tridentata* 10 mL.L⁻¹; Azadiractina 20 mL.L⁻¹; fosfuro de aluminio 3mg. L⁻¹; Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + 0.25% 1.5 mL.L⁻¹) y un testigo.

El material experimental utilizado fue granos de maíz de la variedad criolla previamente desinfectada con un desinfectante orgánico de amplio espectro para uso agropecuario e industrial, compuesto por una mezcla sinérgica de ácidos orgánicos y compuestos peroxigenados (Virkon) en concentración de 1 g.500 mL⁻¹.

Para la aplicación de los tratamientos se siguieron los pasos siguientes:

- ✓ Inoculación: se realizó aplicando a cada unidad experimental 3 mL de suspensión con conidios correspondientes de cada hongo (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium verticillioides*), en una concentración de 500,000 conidios por mL.
- ✓ Antifúngicos: fueron aplicados directamente sobre el grano 3 mL de productos por unidad experimental, con las correspondientes dosis (Extracto de *Larrea tridentata* 10 ml/l; Azadiractina 20 mL.L⁻¹; fosfuro de aluminio 3 mg.L⁻¹; Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + 0.25% 1.5 mL.L⁻¹), a las 24 horas después de la inoculación.
- ✓ Ajuste de humedad: después de 20 horas a 4° C, para permitir una homogeneización de la humedad de los granos, se realizó el humedecimiento ajustando el contenido de humedad a 12, 15 y 18% mediante la fórmula de Pixton y Griffith (1971):

$$\frac{100 - H1}{100} \times P1 = \frac{100 - H2}{100} \times P2$$

Donde H: humedad; P=peso

5.4.2. Variables evaluadas y metodología utilizada

- ✓ Incidencia de hongos en cámara húmeda: a los 10, 20 y 30 días después de la inoculación (DDI) se colocaron en cámaras húmedas 4 repeticiones de 25 semillas de cada unidad experimental y se contó el crecimiento micelial en los granos a los 7 días después de la incubación. Se expresó en porcentaje mediante la fórmula siguiente:
Incidencia (I) = (n° de hongos aislados/total de granos) x100.
- ✓ Incidencia de hongos en los granos almacenados: en 100 granos de cada unidad experimental se realizó el conteo del crecimiento micelial en los granos a los 30, 60 y 90 días de almacenamiento. Se expresó en porcentaje.
- ✓ Determinación de aflatoxinas: Se realizó utilizando cromatografía de afinidad basada en anticuerpos monoclonales, que detecta las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en granos (Aflatest/VICAM).

5.5. Procesamiento de datos

Se realizó análisis de varianza y en el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), en los casos de interacción entre factores, se desdoblaron las interacciones para una mejor comprensión. Se utilizó el software de análisis estadístico SAS versión 9.3.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cuantificación de hongos y aflatoxinas en granos almacenados de maíz

6.1.1. Características generales de las muestras

Las muestras estudiadas provinieron de distintos tipos de establecimientos, ya sea productor, locales comerciales o locales de almacenamiento, siendo en su mayor parte, proveniente de productores.

Las formas de almacenamiento variaron de acuerdo al tipo de establecimientos de donde provinieron. Aquellas muestras obtenidas a partir de productores, generalmente son almacenadas en tambores de 100 o 200 litros, o en costales, y con menor frecuencia en trojas o cozcomates. En los locales comerciales el almacenamiento comúnmente se realiza en costales, mientras que en los establecimientos de almacenamiento se realiza en silos de granos con tecnología más avanzada.

Esta menor disponibilidad de tecnología en el almacenamiento de los granos por parte de los pequeños productores provoca una mayor cantidad de pérdida principalmente en las regiones tropicales o subtropicales (IICA, 2012; Munkvold, 2003a; Jouany, 2007).

En su mayor parte los granos analizados fueron de variedades criollas y el híbrido Asgrow 7573, y con menores frecuencias otros híbridos como Cronos y DK 2060.

La humedad de los granos almacenados osciló entre un rango de 14.4 a 22.2%, con una media de 13.24% (Cuadro 5). En el 70% de los granos el contenido de humedad fue de 13% o menor, lo cual según Munkvold (2003b) es recomendado para el almacenamiento de granos de maíz.

El tiempo de almacenamiento también fue muy variable (de 4 a 42 meses), con un 60% de muestras almacenadas por menos de un año, siendo el mayor tiempo de almacenamiento de establecimientos de productores que destina su producción al autoconsumo.

Cuadro 5. Características de las muestras de granos de maíz provenientes de distintos estados de México

Características	Promedio	Mínimo	Máximo
Humedad	13.24	10.40	22.20
Tiempo de almacenamiento (meses)	11.81	4.00	42.00
Daños en la semilla (%)	19.81	1.00	84.00
Peso volumétrico (kg.hL ⁻¹)	72.24	46.90	80.70

Los daños observados en las semillas fueron daños mecánicos durante la cosecha o daños por insecto, con una media de 20%. Tanto el tiempo de almacenamiento y el nivel de daños que mostraron los granos son factores determinantes en la incidencia de hongos micotoxigénicos, y por lo tanto de micotoxinas en los granos (Christensen y Kaufmann, 1969; Binder, 2007).

Para peso volumétrico la media fue 72.24 kg.hL⁻¹, con un rango que varió de entre 46.9 a 80.7 kg.hL⁻¹, muy aproximados a lo reportado por Peña Betancourt *et al.*, (2013), quienes analizando 15 muestras provenientes de diferentes estados de variedades criollas e híbridos de granos maíz destinados para el consumo, encontraron que el peso volumétrico se halla entre 49 y 80 kg.hL⁻¹.

6.1.2. Frecuencia de aislamiento de hongos

Los géneros con mayor frecuencia fueron *Fusarium* y *Aspergillus*, con 32 y 8% de incidencia respectivamente. Estos dos generos conjuntamente con *Penicillium* (1.1%), son los hongos más frecuentes en granos almacenados a nivel mundial (Venkataramana *et al.*, 2014; Stumpf *et al.*, 2013; Maširević *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2012; Arrúa Alvarenga *et al.*, 2012; García y Martínez, 2010; Hernández *et al.*, 2007; Gallardo *et al.*, 2006; Bucio *et al.*, 2005; Ghiasian *et al.*, 2004; Orsia *et al.*, 2000; Christensen y López, 1962).

Otros géneros aislados fueron *Cladosporium* (2.4%), *Rhizopus* (1.1%) y *Trichoderma* (1.4%) (Figura 1).

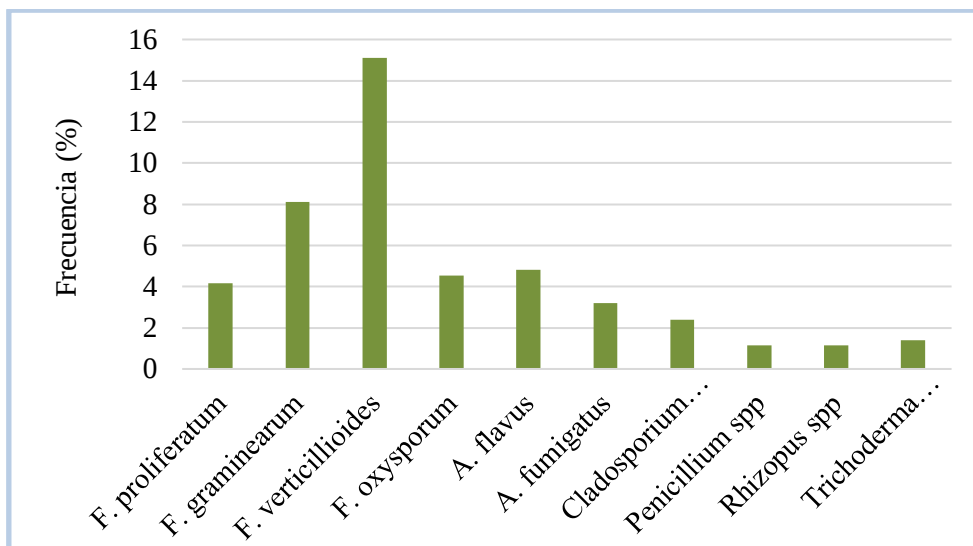


Figura 1. Frecuencia de aislamiento de hongos (%) en granos de maiz almacenados bajo diferentes condiciones en México.

Se identificaron 4 especies de *Fusarium*: (*F. verticillioides* 15.1%, *F. oxysporum* 4.5%, *F. proliferatum* 4.2%, y *F. graminearum* 8.1%) y dos especies de *Aspergillus*: (*A. flavus* 4.8% y *A. fumigatus* 3.2%).

Al realizar una regresión lineal múltiple con una probabilidad de error tipo I del 0.05 entre el contenido de humedad en los granos, el tiempo de almacenamiento, daños de la semilla y peso volumétrico con la incidencia del género *Aspergillus*, se pudo generar un modelo, correspondiendo el mejor ajuste a la ecuación siguiente: Frecuencia de *Aspergillus* = 2.11 (% contenido de humedad en los granos) – 0.27 (peso volumétrico).

Algunos factores como el daño en los granos ya sea mecánico o por insecto que facilita la infección del hongo (Setamou *et al.*, 1997), formaron parte del modelo cuando se permitía la probabilidad de error tipo I del 0.1, sin embargo al reducir ésta a 0.05 ya no quedó en el modelo de mejor ajuste, indicando de esta manera que, aunque haya influido en el nivel de incidencia de *Aspergillus*, el contenido de humedad en los granos y el peso volumétrico, tuvieron una mayor influencia.

La humedad de grano fue el factor con mayor influencia en la incidencia de *Aspergillus* en las muestras evaluadas, según Ominski *et al.*, (1994), y conjuntamente con la temperatura afectan fuertemente la invasión fúngica en granos almacenados.

La influencia del peso volumétrico se debe a que está relacionado con una mayor dureza de los granos (Correa *et al.*, 2002), por lo tanto genera una mayor dificultad a que sean invadidos por los microorganismos.

Sin embargo, ninguno de los factores actúan por separado, y el grado de la invasión fúngica dependerá de una interacción entre las mismas (Christensen y Kaufmann, 1969; Binder, 2007).

6.1.3. Niveles de aflatoxinas

Los niveles de aflatoxinas detectados en las muestras tuvieron una variación de entre 0 a 68 ppm, con una media de 9.74 ppm (Figura 2). El 93% de las muestras tuvo una concentración de aflatoxinas por debajo del nivel permitido por la norma oficial mexicana (NOM-188-SSA1-2002), que establece límites del contenido de Aflatoxinas en los granos de cereales para el consumo humano y animal de 20 ppm.

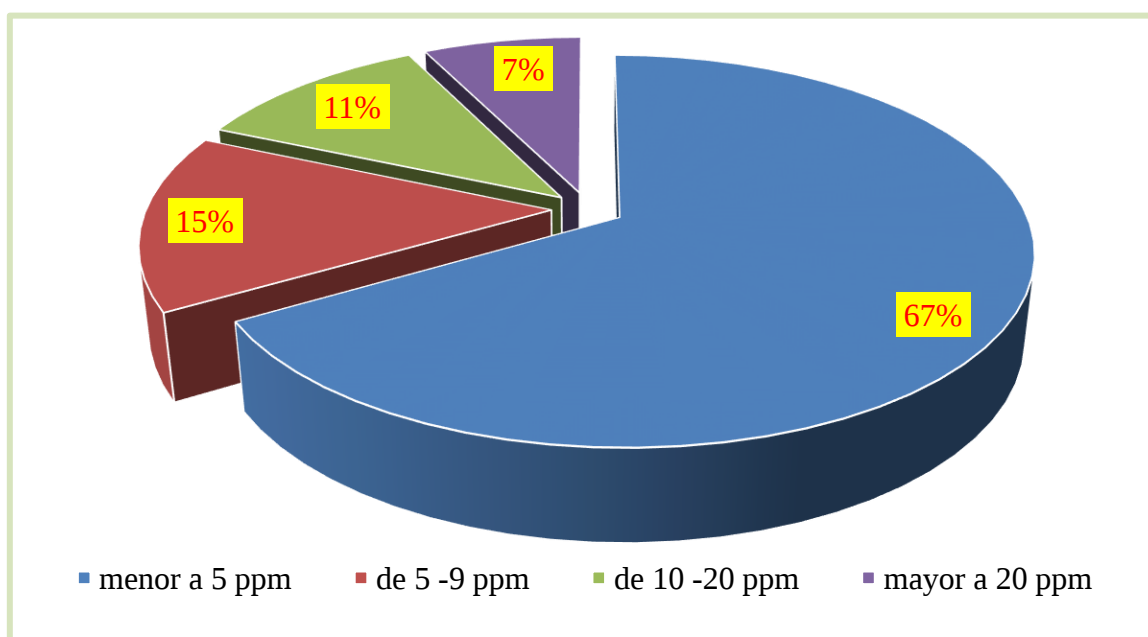


Figura 2. Niveles de aflatoxinas en muestras de granos almacenados de maíz provenientes de distintos estados de México.

Los niveles de aflatoxinas mayores a 20 ppm fueron las muestras con la menor frecuencia, con un total de 7%. El mejor ajuste para esta variable fue el modelo siguiente: niveles de aflatoxinas (ppm) = 0.49 (tiempo de almacenamiento) + 0.68 (% incidencia de *Aspergillus*).

Lo anterior coincide con lo reportado por Hell *et al.*, (2000), quien en un estudio realizado en los países de la costa este de África, encontró que los factores de mayor influencia en la acumulación de aflatoxinas fueron el tiempo de almacenamiento, los daños en la semilla, y el uso de productos o extractos de plantas locales como protectantes durante el almacenamiento. Asimismo, el grado de invasión fúngica está ampliamente documentado como uno de los principales aspectos en el contenido de micotoxinas en postcosecha (Chulze, 2010; Bennett y Klich 2003; Swanson, 1987), lo cual fue constatado en esta investigación y validado con el modelo antes mencionado.

6.2. Prueba *In Vitro* de inhibidores

6.2.1. *Aspergillus flavus*

En el cuadro 6 y 7 se presentan los resultados correspondientes al crecimiento radial en centímetro del micelio y crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de *A. flavus* con diferentes concentraciones de inhibidores, a los 6 días después de la inoculación. En donde se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para los 3 inhibidores utilizados.

Cuadro 6. Crecimiento radial del micelio en centímetros de *A. flavus* a los 6 días después de la inoculación con diferentes concentraciones de inhibidores. Texcoco, 2015.

Tratamientos (ppm)	Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	Tukey ¹ 5%	Azadiractina 85%	Tukey ¹ 5%	Extracto de <i>L.</i> <i>tridentata</i> 95%	Tukey ¹ 5%
10000			0.43	A	0.26	A
1000	0.00	A	0.43	A	0.43	AB
100	0.14	A	0.58	ABC	0.44	B
10	0.50	B	0.72	C	0.46	B
1	0.54	B	0.64	BC	0.49	B
0	0.49	B	0.49	AB	0.54	B
Media	0.33		0.57		0.44	
FC	52.88**		6.83**		5.59**	
CV (%)	28.86		23.24		23.69	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Para el caso de la mezcla de Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%, se observó que en una concentración de 1,000 ppm no permitió el crecimiento

micelial del hongo (0% de crecimiento micelial), y siendo muy leve el crecimiento en la concentración 100 ppm (27% de crecimiento micelial), estas dos concentraciones se diferenciaron significativamente de los demás tratamientos con menor concentración, las cuales no causaron inhibición del crecimiento micelial y resultaron estadísticamente similares al tratamiento control (0 ppm).

Con azadiractina al 85%, los valores más bajo de crecimiento micelial fueron observadas en concentraciones de 10,000 y 1,000 ppm, con promedios similares y un crecimiento micelial de 94 y 91% respectivamente (Cuadro7), lo anterior también ha sido observado por Ghorbanian *et al.*, (2008) y Bhatnagar y McCormick (1988), con *Aspergillus parasiticus*.

Asimismo, para concentraciones de 100, 10 y 1 ppm, el crecimiento micelial fue aun mayor, inclusive con promedios superiores al testigo, evidenciando que de acuerdo a la variación de concentración, se podría presentar un efecto estimulante de este producto para *A. flavus*.

Resultados similares fueron presentados por Da Costa *et al.* (2010) y Allameh *et al.* (2002), en concentraciones de 5,000 y 50,000 ppm, quienes no observaron efecto del aceite esencial de Neem sobre el crecimiento, sin embargo, pudieron comprobar que hay una reducción en la producción de aflatoxinas.

Cuadro 7. Porcentaje de crecimiento micelial relativo al testigo de *A. flavus* con diferentes concentraciones de inhibidores. Texcoco, 2015.

Tratamientos (ppm)	Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	Tukey ¹ 5%	Azadiractina 85%	Tukey ¹ 5%	Extracto de <i>L. tridentata</i> 95%	Tukey ¹ 5%
10000			94	A	55	A
1000	0	A	91	A	92	AB
100	27	A	121	AB	94	AB
10	107	B	152	AB	95	AB
1	113	B	134	AB	115	B
0	100	B	100	AB	100	B
Media	69		121		112	
FC	36.33**		3.78**		4.38	
CV (%)	35.15		30.98		27.4	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹ Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En el tratamiento con extracto de *Larrea tridentata* 95%, el crecimiento micelial en la concentración 10,000 ppm fue de 55% (Cuadro 7), claramente inferior al crecimiento micelial en las concentraciones menores entre las que no se observó diferencias significativas (inclusive con el tratamiento control, 0 ppm), y donde el crecimiento micelial fueron superior al 90%.

6.2.2. *Aspergillus fumigatus*

En los cuadro 8 y 9 se presentan los resultados correspondientes al crecimiento radial del micelio (en cm) y crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de *A. fumigatus*, con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para los 3 inhibidores utilizados.

La mezcla de Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%, en su concentración de 1,000 ppm, no permitió el crecimiento de *A. fumigatus* (0% de crecimiento micelial) (Cuadro 9). En las concentraciones menores se observaron crecimientos considerables, con un crecimiento micelial del 75% en 100 ppm, y 91% en 10 ppm, con resultados similares estadísticamente con la dosis de 1 ppm y el control (testigo absoluto).

Cuadro 8. Crecimiento radial de micelio en centímetro de *A. fumigatus* con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Texcoco, 2015.

Tratamientos (ppm)	Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	Tukey ¹ 5%	Azadiractina 85%	Tukey ¹ 5%	Extracto de <i>L.</i> <i>tridentata</i> 95%	Tukey ¹ 5%
10000			0.69	A	0.35	A
1000	0.00	A	0.72	A	1.11	B
100	1.04	B	1.43	B	1.11	B
10	1.28	C	1.55	B	1.14	B
1	1.39	C	1.56	B	1.35	B
0	1.41	C	1.40	B	1.38	B
Media	1.02		1.33		1.22	
FC	111.23**		59.19**		24.28**	
CV (%)	15.48		12.25		20.00	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

El ácido ascórbico resultó muy eficiente en concentraciones muy bajas para ambas especies de *Aspergillus*, inclusive en concentraciones más bajas de las permitidas para la

conservación de productos alimenticios que es de 1 a 6% (Ribotta y Tadini, 2009), reflejándose el efecto sinérgico de la mezcla de los tres; Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%.

En cuanto a Azadiractina 85%, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con 10,000 ppm y 1,000 ppm, con un crecimiento micelial del 46 y 48% respectivamente (Cuadro 9), al igual que los demás tratamientos y éstos con el testigo, con un rango de crecimiento entre 1.40 y 1.56 cm de radio a los 6 días después de la inoculación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de *A. fumigatus* con diferentes concentraciones de inhibidores. Texcoco, 2015.

Tratamientos (ppm)	Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	Tukey ¹ 5%	Azadiractina 85%	Tukey ¹ 5%	Extracto de <i>L.</i> <i>tridentata</i> 95%	Tukey ¹ 5%
10000			46	A	26	A
1000	0	A	48	A	82	B
100	75	B	97	B	81	B
10	91	C	105	B	85	B
1	100	C	105	B	100	B
0	100	C	93	B	100	B
Media	73		90		90	
FC	160.85**		26.82**		15.26**	
CV (%)	12.84		18.40		25.17	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

El extracto de *Larrea tridentata* 95%, tuvo su mayor eficacia únicamente en la concentración de 10,000 ppm, permitiendo un crecimiento micelial de 0.35 cm (Tabla 3), correspondiendo esto a 26% de crecimiento micelial relativo al testigo absoluto, diferenciándose de las demás concentraciones que llegaron a más de 80% de crecimiento micelial del hongo y siendo similares estadísticamente al tratamiento control (Cuadro 9).

6.2.3. *Fusarium verticillioides*

En los cuadros 10 y 11 se presentan los resultados correspondientes al crecimiento radial en centímetros de micelio y crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de *F. verticillioides*, con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días de inoculación.

Similar con los observados en *A. flavus* y *A. fumigatus*, las diferencias observadas resultaron altamente significativas para los 3 inhibidores utilizados.

Como lo ocurrido con *A. flavus* y *A. fumigatus*, la concentración de 1,000 ppm de Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%, no hubo crecimiento de *F. verticillioides*, pero en el tratamiento de 100 ppm el crecimiento micelial fue del 80%, e inclusive se observó una clara estimulación en el crecimiento en las concentraciones menores, con crecimiento micelial por encima de lo observado en el testigo absoluto (Cuadros 10 y 11).

Cuadro 10. Crecimiento radial de micelio en centímetros de *F. verticillioides* con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Texcoco, 2015.

Tratamientos (ppm)	Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	Tukey 5%	Azadiractina 85%	Tukey 5%	Extracto de <i>L.</i> <i>tridentata</i> 95%	Tukey 5%
10000			1.04	A	0.34	A
1000	0	A	1.21	B	1.51	D
100	0.7	B	1.68	C	0.98	C
10	1.02	CD	2.04	D	0.66	B
1	1.19	D	1.9	D	0.81	BC
0	0.88	BC	0.88	A	0.88	C
Media	0.76		1.54		0.97	
FC	111.81**		155.26		86.54	
CV (%)	16.25		7.51		13.72	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Para Azadiractina 85%, no hubo inhibición del crecimiento de *F. verticillioides*, inclusive se observó estímulo en el crecimiento, tendencia observada en *A. flavus*, cuando las concentraciones del producto eran menores a 1,000 ppm. Un comportamiento contradictorio o diferente fue observado por Moslem y El-Kholie (2009), quienes pudieron comprobar efectos inhibitorios del extracto de Neem pero en *F. oxysporum*, al igual que Joseph *et al.* (2008), en *F. solani*, pero cuando las concentraciones fueron superiores a 50,000 ppm, mientras que Geraldo *et al.* (2010), observaron valores de 35% de inhibición del crecimiento micelial en *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, en tratamientos con 10,000 ppm de extracto de Neem.

El extracto de *Larrea tridentata* 95% por su parte, de modo similar a lo ocurrido en *A. fumigatus*, inhibió el crecimiento de *F. verticillioides*, solo en la concentración de 10,000 ppm, llegando hasta un porcentaje de 39% de crecimiento micelial (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de crecimiento micelial relativo al testigo absoluto de *F. verticillioides* con diferentes concentraciones de inhibidores a los 6 días después de la inoculación. Texcoco, 2015.

Tratamientos (ppm)	Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	Tukey ¹ 5%	Azadiractina 85%	Tukey ¹ 5%	Extracto de <i>L. tridentata</i> 95%	Tukey ¹ 5%
10000			120	AB	39	A
1000	0	A	139	B	174	D
100	80	B	195	C	113	C
10	118	CD	237	D	77	B
1	138	D	219	CD	93	BC
0	100	BC	100	A	100	C
Media	87		178		111	
FC	82.15**		58.36**		70.74**	
CV (%)	19.03		12.38		15.13	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Mayores efectos inhibitorios pudieron conseguirse con los extractos de *Larrea tridentata* 95%, en las especies de *Aspergillus* y *Fusarium* evaluados, sin embargo, se requiere una mayor concentración del extracto (Tequida-Meneses *et al.*, 2002; Suárez-Jiménez *et al.*, 2007; Moreno-Limón *et al.*, 2011), el uso de sus constituyentes antifúngicos (methyl-NDGA) en forma pura, (Vargas-Arispuroa *et al.*, 2005), o mezclas con otros inhibidores (Reyes Mungía, 2014).

En estos casos, cuando el objetivo es el desarrollo del producto para aplicación en materias primas para productos alimenticios, las concentraciones más elevadas o las mezclas de las mismas deben ser realizadas sin que comprometan la inocuidad (Stanley *et al.* 2007) del grano.

6.3. Evaluación de inhibidores aplicados en grano con diferentes niveles de humedad

6.3.1. Incidencia de hongos en cámara húmeda

Las incidencias de los hongos en los granos en cámara húmeda arrojó como resultado la interacción entre los tres factores evaluados (inhibidores, hongos y humedad en los granos), por lo cual se desdobló la interacción en dos interacciones (inhibidores x hongos y humedad x hongos), para permitir una mejor interpretación de los resultados (Cuadro 12 y 13).

Cuadro 12. Incidencia de hongos por inhibidor aplicado en granos. Texcoco, 2015.

Inhibidores	Hongos	Incidencia (%) 10 DDI	Tukey 5% ¹	Incidencia (%) 20 DDI	Tukey 5% ¹	Incidencia (%) 30 DDI	Tukey 5% ¹
Ác. ascórbico 1%+ Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	<i>A. flavus</i>	5	A	29	A	91	A
	<i>A. fumigatus</i>	90	D	95	B	99	C
	<i>F. verticillioides</i>	87	D	99	B	100	C
Azadiractina 85%	<i>A. flavus</i>	20	B	30	A	97	BC
	<i>A. fumigatus</i>	88	D	98	B	98	BC
	<i>F. verticillioides</i>	86	C	98	B	99	C
Extracto de <i>L. tridentata</i> 95%	<i>A. flavus</i>	9	A	33	A	94	BC
	<i>A. fumigatus</i>	91	D	96	B	99	C
	<i>F. verticillioides</i>	89	C	97	B	100	C
Fosforo de aluminio	<i>A. flavus</i>	8	A	26	A	97	AB
	<i>A. fumigatus</i>	89	D	94	B	99	C
	<i>F. verticillioides</i>	74	D	99	B	100	C
Testigo	<i>A. flavus</i>	16	A	21	A	98	BC
	<i>A. fumigatus</i>	93	D	98	B	99	C
	<i>F. verticillioides</i>	90	D	99	B	100	C
Media		62		74		98	
FC Inhibidores		5.30**		0.51ns		3.24*	
FC Hongos		1384.93**		855.19**		23.12**	
FC Inhibidores * hongos		3.86**		1.13ns		6.02**	
CV (%)		14.65		14.37		3.20	

** Significativo a $p \leq 0.01$. * Significativo a $p \leq 0.05$. ns no significativo $p \leq 0.05$.¹ Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la interacción de inhibidores por hongos, se puede observar que a los 10 días después de la inoculación (DDI), las incidencias más bajas se presentaron en *A. fumigatus* y *F.*

verticillioides, encontrándose los niveles más bajos con los inhibidores fosforo de aluminio y Azadiractina 85% para *A. fumigatus* y con fosforo de aluminio para *F. verticillioides*.

Es importante recalcar que en todos los casos, los tratamientos inoculados con *A. flavus* presentaron las incidencias más bajas, siendo el mínimo observado de 5% cuando a los granos inoculados del hongo fue tratado con Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%.

A los 20 DDI ya no se observaron diferencias significativas entre los productos, aún se observaron diferencias significativas entre la interacción inhibidores por hongos, pero se debió a una mayor influencia del factor hongo. Esto se puede observar claramente con los grupos formados en la comparación múltiple de medias, donde en todos los inhibidores *A. flavus* se halla con menor incidencia que los otros hongos, y entre todas las demás interacciones no se hallaron diferencias estadísticas significativas. En forma similar a estos resultados pudieron ser evidenciados a los 30 DDI, pero con tendencias menos claras, debido a que todas las incidencias observadas ya fueron muy cercanas al 100%, además, de que la residualidad de estos productos se ve disminuida con el transcurso del tiempo.

Cuadro 13. Incidencia de hongos por humedad de almacenamiento en granos. Texcoco, 2015.

Humedad (%)	Hongos	Incidencia (%) 10 DDI	Tukey 5%	Incidencia (%) 20 DDI	Tukey 5%	Incidencia (%) 30 DDI	Tukey 5%
12	<i>A. flavus</i>	11	A	37	A	96	A
	<i>A. fumigatus</i>	86	C	95	B	98	B
	<i>F. verticillioides</i>	71	B	96	B	99	B
15	<i>A. flavus</i>	9	A	21	A	96	A
	<i>A. fumigatus</i>	91	CD	98	B	99	B
	<i>F. verticillioides</i>	90	CD	99	B	99	B
18	<i>A. flavus</i>	16	A	26	A	96	A
	<i>A. fumigatus</i>	97	D	97	B	99	B
	<i>F. verticillioides</i>	92	CD	100	B	100	B
Media		62		74		98	
FC Humedad		1383.93**		1.41ns		0.39ns	
FC hongo		26.77**		855.19**		23.12**	
FC Humedad * hongo		11.67**		5.96**		0.53ns	

** Significativo a $p \leq 0.01$. * Significativo a $p \leq 0.05$. ns no significativo $p > 0.05$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Cuando se analizó la interacción entre humedad y hongos inoculados, la tendencia fue similar a lo ocurrido con la interacción inhibidores y hongos inoculados. Las diferencias estadísticas observadas se debieron principalmente a los hongos inoculados, presentándose muy bajas incidencias en *A. flavus*, mientras que entre *A. fumigatus* y *F. verticillioides* no se presentaron diferencias significativas.

El promedio de incidencias fue de 62, 74 y 98% para las evaluaciones realizadas a los 10, 20 y 30 DDI. El alto porcentaje de incidencia desde los primeros 10 DDI se debe a que los productos aplicados son inhibidores, que de alguna manera limitan el crecimiento de los hongos, sin embargo no eliminan el inóculo, por lo cual al ponerse en cámara húmeda, el desarrollo micelial continua y se puede observar rápidamente. Sin embargo, se puede observar que hasta los primeros 10 DDI, hubo una mayor influencia del factor inhibidores, pero que para las evaluaciones posteriores ya no presentó dicho efecto.

Las diferencias que resultan entre los hongos se deben a que durante todo el experimento *A. flavus* presentó un crecimiento mucho más lento que a *A. fumigatus* y *F. verticillioides*, ya sea en medio de cultivo o durante su inoculación en granos.

6.3.2. Incidencia en granos almacenados

En los granos almacenados no se observaron crecimientos de hongos ni se observó crecimiento micelial a los 30 y 60 DDI, sin embargo en la evaluación realizada a los 90 días, se observaron crecimientos miceliales y esporulación en todos los tratamientos aplicados. Resultados similares fueron observados por Moreno-Martínez *et al.* (2000), con *A. flavus* hasta los 30 días después de la evaluación, tiempo que duró su experimento, con contenidos de humedad en los granos de entre 16-22%.

Se observaron resultados con diferencias significativas en cada uno de los factores, en la interacción de los tres factores (inhibidores, humedad y hongos), y entre la interacción hongos por inhibidores.

Considerando la interacción entre hongos e inhibidores, de modo similar a lo ocurrido en la evaluación en cámara húmeda, la mayor influencia se debió a la especie de hongo que se inoculó, siendo evidenciado el crecimiento más lento de *A. flavus* en el sustrato, que en este

caso fueron los granos de maíz, y siendo claramente inferior a los demás cuando el inhibidor fue fosforo de aluminio, generando de esta manera la significancia estadística en la interacción de estos factores (Cuadro 14).

Los demás inhibidores aplicados no ocasionaron diferencia en el desarrollo de los hongos inoculados, inclusive el efecto de los mismos no arrojaron diferencias con el testigo donde no se aplicó inhibidor.

Cuadro 14. Incidencia de hongos por humedad de almacenamiento en granos. Texcoco, 2015.

Inhibidores	Hongos	Incidencia (%) 90	
		DDI	Tukey 5% ¹
Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	<i>A. flavus</i>	18	AB
	<i>A. fumigatus</i>	22	AB
	<i>F. verticillioides</i>	31	B
Azadiractina 85%	<i>A. flavus</i>	25	AB
	<i>A. fumigatus</i>	29	B
	<i>F. verticillioides</i>	34	B
Extracto de <i>L. tridentata</i> 95%	<i>A. flavus</i>	18	AB
	<i>A. fumigatus</i>	20	AB
	<i>F. verticillioides</i>	22	AB
Fosforo de aluminio	<i>A. flavus</i>	10	A
	<i>A. fumigatus</i>	29	B
	<i>F. verticillioides</i>	30	B
Testigo	<i>A. flavus</i>	21	AB
	<i>A. fumigatus</i>	23	AB
	<i>F. verticillioides</i>	25	AB
Media		24	
FC inhibidores		3.00*	
FC Hongos		8.31**	
FC inhibidores * hongos		2.38*	
CV (%)		34.60	

** Significativo a $p \leq 0.01$. * Significativo a $p \leq 0.05$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Entre los hongos inoculados, la menor incidencia se observó en *A. flavus*, seguido de *A. fumigatus* y *F. verticillioides*, puesto que estas dos últimas presentaron promedios sin diferencias estadísticas significativas (Cuadro 15). Aunque *A. flavus* presenta un crecimiento más lento, este hongo se puede desarrollar a partir de 13% de humedad, al igual que otras especies de *Aspergillus*, sin embargo el mayor crecimiento se desarrolla a 18% de humedad (Mureithi, 2010), mientras que las especies de *Fusarium* requieren humedades más elevadas, según Birzele y Prange (2003), ya que su desarrollo en humedad de 15%, depende del tiempo

de almacenamiento, pero se desarrolla rápidamente a partir de 18% de contenido de humedad.

Cuadro 15. Incidencia de hongos en granos almacenados de maíz a los 90 DDI. Texcoco, 2015.

Hongos	Incidencia (%) 90 DDI	Tukey 5% ¹
<i>A. flavus</i>	19	A
<i>A. fumigatus</i>	24	B
<i>F. verticillioides</i>	27	B
Media	24	
FC Producto	8.31**	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Entre los diferentes % de humedad de granos en almacenamiento, las diferencias estadísticas fueron altamente significativas, correspondiendo la menor incidencia a la humedad de 12%, seguido de 15% y la incidencia más alta se encontró con la humedad de 18% (Cuadro 16), comprobando que la humedad de almacenamiento está dentro de los factores más importantes para el desarrollo de hongos en el almacenamiento (Milani, 2013; Suleiman, 2013).

Cuadro 16. Incidencia promedio de hongos (*A. flavus*, *A. fumigatus* y *F. verticillioides*) en granos almacenados de maíz con distintas humedad. Texcoco, 2015.

Humedad (%)	Incidencia (%) 90 DDI	Tukey 5% ¹
12	13	A
15	22	B
18	37	C
Media	24	
FC Humedad	63.09**	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Como lo observado en la interacción de inhibidores y hongos, las diferencias del efecto de los inhibidores no presenta una tendencia clara, siendo influenciada más fuertemente por otros factores, como ser el hongo (genero) en cuestión, la humedad de almacenamiento o el tiempo de almacenamiento, considerando que a partir de los 20 DDI, en las evaluaciones realizadas en cámara húmeda, los inhibidores ya presentaron un comportamiento inestable.

Para la completa inhibición de los hongos de granos almacenados, varios autores han comprobado que el ácido acético puede ser efectivo, sin embargo la concentración del mismo debe estar por encima de las 8,000 ppm, y tratando a la semilla por un tiempo prolongado (Abd-Alla, 2005; Morsy *et al.*, 1999; Sholberg *et al.*, 1996).

Cuadro 17. Incidencia promedio de hongos (*A. flavus*, *A. fumigatus* y *F. verticillioides*) en granos almacenados de maíz con distintos inhibidores aplicados en los granos. Texcoco, 2015.

Inhibidores	Incidencia (%) 90	
	DDI	Tukey 5% ¹
Fosforo de aluminio	20	A
Extracto de <i>L. tridentata</i> 95%	23	AB
testigo	23	AB
Ác. ascórbico 1% + Ác. cítrico 0.25% + Ác. láctico 0.25%	24	AB
Azadirectina 85 %	29	B
Media	24	
FC Producto	3.00*	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Para el caso de fosforo de aluminio, éste puede ser solubilizado por algunas especies de hongos, principalmente del género *Aspergillus*, *Penicillium* y otros hongos productores de micorrizas (Rinu *et al.*, 2013; Seshadri *et al.*, 2010; Souchie *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2013), por lo cual su uso en almacenamiento de granos se limita al control de insectos.

6.3.3. Niveles de aflatoxinas

En el cuadro 18 se presentan los resultados correspondientes a la acumulación de aflatoxinas en los granos, inoculados con 3 especies de hongos, 3 humedades relativas de los granos, y la aplicación de inhibidores fúngicos sobre los granos.

En la evaluación realizada a los 90 DDI, no hubo diferencias significativas entre los hongos, los inhibidores aplicados y las interacciones entre inhibidores por hongo y humedad por hongos, únicamente se observó diferencias significativas entre los porcentajes de humedad relativas de los granos durante el almacenamiento (Cuadro 18). Sin embargo, Ghorbanian *et al.* (2008) y Bhatnagar y McCormick (1988) pudieron observar que aunque la reducción de

crecimiento micelial del tratamiento con Azadiractina 85% es escasa, sí reduce la producción de Aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus*.

Cuadro 18. Niveles de aflatoxinas a los 90 días en granos de maíz inoculados con *A. flavus* y *A. fumigatus* bajo distintas humedades relativas de almacenamiento. Texcoco, 2015.

Humedad (%)	Aflatoxinas (ppm)	Tukey 5% ¹
12	0.0	A
15	0.8	A
18	6.7	B
Media	3	
FC Humedad	9.50**	
FC Hongo	0.95ns	
FC Inhibidores	1.33ns	
FC Inhibidores x hongos	1.87ns	
FC Humedad x hongos	2.53ns	
CV (%)	212.41	

** Significativo a $p \leq 0.01$. ¹Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Se puede observar que después de los 90 DDI, la producción de aflatoxinas se produjo únicamente en los granos con humedades relativas de 18%, siendo solamente trazas las acumuladas en 15% de humedad, y no se encontraron micotoxinas cuando las humedades relativas de almacenamiento fueron fue del 12%.

Aquí se puede mencionar, que el crecimiento micelial también apenas se detectó a los 90 DDI, evidenciando que hasta los 60 DDI, el desarrollo de hongo fue escaso, y por lo tanto también la producción de micotoxinas.

El tiempo de almacenamiento es uno de los factores que también influyen fuertemente en la interacción con los otros factores, como son la humedad y la temperatura según lo informado por (Milani, 2013; Suleiman 2013; Binder, 2007; Moreno Martínez y Benavides Ocampo, 1988; Christensen y Kaufmann, 1969), lo cual se puede reflejar en estos resultados obtenidos de manera afianzanda o confiable.

Por otra parte Moreno-Martínez *et al.* (2000), pudieron observar que con un contenido de humedad de entre 16-22% en los granos almacenados se puede detectar la producción de aflatoxinas a partir de los 30 días después de inoculando *A. flavus*.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Los hongos con mayor incidencia en las muestras de granos de maíz procedentes de varios estados de México fueron *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *A. flavus* y *A. fumigatus*.
- ✓ Los factores con mayor influencia sobre la incidencia de *Aspergillus* en las muestras estudiadas, fueron el contenido de humedad en los granos y el peso volumétrico.
- ✓ El 93% evidenciaron concentraciones menores a 20 ppm (nivel permitido por la norma oficial mexicana (NOM-188-SSA1-2002) y solo el 7% supero el valor permitido.
- ✓ Los factores que más influyeron en los niveles de aflatoxinas en los granos almacenados fueron el tiempo de almacenamiento y la incidencia de *Aspergillus*.
- ✓ En la evaluación *In Vitro*, la concentración de 1000 ppm de Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%, no permitió el crecimiento de *F. verticillioides*, *A. flavus* y *A. fumigatus*.
- ✓ La mayor inhibición del extracto de *Larrea tridentata* 95% y Azadiractina 85% fue en *A. fumigatus* con 74% y 54% respectivamente a una concentración de 10,000 ppm.
- ✓ En las condiciones que se realizó el estudio, los inhibidores; Ácido ascórbico 1% + Ácido cítrico 0.25% + Ácido láctico 0.25%, extracto de *Larrea tridentata* 95% y Azadiractina 85% perdieron su residualidad a los 10 días después su aplicación.
- ✓ Se observó el crecimiento micelial de *F. verticillioides*, *A. flavus* y *A. fumigatus* a partir de los 90 días después de la inoculación, con una mayor incidencia de *A. flavus* en las humedades de almacenamiento de los granos de 15 y 18%.
- ✓ A los 90 días después de la inoculación, la producción de aflatoxinas se detectó solo en los granos almacenados con humedades de 18%.

8. LITERATURA CITADA

- Abarca, ML. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol* 17: 79-84
- Abd-Alla, MA. 2005. Effect of Acetic Acid Fumigation on Common Storage Fungi of Some Medicinal and Aromatic Seeds. *Egypt. J. Phytopathol.*, 33(1): 77-86
- Allameh, A; Razzaghi Abyane, M; Shams, M; Rezaee, MB; Jaimand, K. 2002. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. 154(2):79-84.
- AOAC (Association of Analytical communities). 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International In 16th edition AOAC International, Arlington, VA. Ed. Cunniff, P. pp. 20–21. Chapter 49.
- Araújo Santana, MC. 2012. Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. *REDVET* 13(7): 1-18
- Arbeláez Torres, G. 1978. Los problemas de las aflatoxinas en sorgo (*Sorghum bicolor*). In *El cultivo del sorgo*. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá, CL. no 26: 132-161.
- Arenas, R. 2003. *Micología médica ilustrada*. 2da Edición. McGraw Hill. México DF. 352p.
- Arroyo-Manzanares, N; Huertas-Pérez, JF; Gámiz-Gracia, L; García-Campaña, M. 2014. Control de micotoxinas en alimentos. *Revista Boletín GRASEQA* no 7: 16-31.
- Arrúa Alvarenga, AA; Quezada Viay, MY; Vázquez Badillo, ME; Flores Olivas, A. 2012. Incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en maíz (*Zea mays* L.) de diferentes orígenes geográficos en México. *Fitosanidad*, 16(1):49-50.
- Barkai-Golan, R. 1980. Species of *Aspergillus* causing post-harvest fruit decay in Israel. *Mycopathologia*, 71, 13–6.
- Bengtsson, LP; Whitaker, JH. 1988. *Farm structures in tropical climates*. FAO. Roma, IT. 394 p.
- Bennett, JW; Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology. Review* 16: 497-516
- Bhatnagar, D; McCormick, SP. 1988. The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf Extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of American Oil Chemical Society*, 65(7):1166-1168.
- Binder, EM. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133:149–166

- Birzele, B; Prange, A. 2003. *Fusarium spp.* and Storage Fungi in Suboptimally Stored Wheat: Mycotoxins and Influence on Wheat Gluten Proteins. *Mycotoxin Research*, 19: 162-170
- Bishop Lack, PC; Stephen, RC; William, FB. 1983. Crop science and food production. First Edition. 262- 279.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey. 237p.
- Bucio, CM; Martínez, O; Morales, R. 2005. Contaminación con hongos en maíz recién cosechado en el estado de Guanajuato durante el año 2003. *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos*, Gto., México, 2005.
- Bustamante, E. 1984. Efectos de hongos en granos almacenados. In *Reconocimiento y manejo de problemas fitosanitarios en productos almacenados. Ponencias, resultados y recomendaciones de eventos técnicos N° 351*. Ed. Montoya Henao, R. IICA/ICA. Bogotá, CL. 265 p.
- Cabañes, F. 2000. Micotoxinas emergentes. Introducción. *Rev Iberoam Micol*; no 17:61-62.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Salta*. Salta, AR. 128 p.
- Carrillo, L; Gómez Molina, SE. 2007. Micotoxinas. In *Manual de Microbiología de los Alimentos*. Eds. Carrillo, L; Audisio, MC. 1ª edición. UNJU, San Salvador Jujuy, AR. 194 p.
- Castañeda Ruiz, RF. 2001. Parámetros empleados para la identificación de los hongos conidiales. Pasado y presente en la taxonomía de los Hifomicetes. *Rev. Protección Veg.* 162(3): 92-101.
- Charmley, LL; Rosenberg, A; Trenholm, HL. 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. In *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*. Eds. Miller, JD; Trenholm, HL. Eagan Press, St. Paul.pp. 471-486
- Christensen, CM; Kaufmann, HH. 1969. Grain Storage: The Role of Fungi in Quality Loss. U of Minnesota Press, Fungi in agricultura. 153 p.
- Chulze, SN. 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Additives and Contaminants* 27(5): 651-657.
- Correa, CE; Shaver, RD; Pereira, M. 2002. Relationship between corn and ruminal in situ starch degradability. *J. Dairy Sci.*85:3008-3012

- Cota-Arriola, O; López-Franco, YL; Burgos-Hernández, A; Rosas-Burgos, EC; Plascencia-Jatomea, M; Cortez-Rocha; MO. 2011. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, 60(6): 937-944.
- Crhistensen, CM; López, LC. 1962. Daños que causan en México los hongos de granos almacenados. INIA, MX. Folleto técnico. no 44:31p.
- Cruz, JF; Diop, A. 1990. Avances en la ingeniería agrícola: técnicas de almacenamiento. FAO. Roma, IT. 131 p.
- Da Costa, CL; Geraldo, MRF; Arrotéia, CC; Kemmelmeier, C. 2010. *In vitro* activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and Aflatoxins B1 and B2 production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, no 1: 292-299
- Desai, BB. 2004. Biology, production, processing, and storage. Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 800 p.
- European Commission. 2006. Commission regulation number 1881 of 19 december 2006: setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364:5-24.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 2010. Reducing post-harvest losses in grain supply chains in Africa: Lessons learned and practical guidelines. FAO/World Bank Work. FAO Headquarters, Rome Italy, 18–19.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. FAO, Roma, IT. 45 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) 1993. El maíz en la nutrición humana. (en línea). Consultado 02 ago 2014. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S02.htm>
- FDA (Food and Drug Administration, US). 2001. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance (en línea). Consultado 29 ago 2014. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ucm109231.htm>
- Folayan, JA. 2013. Determinants of Post Harvest Losses of Maize in Akure North Local Government Area of Ondo State, Nigeria. *Journal of Sustainable Society*, 2(1): 12-19

- French, ER; Teddy, TH. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Bib. Orton IICA/CATIE, San José, CR. 289 p.
- Gallardo, E; Ibarra, G; Sánchez, R; Cuamea, G; Molina, D; Parra, N; Rosas, E; Cortez, M. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) NIRENB. Rev. Mex. de Fitopatología 24 (1): 27-34
- García, G; Martínez, R. 2010. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. Rev. Mex. Biodiv. 81(1): 15-20
- Geraldo, MRF; Arroteia, CC; Kemmelmeier, C. 2010. The effects of neem [*Azadirachta indica* A. Juss (meliaceae)] oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. medicagenis and *Fusarium subglutinans* and the production of fusaric acid toxin. Advances in Bioscience and Biotechnology, no 1:1-6
- Ghiasian, SA; Kord-Bacheh, P; Rezayat, SM; Maghsood, AH; Taherkhani, H. 2004. Micoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. Micopathología. no 158:113-121.
- Ghorbanian, M; Razzaghi-Abyaneh, M; Allameh, A; Shams-Ghahfarokhi, M; Qorbani M. 2008. Study on the effect of neem (*Azadirachta indica* A. juss) leaf extract on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin by it at different incubation times. Mycoses. Jan. 51(1):35-9.
- Giorni, P; Battilani, P; Pietri, A; Magan, N. 2008. Effect of aw and CO2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. Int J Food Microbiol. 122(1-2):109-113
- Gregory, PH. 1973. The Microbiology of the Atmosphere. London, UK: Leonard Hill (Books) Ltd. 377 p.
- Guerrero-Rodríguez, E; Solís-Gaona, S; Hernández-Castillo, FD; Flores-Olivas, A; Sandoval-López, V; Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad Biológica in vitro de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25(1): 48-53
- Hall, DW. 1971. Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las zonas tropicales y subtropicales. FAO. Roma, Italia. 399 p.
- Harlan, JR. 1992. Crops & Man. American Society of Agronomy, Science. 284 p.

- Hell, K; Cardwella, KF; Setamoub, M; Poehling, HM. 2000. The influence of storage practices on aflatoxina, contamination in maize in four agroecological zones of Benin, west Africa. *Journal of Stored Products Research* 36: 365-382
- Hernández, S; Reyes, M; García, J; Mayek, N; Reyes, C. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México, *Rev. Mex. De Fitopatología* 25 (2):127-133.
- Hussein, HS; Brasel, JM. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101–134
- IICA (Inter American Institute for Cooperation on Agriculture). 2012. Post Harvest Losses in Latin America and the Caribbean: Challenges and Opportunities for Collaboration (en línea). Consultado 09 ago 2015. Disponible en <http://www.iica.int/Esp/Programas/SeguridadAlimentaria/Documentos%20Seguridad%20Alimentaria/IICA%20Post%20Harvest%20Loss%20ReportFinal.pdf>
- Joseph, B; Ahmad Dar, M; Kumar, V. 2008. Bioefficacy of Plant Extracts to Control *Fusarium solani* F. Sp. Melongenae Incitant of Brinjal Wilt. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3 (2): 56-59.
- Jouany, JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 342–362
- Kaaya, AN; Kyamuhangire, W. 2006. The effect of storage time and agro-ecological zone on mold incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda, *International Journal of Food Microbiology* 110(3):217–223.
- Kim, MD; Lee, N; Kim, SM; Chung, SH; Kim, M; Han, SB; Chun, HS. 2013. Occurrence of Aflatoxin and Aflatoxigenic *Aspergillus* Species in Corn Harvested in Korea. *Journal Korean Soc Appl Biol Chem*, no 56: 221–225
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products *Mycological Papers* 161: 1 C.A.B. International Mycological Institute, Kew, Surrey, UK
- Krnjaja, VS; Levic, JT; Stankovic, SZ; Petrovic, TS; Lukic, MD. 2013. *Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, no 124:111-119.
- Leslie-F. J; Summerell-A, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing 369 p.
- Liu, Z; Gao, J; Yu, J. 2006. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China”, *Journal of Stored Products Research* 42(4): 468–479.
- Malavolta, E; Haag, HP; Mello, FAF. 1974. *Nutricao mineral e adubacao de plantas cultivadas*. Sao Paulo, BR, Companhia Editorial Paulista. 727 p.

- Marín, S; Magan, N; Belli, N; Ramos, AJ; Canela, R; Sanchis, V. 1999. Two dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 51: 159–167
- Marín, S; Ramos, AJ; Cano-Sancho, G; Sanchis, V. 2012. Reduction of mycotoxins and toxigenic fungi in the Mediterranean basin maize chain. *Phytopathologia Mediterránea* 51(1):93–118
- Maširević, S; Medić-Pap, S; Birvalski, S. 2012. Mycoflora of maize seed. *Research Journal of Agricultural Science*, 44 (2): 58-62.
- Mejía, D. 2003. Maize: post-harvest operation. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), AGST. Roma, IT. 99 p.
- Mendes, G. de O; Vassilev, NB; Bonduki, VHA; da Silva, IR; Ribeiro, JI; Costa, MD. 2013. Inhibition of *Aspergillus niger* Phosphate Solubilization by Fluoride Released from Rock Phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16):4906–4913.
- Midwest Plan Service. 1987. Grain Drying, Handling, Storage Handbook. Ames, IA: Iowa State Univ. 2nd ed
- Milani, JM. 2013. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinarni Medicina*, 58 (8): 405–411
- Miller, D. 1995. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. Review. *J. stored Prod. Res.* 31(1):1-16
- Miller, D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25:2, 219-230
- Ministerio de Saúde, BR. 2011. Resolução Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (en línea). Consultado 28 ago 2014. Disponible en http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html
- Montes-Belmont, R; Carvajal, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J Food Prot.* 61(5):616-619.
- Montross, JE; Montross, MD; Bakker-Arkema, FW. 1999. Part 1.4 Grain storage 46-59. In. *CIGR Hand Book of Agricultural Engineering. Volume IV. Agro-Processing Engineering*. Eds. Bakker-Arkema, FW; Amirante, DP; Ruiz-Altisent, M; Studman, CJ. St. Joseph, Michigan, USA.

- Morales, RI; Yañez, MJ; Silva, HV; García, SG; Guzmán, DA. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a pylogenetic approach. *Mycopathologia* 163(1):31-9.
- Moreno Martínez, E; Benavides Ocampo, C. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM, D.F. México. 109 p.
- Moreno-Limón, S; González-Solís, LN; Salcedo-Martínez, SM; Cárdenas-Avila, ML; Perales-Ramírez, A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*. no 32:193-205.
- Moreno-Martínez, E; Vázquez-Badillo, M; Facio-Parra, F. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. *Agrociencia* 34 (4): 477-484.
- Morris, ML; López-Pereira, MA. 2000. Impactos del mejoramiento de maíz en América Latina, 1966-1997. México, D.F. CIMMYT. 45 p.
- Morsy, AA; Abd-El-K, F; Abd-Alla, MA. 2000. Effect of acetic acid fumigation on common storage fungi of some grains. Egypt. J. Phytopathol., 28: 95-106
- Moslem, MA; El-Kholie, EM. 2009. Effect of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. *Pakistan journal of biological sciences*. 12(14):1045-1049
- Munkvold, GP. 2003a. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology* 41:99-116
- Munkvold, GP. 2003b. Epidemiology of *Fusarium* Diseases and their Mycotoxins in Maize Ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705–713.
- Mureithi, BK. 2010. Effect of production practices, storage materials and moisture content on fungal and aflatoxin contamination of maize and maize products. Tesis Msc. Crop protection. Facultad of Agriculture/University of Nairobi. Nairobi, Kenia.
- Musser, SM; Plattner, RD. 1997. Fumonisin Composition in Cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. *J. Agric. Food Chem.* 45:1169–1173
- Nelson, PE; Tousson, TA; Cook, R. 1981. *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania University Park, USA and London, UK: Pennsylvania State University Press.
- Nesci, A; Gsponer, N; Etcheverry, M. 2007. Natural maize phenolic acids for control of Aflatoxigenic fungi o maize. *Journal of food science*. 72(2): 180-185.

- O'Donnell, K; Kistler, C; Cigelnik, E; Ploetz, RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044–2049.
- Ominski, KH; Marquardt, RR; Sinah, RN; Abramson, D. 1994. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain-compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, pp. 287–312.
- Orsia, RB; Corrêa, B; Possib, CR; Schammas, AE; Nogueira, JR; Dias, SMC; Malozzic, MAB. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* no 36: 75-87
- Paliwal, RL; Granados, G; Lafitte, HR.; Violic, AD; Marathée, JP. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. no 28. FAO. ROMA, IT. 392 p.
- Parry, DW; Jenkinson, P; McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. *Review. Plant Pathology* 44: 207–238
- Peña Betancourt, SD; Carmona Medero, MA; Valladares Carranza, B. 2013. Comparación de calidad física, contenido de fenoles y aflatoxinas en maíces híbridos y nativos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4 (5):779-788
- Perrone, G; Susca, A; Cozzi, G; Ehrlich, K; Varga, J; Frisvad, JC; Samson, RA. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 5(9):53–66.
- Pitt, JI. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56(1): 184-192.
- Pixton, SW; Giffith, HJ. 1971. Diffusion of moisture through grain. *Journal of Stored Products Research*, 7, 133-152
- Quiagen. 2012. Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania.
- Quiñones Martínez M. 2011. Manual de Prácticas de Eumicota. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chihuahua.
- Ramayo Ramírez, LF. 1977. Tecnología de granos y semillas (apuntes). Tesis Ing. Agr. IA/UACH. Chapingo, México. 215 p.
- Ramírez, M. 1974. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Editorial SECSA. D.F. México. 300 p.
- Reyes Munguía, A; Aguilar Zárate, M; Carrillo Inungaray, ML. 2014. Efecto del uso combinado de extracto de *Larrea tridentata* y sorbato de potasio sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1(2):63-67.

- Ribairo, S. 2003. Maíz. Semilla de la vida. In Custodians of biodiversity. Ed. Massi, D. Edizioni Angolo Manzone/FAO. Torino, IT. 128 p.
- Ribotta, PD; Tadini, CC. 2009. Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados. Primera edición. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 327 p.
- Richard, JL. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119:3–10
- Rinu, K; Malviya, MK; Sati, P; Tiwari, SC; Pandey, A. 2013. Response of cold-tolerant *Aspergillus spp.* to solubilization of Fe and al phosphate in presence of different nutritional sources.
- Samson, RA; Visagie, CM; Houbraken, J; -B. Hong, S; Hubka, V; Klaassen, CHW; Perrone, G; Seifert, KA; Susca, A; Tanney, JB; Varga, J; Kocsub, S; Szigeti, G; Yaguchi, T; Frisvad, JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology* 78: 141–173.
- Sanchis, V; Marín, S; Ramos, AJ. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. En: Soriano del Castillo JM, eds. Micotoxinas en alimentos. España: Díaz de Santos, 63-68.
- Secretaría de Salud. 2002. Norma oficial mexicana NOM-188-SSA1-2002, productos y servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones Sanitarias. Diario oficial. Ciudad de México, MX. 15 de octubre 2002. 41 p.
- Seshadri, S; Ignacimuthu, S; Lakshminarasimhan, C. 2010. Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, 191: 1043-1052
- Setamou, M; Cardwell, KF; Schulthess, F; Hell, K. 1997. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of preharvest maize in Benin. *Plant Dis.* 81:1323–1327.
- Shapira, R; Paster, N. 2004. Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In: *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. Eds Magan, N; Olsen, M. CRC Press, Woodhead Publishin Limited, England. pp. 190–223.
- Shephard, GS; Thiel, PG; Stockenström, S; Sydenham, EW. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal AOAC Int* 79(3):671-687

- Sherwood, RF; Peberdy, JF. 1974. Production of the Mycotoxin, Zearalenone, by *Fusarium graminearum* Growing on Stored Grain I. Grain Storage at Reduced Temperatures. J. Sci. Fd Agric. 25:1081-1087.
- Sholberg, PL; Regnolds, AG; Gaunce, AP. 1996. Fumigation of table grapes with acetic acid to prevent postharvest decay. Plant Dis., 80: 1425-1428
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, MX). 2013. Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. Serie Situación y perspectiva actual. México D.F. 208 p.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, MX). 2014a. Balanzas disponibilidad-consumo de productos agrícolas (en línea). Consultado 31 jul 2014. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/balanza-disponibilidad-consumo/>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, MX). 2014b. Producción agrícola. Ciclo: Año Agrícola OI+PV 2012. Modalidad: Riego + Temporal. (en línea). Consultado 02 feb 2014. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Simopoulos, AP. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother 56: 365–379
- Smith, DR; White, DG. 1988. Diseases of corn. In: Sprague GF and Dudley JW (eds) Corn and Corn Improvement, 3rd edn (pp 687–766) Agronomy Series No. 18. Am. Soc. Agronomy, Madison, WI, USA
- Soriano del Castillo, JM. 2007. Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos. España. 396 p.
- Souchie, EL; Azcón, R; Barea, JM; Saggin-Júnior, OJ; Silva, EM Ribeiro da. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41(9):1405-1411
- Stanley, P; Cauvain, SP; Young, LS. 2007. Technology of bread making. 2do edition. Springer Science+Business Media. New York. USA. 389 p.
- Stoskopf, NC. 1985. Cereal Grain Crops. Reston, Reston Publishing Company. Technology & Engineering - 516 p.
- Stumpf, R; Dos Santos, J; Gomes, LB; Silva, CN; Tessmann, DJ; Ferreira, FD; Machinski, Junior, M; Del Ponte, EM. 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. Brazilian Journal of Microbiology 44 (1): 89-95

- Suárez-Jiménez, GM; Cortez-Rocha, MO; Rosas-Burgos, EC; Burgos-Hernández, A; Plascencia-Jatomea, M; Cinco-Moroyoq, FJ. 2007. Antifungal Activity of Plant Methanolic Extracts Against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. And Fumonisin B1 Production. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2):134-142
- Suleiman, RA; Rosentrater, KA; Bern, CJ. 2013. Effects of deterioration parameters on storage of maize: A Review. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(9):146-165.
- Swanson BG. 1987. Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207:49-61.
- Tabitha, MN, De Groote, H; Nzuma, J. 2013. Comparative Analysis of Maize Storage Structures in Kenya. 4th Conference of the African Association of Agricultural Economists (AAAE), 22-25 September 2013, Tunisia.
- Tefera, T. 2012. Post-harvest losses in African maize in the face of increasing food shortage. *Food Sec.* 4:267–277
- Tefera, T; Kanampiu, F; De Groote, H; Hellin, J; Mugo, S; Kimenju, S; Beyene, Y; Boddupalli, PM; Shiferaw, B; Banziger, M. 2011. The metal silo: An effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder farmer's food security in developing countries. *Crop Protection* 30: 240-245.
- Tequida-Meneses, M; Cortez-Rocha, M; Rosas-Burgos, EC; López-Sandoval, S; Corrales-Maldonado, C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoam. de Micol.* 19: 84-88.
- USDA (United States Department of Agriculture, US). 2015. World agricultural supply and demand estimates. (en línea). Consultado 07 ago 2015. Disponible en <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>
- Varga, J; Juhász, A; Kevei, F; Kozakiewicz, Z. 2004. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology* 110: 627–640.
- Vargas-Arispuroa, I; Reyes-Baez, R; Rivera-Castaneda, G; Martínez-Tellez, MA; Rivero-Espejelb, I. 2005. Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products*. no: 22: 101–107
- Venkataramana, M; Siddaih, CN; Nagesh, M; Garapati, P; Naveen Kumar, K; Sreepathi Murali, H; Yli Mattilad, T; Vardan Batrac, H. 2014. Mould incidence and mycotoxin contamination in freshly harvested maize kernels originated from India. *Jornal Science Food Agric.*

- Villers, P.2015. Aflatoxin Growth versus Safe Pre- and Post-Harvest Drying and Storage.
Journal of Postharvest Technology, 03 (03): 058-066
- Widstrom, NW. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. Advances in Agronomy 56:
219-280.