



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**EVALUACIÓN DEL QUITOSANO COMO UN SISTEMA DE CONTROL NO
CONVENCIONAL EN EL CRECIMIENTO DE HONGOS PATÓGENOS
PRODUCTORES DE MICOTOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ**

POR:

Q.F.B. ESTEFANÍA MARTÍNEZ BATISTA

TESIS PROPUESTA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PORFIRIO GUTIÉRREZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTORA:

DRA. CYNDIA AZUCENA GONZÁLEZ ARIAS

Tepic, Nayarit, México

Abril, 2021

RESUMEN

El maíz es el principal alimento en México ya que constituye la base alimentaria de millones de mexicanos, sin embargo, su producción se ve afectada por la presencia de hongos productores de micotoxinas como son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, provocando daños en la calidad de los granos almacenados, además de la presencia de micotoxinas que son dañinas para la salud. Con el propósito de evitar el crecimiento de estos agentes patógenos, se buscan nuevos métodos de control, en especial de naturaleza biológica, ya que los más utilizados son los métodos químicos, principalmente fungicidas, que contaminan el medio ambiente y dañan la salud de los seres vivos, por lo cual se evaluó la eficacia de la aplicación de tratamientos de quitosano comercial de alto peso molecular, para el control del crecimiento de dichos hongos y prolongar la conservación del grano de maíz durante su almacenamiento.

Las muestras de maíz fueron proporcionadas por la compañía global de alimentos GRUMA de la marca MASECA ubicada en el municipio de Acaponeta, Nayarit. Primero se calculó el contenido de humedad y el porcentaje de germinación para determinar la calidad del grano. Posteriormente se logró aislar tres hongos, los cuales fueron identificados de manera morfológica y molecularmente como *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides*. Se llevaron a cabo pruebas "in vitro" aplicando concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% de quitosano. El mejor tratamiento resultó ser la concentración más alta, se obtuvo una inhibición del crecimiento micelial de 74.97, 93.19 y 89.79% para *A. niger*, *P. funiculosum* y *F. verticillioides*, respectivamente. Sin embargo, se observó un mayor efecto en *P. funiculosum* y *F. verticillioides* logrando inhibir al 100% el proceso de germinación. Para las pruebas "in vivo" se aplicó el tratamiento de quitosano por inmersión en granos de maíz, con la concentración más efectiva de las pruebas "in vitro", donde previamente se inoculó a los hongos por aspersión para evaluar la incidencia (I) y severidad (S) a diferentes temperaturas de almacenamiento (12 y 25 °C). *F. verticillioides* mostró mayor efecto, ya que se obtuvo un porcentaje menor al 20%, tanto para I como S, sin importar la temperatura. Para *A. niger* y *P. funiculosum* la temperatura sí tuvo efecto, ya que a 12 °C no hubo crecimiento del patógeno y a 25 °C se obtuvo una I del 100 y 97.78%; y una S de 80 y 64.22% respectivamente. Por último se aplicó quitosano al 2.0% a los granos de maíz por inmersión y aspersión para evaluar parámetros de calidad, se observó que el tratamiento no afecta la calidad del grano en relación a su germinación, sin embargo se deben buscar métodos de aplicación donde no aumente el porcentaje de humedad arriba del 15%, como en el caso de aspersión e inmersión.

El quitosano comercial de alto peso molecular demostró ser un tratamiento efectivo para controlar el crecimiento de los hongos productores de micotoxinas establecidos en los granos de maíz almacenados. Sin embargo, se necesita evaluar concentraciones más altas o combinar tratamientos para hongos más resistentes como *A. niger*.

Palabras claves: Maíz, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium verticillioides*, quitosano.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays L.*) is the main food in Mexico, which it constitutes the food base of millions of Mexicans, however its production is affected by the presence of mycotoxin-producing fungi such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, causing damage to the quality of the stored grains, in addition to the production of mycotoxins that are harmful to health. In order to prevent the growth of these pathogens, new control methods are being sought, especially of a biological nature, since the most used are chemical methods, mainly fungicides, which pollute the environment and harm human health. For this reason, the efficacy of the application of high molecular weight commercial chitosan treatments was evaluated to control the growth of fungi and prolong the conservation of the corn grain during its storage. The corn samples were provided by the global food company GRUMA MASECA located in the city of Acaponeta, Nayarit. First, the moisture content and the germination percentage were calculated to determine the quality of the grain. Subsequently, it was possible to isolate three fungi, which were identified morphologically and molecularly as *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* and *Fusarium verticillioides*. "In vitro" tests were carried out applying concentrations of 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% of chitosan. The best treatment turned out to be the highest concentration, an inhibition of mycelial growth of 74.97, 93.19 and 89.79% was obtained for *A. niger*, *P. funiculosum* and *F. verticillioides* respectively. However, a greater effect was observed in *P. funiculosum* and *F. verticillioides*, achieving a 100% inhibition of the germination process. For the "in vivo" tests, the chitosan treatment was applied by immersion in corn grains, with the most effective concentration of the "in vitro" tests, where the fungi were previously inoculated by aspersion to evaluate the incidence (I) and severity (S) at different storage temperatures (12 and 25 °C). *F. verticillioides* showed a greater effect, since a percentage lower than 20% was obtained, both for incidence and severity, regardless of temperature. For *A. niger* and *P. funiculosum*, the temperature did have an effect, since at 12 °C there was no growth of the pathogen and at 25 °C an I of 100 and 97.78% was obtained; and an S of 80 and 64.22% respectively. Finally, 2.0% chitosan was applied to the corn grains by immersion and spraying to evaluate quality parameters, it was observed that the treatment does not affect the quality of the grain in relation to its germination, however, application methods should be sought where it does not increase the humidity percentage above 15%, as in the case of spraying and immersion. High molecular weight commercial chitosan proved to be an effective treatment to control the growth of mycotoxin-producing fungi established in stored corn grains. However, it is necessary to evaluate higher concentrations or combine treatments for more resistant fungi such as *A. niger*.

Key words: Maize, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium verticillioides*, Chitosan.

ÍNDICE

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....	9
Capítulo 2 ANTECEDENTES.....	11
2.1 Generalidades del Maíz.....	11
2.1.1 Estructura del grano de maíz.....	11
2.2 Producción de maíz en México.....	12
2.3 Almacenamiento de granos.....	13
2.4 Problemas durante el almacenamiento de granos.....	14
2.5 Hongos presentes en la etapa de almacenamiento de maíz.....	16
2.5.1 <i>Aspergillus spp.</i>	16
2.5.2 <i>Penicillium spp.</i>	18
2.5.3 <i>Fusarium spp.</i>	20
2.6 Tratamientos para el control de hongos.....	21
2.7 Quitosano como control biológico.....	22
2.7.1 Mecanismo de acción del quitosano.....	24
2.7.1.1 Propiedades antimicrobianas.....	24
2.7.1.2 Formación de películas.....	25
2.7.1.3 Inducción de los mecanismos de defensa.....	25
Capítulo 3 JUSTIFICACIÓN.....	26
Capítulo 4 OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
Capítulo 5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1 PRIMERA ETAPA.....	28
5.1.1 Obtención de granos de maíz.....	28
5.1.2 Contenido de humedad.....	28
5.1.3 Prueba de germinación de la semilla en toallas de papel enrolladas.....	29
5.1.4 Aislamiento, purificación e identificación morfológica de hongos a nivel de género.....	30
5.1.5 Identificación de hongos a nivel de especie.....	30
5.1.6 Preparación y aplicación de quitosano.....	31
5.2 SEGUNDA ETAPA (Pruebas “ <i>in vitro</i> ”).....	31
5.2.1 Determinación del crecimiento micelial.....	31
5.2.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.....	32
5.2.3 Cuantificación de esporas.....	32
5.2.4 Porcentaje de germinación.....	33
5.2.5 Diseño experimental y análisis estadístico de los ensayos “ <i>in vitro</i> ”.....	34

5.3	TERCERA ETAPA (Pruebas “ <i>in vivo</i> ”)	34
5.3.1	Preparación y aplicación de quitosano a granos de maíz	34
5.3.2	Inoculación del patógeno a los granos de maíz	35
5.3.3	Porcentaje de incidencia y de severidad	35
5.3.4	Parámetros de calidad de los granos de maíz con aplicación de quitosano	36
5.3.5	Diseño experimental y análisis estadístico de los ensayos “ <i>in vivo</i> ”	36
Capítulo 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN		38
6.1	PRIMERA ETAPA	38
6.1.1	Contenido de humedad y germinación como parámetros de calidad del maíz	38
6.1.2	Aislamiento, purificación e identificación a nivel de género de hongos productores de micotoxinas presentes en granos de maíz	40
6.1.3	Identificación de hongos presentes en granos de maíz a nivel de especie	45
6.2	SEGUNDA ETAPA (Pruebas “ <i>in vitro</i> ”)	45
6.2.1	Inhibición del crecimiento micelial	45
6.2.2	Cuantificación de esporas	50
6.2.3	Porcentaje de Germinación	51
6.3	TERCERA ETAPA (Pruebas “ <i>in vivo</i> ”)	55
6.3.1	Prueba de incidencia y severidad	55
6.3.2	Parámetros de calidad de los granos de maíz con la aplicación de quitosano	60
Capítulo 7 CONCLUSIONES		62
Capítulo 8 BIBLIOGRAFÍA		63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura del grano de maíz. Fuente: UNAM, 2017.....	12
Figura 2.2 Características microscópicas de <i>Aspergillus sp.</i> (Fuente: Pitt & Hocking, 2009).....	18
Figura 2.3 Tipos de penicillus en especies de <i>Penicillium</i> (a) monoverticilados, (b) biverticilados y (c) terverticilados (Fuente: Pitt & Hocking, 2009).....	19
Figura 2.4 Macroconidios y microconidios de <i>Fusarium sp.</i> (Fuente: Pitt et al., 2009).	21
Figura 2.5 Estructura molecular de la celulosa, quitina y quitosano (Fuente: Ifuku, 2014).....	24
Figura 5.1 Representación de escala diagramática del grano infectado por a) <i>Aspergillus niger</i> , b) <i>Penicillium funiculosum</i> y c) <i>Fusarium verticillioides</i>	36
Figura 6.1 Determinación del contenido de humedad de los granos de maíz.	38
Figura 6.2 Germinación de la semilla en toallas de papel húmedas enrolladas. ...	38
Figura 6.3 Desarrollo de patógenos fúngicos en grano de maíz.	39
Figura 6.4 Granos de maíz sembrados en cajas de Petri con medio PDA. a) granos de maíz a tiempo 0. b) granos de maíz a las 72 horas con presencia de hongos y germinación. c) granos de maíz a las 120 horas con una mayor proliferación de hongos y germinación.	40
Figura 6.5 Características macroscópicas de los hongos aislados y purificados de los granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) colonias de color blanco subsuperficial y una capa de color negro en la superficie. b) colonias de color verde con textura pulverulenta. c) colonia de color rosa-violeta en forma filamentosa.....	41
Figura 6.6 Características macroscópicas y microscópicas de cepa aislada de granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) colonias de color blanco subsuperficial y una capa de color negro en la superficie. b) conidióforos con cabezas conidiales y radiales de color marrón. c) conidios con crestas irregulares.	42
Figura 6.7 Características macroscópicas y microscópicas de cepa aislada de granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) micelio con coloración verde-azul, textura pulverulenta y bordes de color blanco. b) Conidióforo terverticilado, hialino y septado con cadenas largas de conidios pequeños.....	43
Figura 6.8 Características macroscópicas y microscópicas de cepa aislada de granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) micelio de color rosa-violeta, con forma filamentosa, y textura elevada y algodonosa de color blanco. b)	

estructuras características del género <i>Fusarium</i> llamadas esporodoquios. c) Microconidios hialinos unicelular y muy pocos bicelulares.....	44
Figura 6.9 Crecimiento micelial de <i>Aspergillus niger</i> en medio PDA a diferentes concentraciones de quitosano durante 5 días de incubación a 25±2 ° C.	46
Figura 6.10 Crecimiento micelial de <i>Penicillium funiculosum</i> en medio PDA a diferentes concentraciones de quitosano durante 8 días de incubación a 25±2 ° C.	47
Figura 6.11 Crecimiento micelial de <i>Fusarium verticillioides</i> en medio PDA a diferentes concentraciones de quitosano durante 9 días de incubación a 25±2 ° C.	48
Figura 6.12 Esporulación de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i> a los 5, 8 y 9 días incubación respectivamente a 25±2 ° C. Las letras en la barra indican la diferencia entre tratamientos en la misma especie (p<0.05).....	51
Figura 6.13 Germinación de esporas de <i>Aspergillus niger</i> sometidas a diferentes concentraciones de quitosano en medio PDA durante 9 horas. a) Control; b) Quitosano 0.5%; c) Quitosano 1.0%; d) Quitosano 1.5%; e) Quitosano 2.0%.	52
Figura 6.14 Germinación de esporas de <i>Penicillium funiculosum</i> sometidas a diferentes concentraciones de quitosano en medio PDA durante 12 horas. a) Control; b) Quitosano 0.5%; c) Quitosano 1.0%; d) Quitosano 1.5%; e) Quitosano 2.0%.....	53
Figura 6.15 Germinación de esporas de <i>Fusarium verticillioides</i> sometidas a diferentes concentraciones de quitosano en medio PDA durante 8 horas. a) Control; b) Quitosano 0.5%; c) Quitosano 1.0%; d) Quitosano 1.5%; e) Quitosano 2.0%.....	54
Figura 6.16 Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en granos de maíz tratados con quitosano al 2.0% almacenados a 25 °C y 12 °C.....	56
Figura 6.17 Crecimiento de <i>Penicillium funiculosum</i> en granos de maíz tratados con quitosano al 2.0% almacenados a 25 °C y 12 °C.....	57
Figura 6.18 Crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> en granos de maíz tratados con quitosano al 2.0% almacenados a 25 °C y 12 °C.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1 Determinación del contenido de humedad y la germinación de los granos de maíz almacenados.	39
Tabla 6.2 Porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i> a los 5, 8 y 9 días incubación respectivamente a 25 ± 2 ° C, con las diferentes concentraciones de quitosano.	49
Tabla 6.3 Porcentaje de germinación “ <i>in vitro</i> ” de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i> a las 9, 12 y 8 horas respectivamente, a diferentes concentraciones de quitosano.	54
Tabla 6.4 Porcentaje de incidencia y severidad para <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i> en grano de maíz con tratamiento de quitosano al 2.0% almacenado a dos tempertauras (12 y 25 °C).	59
Tabla 6.5 Parámetros de calidad de granos de maíz con aplicación de quitosano al 2.0% por inmersión y aspersion.	60

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays L.*) es una planta nativa de México que a nivel mundial se destina para la alimentación humana y animal. Es el alimento de mayor importancia en nuestro país debido a la superficie cultivada anualmente y su consumo per cápita, así como por su gran aporte nutricional con un alto contenido de carbohidratos y proteínas (SAGARPA, 2017b).

A pesar de que México figura entre los principales productores de maíz, el 26% del maíz para consumo humano corresponde a importaciones (FAOSTAT, 2013). La insuficiencia de maíz esta relacionada con factores adversos de naturaleza biótica (enfermedades, plagas, malezas) y abiótica (humedad, sequía, salinidad, altas temperaturas), además de un manejo inadecuado del maíz durante su cosecha, transporte y almacenamiento que afectan constantemente dicha producción (Hernández-delgado et al., 2007; Romanazzi, et al., 2016b). El mantenimiento de la calidad del maíz almacenado depende principalmente de la temperatura, humedad y presencia de plagas de almacén, que en condiciones no óptimas propician la proliferación de diferentes géneros de hongos y causan grandes pérdidas postcosecha (Martínez-Padrón et al., 2013; Tubbs et al., 2016).

Los principales géneros de hongos causantes de enfermedades en grano almacenado son *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* y más frecuentemente las especies del género *Aspergillus spp.*, que provocan daños fisiológicos tales como inhibición de la germinación, cambios de color, olores indeseables y la contaminación por la producción de micotoxinas (Dubale et al., 2014; Hernández-delgado et al., 2007; Muhammad et al., 2019; Niaz & Dawar, 2009). Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos que contaminan el maíz y otros cereales, tienen impacto importante sobre la salud de humanos y animales causan toxicidad organoespecífica, principalmente hepatotoxicidad, nefrotoxicidad e inmunotoxicidad, y poseen capacidad carcinogénica, genotóxica y teratogénica (Ostry et al., 2017; Pitt et al., 2012).

Los sistemas de control para combatir la proliferación de los hongos micotoxigénicos han involucrado métodos físicos, productos químicos y sistemas biológicos, sin embargo, ninguno de estos métodos ha podido ser efectivo para controlar las pérdidas en postcosecha. Durante las últimas décadas, los productos químicos como los fungicidas, han sido retirados del mercado, e incluso prohibido en muchos países debido a la toxicidad que provocan en humanos, medio ambiente, y el daño que provocan en la calidad del producto (Romanazzi, et al., 2016b; Romanazzi, et al., 2016c).

Existe un interés creciente en el uso de compuestos antifúngicos obtenidos de recursos naturales, principalmente obtenido de exoesqueletos de camarón, como es el quitosano. Este biopolímero es no tóxico, biodegradable, biocompatible y tiene un bajo costo de producción (Juarez-Morales et al., 2018a). Varios estudios han demostrado que el quitosano tiene propiedades antimicrobianas directas, actividad de formación de películas e inducción de los mecanismos de defensa del hospedero (Gutiérrez-Martínez et al., 2018, 2020; Jiménez-Mejía et al., 2018; López-Moya et al., 2019; Romanazzi et al., 2017, 2018).

De acuerdo a la importancia del maíz a nivel mundial y a nivel nacional, aunado a los factores bióticos y abióticos presentes en México, en la zona del Pacífico centro y en especial en el estado de Nayarit, es necesario conocer la microbiota de los granos de maíz, así como evaluar tecnologías no contaminantes para reducir la proliferación de los mismos, que pudieran ser potencialmente dañinos a la salud humana, motivos por los cuales se planteo el presente proyecto.

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del Maíz

El maíz (*Zea mays L.*) es originario del continente americano y es el cultivo más representativo de México por su importancia económica, social y cultural (SAGARPA, 2017b). En la actualidad, se considera que existen entre 220 y 300 razas de maíz (Vigouroux et al., 2008), en México se han identificado 59 razas nativas (Sánchez et al., 2000).

La planta de maíz crece en una gran variedad de regiones agroecológicas, la mejor producción se logra a temperaturas entre 21 y 27 °C. La exigencia en agua es alta, y aumenta a lo largo de la fase de crecimiento (Kato-Yamakake et al., 2009).

La mazorca es el fruto de la planta de maíz y es donde se encuentran los granos colocados en ejes paralelos alrededor de su eje vertical (UNAM, 2017).

2.1.1 Estructura del grano de maíz

El grano de maíz es un cariósipide de forma aplastada que contiene altos contenido de carbohidratos y proteínas. Se divide en cuatro estructuras físicas fundamentales: el pericarpio (cáscara o salvado), el endospermo, el germen (embrión) y el pedicelo (figura 2.1) (UNAM, 2017).

El pericarpio es la capa exterior que encierra al grano, el grosor es menor en la parte central y mayor en la base del mismo, representa aproximadamente del 5 al 6 % del peso total de grano. En el cereal maduro, el pericarpio tiene la función de impedir el ingreso de hongos y bacterias, esta constituido mayormente por fibra (hemicelulosa, celulosa y lignina) y esta dividido en 5 capas delgadas (UNAM, 2017).

El endospermo constituye la mayor proporción del grano con aproximadamente el 80-84% del peso total del grano. Está compuesto por una capa de aleurona que contiene proteínas, aceites, minerales y vitaminas. Las regiones harinosa y córnea se caracterizan por tener células con gránulos grande y gránulos pequeños de

almidón, respectivamente. Durante la etapa germinativa, es la fuente de energía a través de la reserva de almidón y proteínas (UNAM, 2017).

El germen se localiza en la parte inferior del grano y representa de un 8 al 12% del pesos total. Se caracteriza por su elevado contenido de lípidos siendo una fuente de ácido linoleico. Esta compuesto por el eje embrionario y el escutelo. El escutelo constituye cerca del 90% del germen y es donde se almacenan los nutrientes que utiliza el grano durante su germinación. Mientras que el eje embrionario esta conformando por una plúmula que desarrollará el tallo y una radícula que dará lugar a la raíz (Hernández, 2005; UNAM, 2017).

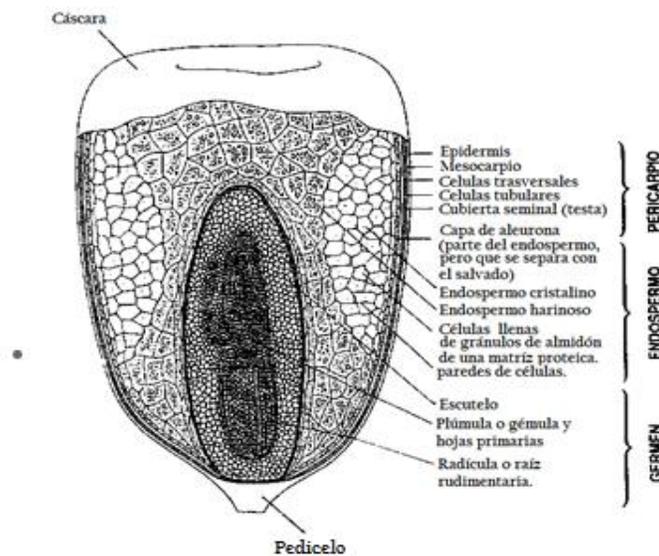


Figura 2.1 Estructura del grano de maíz. Fuente: UNAM, 2017.

2.2 Producción de maíz en México

El cultivo de maíz está ampliamente distribuido en el mundo. Los principales países productores de maíz son Estados Unidos (1°), China (2°) y Brasil (3°) (CIMA, 2020; FAOSTAT, 2018). México es un país importante como productor y consumidor, ocupa el 8° lugar en producción y es el segundo país importador. Este cereal es la

base alimenticia de millones de mexicanos, esto de acuerdo con la superficie cultivada (8 millones de hectáreas) y su consumo per cápita anual (196.4 kg) (Martínez-Padrón et al., 2013; Moreno-Limón et al., 2011; SAGARPA, 2017b; SIAP, 2018).

La producción de maíz en México se realiza en dos ciclos agrícolas, primavera-verano y otoño-invierno, que corresponde a la modalidad de temporal y riego, respectivamente. Durante el ciclo primavera-verano se produce más del 93% del total de la producción, mientras que en ciclo de otoño-invierno se produce el 7% de la producción (CIMA, 2020; SIAP, 2018).

El maíz blanco representa la mayor producción (86.94%), se destina principalmente al consumo humano. El maíz amarillo se destina a la industria o a la fabricación de alimentos balanceados para la producción pecuaria, la cual satisface solo el 24% de los requerimientos nacionales (CIMA, 2020; SAGARPA, 2017b).

En México se sembraron aproximadamente 7 millones de hectáreas de maíz blanco, con una producción alrededor de 24 mil millones de toneladas de maíz (SIAP, 2018). De acuerdo con SIAP en el 2018, se consumieron anualmente un poco más de 23 mil millones de toneladas de maíz blanco.

En el estado de Nayarit el cultivo de maíz blanco ocupó 27,298.50 hectáreas con una producción de 105,784.87 toneladas, donde el mayor rendimiento fue en el ciclo primavera-verano (SIAP, 2018). Los municipios que tuvieron una mayor producción fueron Compostela con 17, 682.64 tons, Santiago Ixcuintla con 14, 421.27 tons, y en tercer lugar San Pedro Lagunillas con 10, 964.70 tons (SIAP, 2018).

2.3 Almacenamiento de granos

El almacenamiento de los granos es parte del periodo de postcosecha el cual es un conjunto de procesos técnicos y operativos que involucra desde el acopio de los granos hasta su comercialización. Para ello los granos han de pasar por procesos de almacenamiento y conservación, lo cual garantiza la integridad de los granos para satisfacer la demanda del consumidor (SAGARPA et al., 2016).

El almacenamiento se puede diferenciar en dos grandes sectores para su conservación, uno es aquel que está destinado a almacenar grandes volúmenes de granos para abastecer a los centros urbanos, a la industria de alimentos; y para las importaciones y exportaciones, sus estructuras de almacenamiento, por lo general, están constituidas por silos y bodegas. El otro sector son los de nivel pequeño y mediano productor, debido a que ofrecen poca protección a los granos y por el desconocimiento casi total de las tecnologías para secar, beneficiar y proteger las cosechas de las plagas. (Gueye et al., 2012; Ortíz-Rosales et al., 2014; Waongo et al., 2013).

La complejidad inherente que involucra el acopio, transporte y distribución de productos del campo, tiene repercusiones en la producción, comercialización, distribución, consumo, crédito, información y políticas alimentarias que conllevan a sufrir en general grandes pérdidas postcosecha. En este sentido, el almacenamiento de productos agrícolas representa un eslabón estratégico en la cadena de valor agroalimentaria para cualquier economía. Se estima que a nivel internacional las pérdidas postcosecha en granos almacenados promedian entre el 5 y 10%. En países subdesarrollados estos porcentajes se incrementan hasta 30% (SAGARPA et al., 2016). En México, no existen estadísticas precisas de las pérdidas postcosecha en granos y semillas; se han estimado pérdidas de 20 a 30% en el centro del país y de hasta 60% en clima tropical, estas oscilaciones en los porcentajes varían de región a región y entre ciclos agrícolas (Ortíz-Rosales et al., 2014; SAGARPA, 2017a; SAGARPA et al., 2016).

2.4 Problemas durante el almacenamiento de granos

Los granos almacenados constituyen un agroecosistema complejo que están expuestos a sufrir daños por la presencia e interacciones de estrés abiótico (luz, temperatura, humedad) y agentes bióticos (insectos, hongos, roedores) (Romanazzi et al., 2016b). Los daños que causan los agentes bióticos pueden ser directos e indirectos. Los directos consisten en alimentarse propiamente de la semilla, contaminarlas con sus desechos o bajar el porcentaje de germinación; y los

indirectos son elevar la temperatura, diseminar las esporas de los hongos e incluso atacar y dañar el material de empaque y estructuras de las bodegas. A nivel mundial, después de los insectos, los hongos son los principales causantes de la reducción de la calidad de los cereales almacenados, los daños que producen los hongos de almacén suelen ser irreversibles (Niamketchi et al., 2015; SAGARPA et al., 2016).

En relación a los agentes bióticos, los de mayor importancia son la humedad y temperatura. La humedad en la conservación de la viabilidad del grano radica, a nivel fisiológico, en el papel que tiene el agua en su actividad. El nivel de agua en el grano por arriba del 15% y la humedad relativa superior al 65% activan el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas con liberación de calor y agua causado por el proceso respiratorio del grano. Esto reduce su capacidad nutrimental, así como propicia la presencia y desarrollo de agentes bióticos como insectos y hongos. Sin embargo, la humedad del grano esta fuertemente relacionada con los hongos de almacén (Dubale et al., 2014; Tubbs et al., 2016). Por otra parte, la alta temperatura acelera el deterioro fisiológico del grano y está fuertemente influenciado en el desarrollo de insectos, ya que interviene de manera directa en su metabolismo y fisiología de estos (SAGARPA et al., 2016; Tubbs et al., 2016).

Otras causas que se atribuyen a los problemas de almacén y conllevan a las pérdidas postcosecha son la heterogeneidad del almacenamiento, acondicionamiento deficiente de los granos durante los procesos de pre-limpieza, limpieza de los granos y personal carente de capacitación (Ortíz-Rosales et al., 2014; SAGARPA et al., 2016). Entre principales afectaciones se encuentra la reducción del poder germinativo, ennegrecimiento total o parcial del grano, calentamiento y olores desagradables, cambios bioquímicos degenerativos, pérdida de peso y la presencia de micotoxinas (Niamketchi et al., 2015; SAGARPA et al., 2016).

2.5 Hongos presentes en la etapa de almacenamiento de maíz

Los hongos que atacan a los granos de maíz se dividen en hongos de campo y almacén. Los hongos de campo requieren altos contenidos de humedad para desarrollarse (de 20 a 21% en base húmeda); invaden y atacan a los granos antes de la cosecha, afectan su apariencia y calidad. Los géneros *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Helminthosporium spp.* y *Fusarium spp.* han sido relacionados con la contaminación de campo en diversos estudios (Romanazzi, et al., 2016b; SAGARPA, 2017b).

En cambio, los hongos de almacén infectan granos cuyos contenidos de humedad están en equilibrio con una humedad relativa de entre 65-90% y un rango de temperatura amplio de 0-45 °C. El factor más importante en su desarrollo es la humedad interna del grano, la cual debe estar entre el 15-20%, una diferencia de 1% puede determinar que una especie sea la predominante y la velocidad del principio del daño en el grano (Moreno-Limón et al., 2011). Otros factores que propician el desarrollo de estos hongos son: la duración del tiempo de almacenamiento, daño físico del grano, actividad de insectos, roedores y acaros, y la presencia de materias extrañas (componentes orgánicos como tallos y componentes inorgánicos como piedras y polvo) y suciedad (impurezas de origen animal, insectos muertos) (FAO & OMS, 2007). Las fuentes de inóculo son esporas en latencia o micelio debajo del pericarpio, que en condiciones favorables aumentan considerablemente en pocos días (Niamketchi et al., 2015; SAGARPA et al., 2016). Las especies más representativas de la contaminación en almacén son *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* (Muhammad et al., 2019). Estos dos géneros causan las pérdidas económicas y deterioro de los alimentos más altos (Pitt & Hocking, 2009).

2.5.1 *Aspergillus spp.*

La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos, su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Algunas especies tienen interés por su importancia industrial, por ser agentes de biodeterioro, producir micotoxinas y su patogenicidad

para animales y vegetales (Martínez-Padrón et al., 2013; Pitt & Hocking, 2009). La principal micotoxina que producen son las aflatoxinas y ocratoxinas, entre otras como ácido ciclopiazónico (Frisvad et al., 2019; Pitt et al., 2012). Este género presenta una afinidad especial por frutos de nuez y semillas oleaginosas. Los cultivos de maíz, cacahuates y semillas de algodón se encuentran habitualmente contaminadas por estas especies (Pitt & Hocking, 2009; Warham et al., 2003).

Las especies de *Aspergillus spp.* se desarrollan en climas cálidos (Martínez-Padrón et al., 2013) y una actividad de agua baja, sin embargo, muestran abundante esporulación a una actividad de agua igual a 0.99. (Giorni et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009). Para su crecimiento requiere de una humedad relativa entre el 70-90%, contenido de agua en la semilla de 15-20% y un rango de temperatura amplio de 0-45 °C (Pitt & Hocking, 2009). Este género compite con las especies de *Penicillium* y *Fusarium* por el dominio entre la flora fúngica del mundo (Giorni et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

Las colonias de este género se desarrollan de manera rápida y presentan diferentes tonalidades como blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas (Pitt et al., 2012). Las especies de *Aspergillus* se caracterizan por formar conidióforos que poseen tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula, de paredes gruesas) y célula pie (sección final, que une el conidióforo con el micelio). Las vesículas son generalmente esféricas pero en algunas especies suelen ser alargadas y pequeñas. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas fiálides (Figura 2.2). En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células llamadas métulas, que están acomodados de manera simultánea sobre la vesícula. La vesícula, métula, las fiálides, y los conidios constituyen la cabeza conidial. Los conidios pueden formar columnas compactas, (cabeza conidial columnar) o divergente (cabeza conidial radial). Otra característica de la mayoría de las especies de *Aspergillus* es que los estípites no están septados (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).



Figura 2.2 Características microscópicas de *Aspergillus sp.* (Fuente: Pitt & Hocking, 2009).

2.5.2 *Penicillium spp.*

El género *Penicillium* son hongos ubicuos, oportunistas y saprófitos. Nutricionalmente pueden proliferar en diversos ambientes y en una amplia rango de temperatura y pH. Algunas especies se caracterizan por ser patógenos destructivos en la fruta (*P. digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*) o crecer por debajo de 0.80 aw (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*). Muchas especies son psicrótrofos, capaces de causar deterioro en los alimentos a temperatura de refrigeración (Pitt & Hocking, 2009; Yadav et al., 2018). La importancia de estos hongos en la alimentación humana y animal se debe a que, además de causar deterioro, producen micotoxinas, con excepción de las especies de *P. digitatum*, *P. italicum*, *P. solitum* y *P. ulaiense*. Las micotoxinas de mayor importancia en el subgénero *Penicillium* son ácido ciclopiazónico, patulina y ocratoxina (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

Las especies de *Penicillium* forman colonias que crecen generalmente de manera rápida, están formadas por densas agrupaciones de conidióforos y la mayoría presenten coloraciones verdosas (Pitt et al., 2012). La textura de la colonia puede ser de aspecto velutina, aterciopelada, lanosa, funiculosa, fasciculada o sinematosa, y depende de la disposición de los conidióforos. La estructura

reproductiva característica de *Penicillium* es un conidióforo con un estípote relativamente delicado y distintivo que termina en un penicillus (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

El penicillus consiste esencialmente en un grupo definido de fiálides donde se encuentran los conidios en cadena. Las fiálides se unen a un estípote directamente o a través de una o más etapas de ramificación. Las ramas son generalmente de diámetro similar a los estípotes (Pitt & Hocking, 2009). La forma del penicillus determina la división taxonómica primaria del género en subgéneros. Para determinar el subgénero al que pertenece un aislado de *Penicillium*, se cuenta el número de puntos de ramificación entre el fiálide (o cadena conidial) y el estípote, hacia abajo del eje principal del penicillus. Cuando solo hay un punto de ramificación se llaman monoverticilados (Figura 2.3a), cuando existen dos puntos de ramificación se llaman biverticilados (Figura 2.3b), y en una de las formas más complejas con tres puntos de ramificación se llaman terverticilados (Figura 2.3c) (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

Los terverticilados son especies del subgénero de *penicillium* que están asociadas al deterioro de los alimentos, son de ocurrencia universal en cereales, alimentos refrigerados y muchos otros ambientes (Akonda et al., 2016; Muhammad et al., 2019).

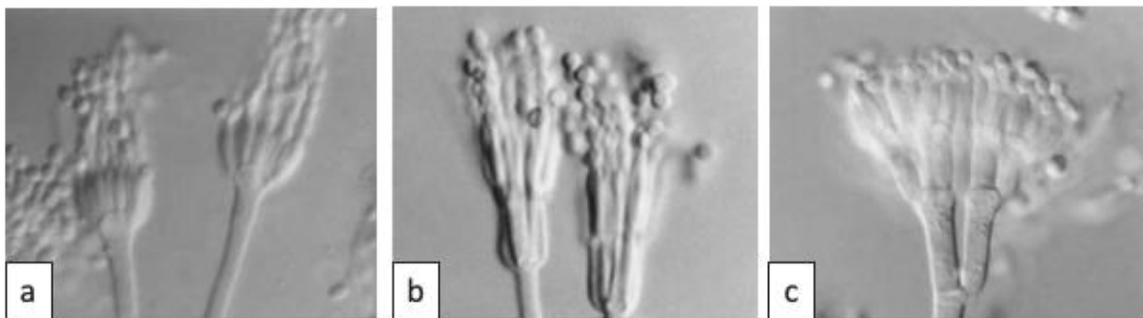


Figura 2.3 Tipos de penicillus en especies de *Penicillium* (a) monoverticilados, (b) biverticilados y (c) terverticilados (Fuente: Pitt & Hocking, 2009).

2.5.3 *Fusarium spp.*

El género *Fusarium* son hongos filamentosos que están ampliamente distribuidos en suelos, particularmente en suelos cultivados, y son activos en la descomposición de materiales vegetales celulósicos, causando en plantas una amplia gama de enfermedades como marchitez vascular, pudriciones de raíz y tallo, tizón pre y postcosecha y muchos otros. *Fusarium spp.* es una causa importante de pudrición de almacenamiento de cereales, frutas y verduras, que generalmente invaden antes de la cosecha y es uno de los tres principales géneros de hongos que producen micotoxinas, como son los tricotecenos, la zearalenona, el deoxinivalenol y las fumonisinas (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009). Estas últimas se han visto asociadas con el cáncer de esófago en humanos. Una característica importante de este género es que una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies del mismo, y que una misma especie puede producir diferentes micotoxinas a la vez (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

Las características que definen a este género son la producción de conidios hialinos, curvados, septados y fusiformes, llamados macroconidios (Figura 2.4). Los macroconidios generalmente tienen al menos 3 septos, con una célula apical diferenciada que puede ser puntiaguda, redondeada, enganchada o filamentosa, y una célula basal que puede tener forma de pie. Generalmente exhiben cierto grado de curvatura, los lados convexos y cóncavos se denominan lados dorsal y ventral, respectivamente. Los macroconidios de *Fusarium* pueden producirse en pústulas discretas, llamadas esporodoquios o bien pionotes. Muchas especies de *Fusarium* también producen conidios unicelulares más pequeños, llamados microconidios (Figura 2.4), que generalmente se producen en el micelio aéreo y su forma puede ser muy importante en la identificación de este género. La mayoría de las especies que producen microconidios forman un solo tipo, la más común es elipsoidal (Pitt & Hocking, 2009; Torre-hernández et al., 2014).

Las colonias de *Fusarium* generalmente crecen rápido y consisten en un micelio aéreo algodonoso que puede ser pálido o de colores brillantes en tono rosa, rojo,

marrón y violeta (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009; Torre-hernández et al., 2014).

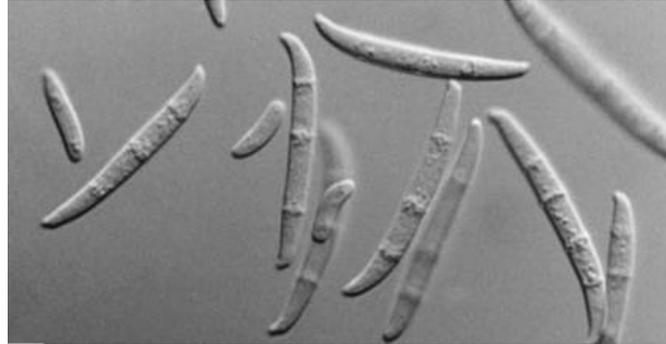


Figura 2.4 Macroconidios y microconidios de *Fusarium sp.* (Fuente: Pitt et al., 2009).

2.6 Tratamientos para el control de hongos

Los sistemas de control para combatir hongos pueden dividirse generalmente en remedación previa a la cosecha para controlar la producción de hongos y remedación posterior a la cosecha de productos contaminados. Existen limitaciones de las prácticas previas a las cosechas, en relación al uso de fungicidas, debido a la toxicidad en humanos y animales así como inducir el aumento de producción de micotoxinas (Romanazzi, et al., 2016a), por lo cual se ha iniciado la búsqueda de métodos de control de origen biológico.

Los tratamientos de remedación posterior a la cosecha presentan enfoques físicos, químicos y biológicos, los cuales pueden ser no muy eficientes y económicos, incluso no llevarse a gran escala para la aplicación en el mundo real (He & Zhou, 2010; Schmidt-Heydt et al., 2013; Zhu et al., 2016).

Los métodos físicos suelen ser efectivos para controlar la descomposición del grano después de la cosecha debido a que pueden inducir varios cambios en los tejidos del huésped sin dejar residuos dañinos en el producto, provocar mínimas alteraciones organolépticas e incrementar la resistencia al estrés abiótico y biótico

(Romanazzi, et al., 2016b; Sanzani et al., 2009; Usall et al., 2016). Algunos ejemplos de estos son el secado rápido (Milikovic, et al 2010), conservación a temperatura extremas (alta y baja) (Romanazzi et al., 2017; Romanazzi, et al., 2016a), tratamientos de luz ultravioleta, hipobáricos e hiperbáricos; estos tratamientos favorecen directamente el control de niveles de micotoxinas durante la conservación (Silva-Aguayo, 2002).

Los métodos químicos hoy en día han sido objeto de estudio debido a los problemas ambientales que ocasionan. Los métodos más usados son fungicidas (solamente se pueden usar en semillas destinadas para la agricultura pues son tóxicos para los animales y el hombre), ácidos orgánicos, soluciones alcohólicas (Gabler et al., 2005; López et al., 2006), aceites esenciales, en otros, por cual se ha iniciado la búsqueda de métodos de control de origen biológico.

Recientemente, se ha observado un aumento en la cantidad de productos disponibles y registrados que promueven la defensa de las plantas; estos contienen organismos vivos (agentes de biocontrol) o inductores químicos de plantas como glutatión, oligosacáridos, laminarina y quitosano, que se sabe que inhiben la descomposición posterior a la cosecha. Por lo general, tienen efectos inhibitorios duales sobre la enfermedad debido a la inhibición directa de los patógenos y la inducción de mecanismos de defensa en los tejidos del hospedero (Romanazzi et al., 2017).

2.7 Quitosano como control biológico

El quitosano es un biopolímero que se ha convertido en una alternativa efectiva para el tratamiento y prevención de algunas de las principales enfermedades fúngicas en periodos postcosecha debido a los diferentes mecanismos de acción como fungicida natural (Gutiérrez-Martínez et al., 2020; Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Khan & Doohan, 2009; Romanazzi et al., 2016b). Se ha demostrado que la aplicación de quitosano a cereales mejora sus parámetros de calidad como una mayor germinación a pesar de ser sometidas las semillas a estrés, además del

biocontrol contra fitopatógenos de cereales que se encuentran en almacenamiento (de Oliveira Pedro et al., 2013; Guan et al., 2009; Khan & Doohan, 2009; Lizárraga-Paulín et al., 2011a, 2011b, 2013; Sharif et al., 2018).

El quitosano es un polímero lineal biodegradable, no tóxico y bioactivo, que ha demostrado efectos fungicidas y fungiestáticos contra determinados patógenos de plantas y alimentos e inductor de mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Bautista-Baños et al., 2006; Juárez-Morales et al., 2018b; López-Moya et al., 2019); es obtenido a partir de la desacetilación de la quitina (Figura 2.5), que se encuentra en el exoesqueleto de los insectos y crustáceos como camarones, cangrejos y langostas; y en la pared celular de algunos hongos (Ifuku, 2014; Rodríguez-Guzmán et al., 2019).

La forma acetilada de quitosano corresponde al N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa y la forma desacetilada corresponde al 2-amino-2desoxi-D-glucosa con enlaces beta-(1-4). El grado de desacetilación y el peso molecular son parámetros cruciales para la bioactividad del quitosano (Dewi & Nur, 2018; López-Moya et al., 2019). Su grado de desacetilación usualmente es superior al 90% y el número de subunidades N-acetilglucosamina y glucosamina en la molécula define su peso molecular (Dewi & Nur, 2018; Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Romanazzi et al., 2018). Su estructura consta de tres anillos con tres grupos funcionales, grupo hidroxilo primario y secundario, y grupo amino (Ifuku, 2014). El quitosano tiene una pK_a de 6.3, por tanto, es catiónico a valores de pH mas bajos debido a la protonación de sus grupos aminos. La carga positiva en el quitosano le confiere propiedades biológicas, capacidad de quelación, antioxidante y adsorción, así como el efecto filmogénico, entre otros, y debido a su carácter de solubilidad tiene un amplio campo de aplicación en agricultura, medicina, industria alimentaria, etc. (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Romanazzi et al., 2018; Sharif et al., 2018).

Este biopolímero, se ha convertido en una alternativa efectiva para el tratamiento y prevención de algunas de las principales enfermedades fúngicas en periodos postcosecha debido a los diferentes mecanismos de acción como fungicida natural

(Gutiérrez-Martínez et al., 2020; Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Khan & Doohan, 2009; Romanazzi et al., 2016b).

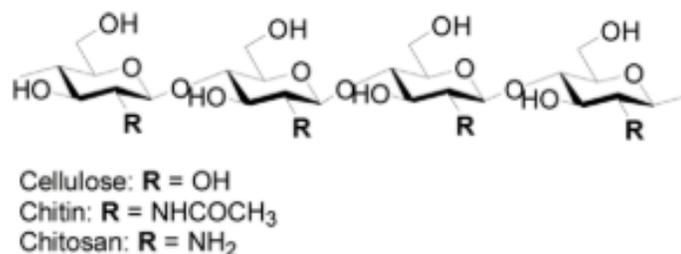


Figura 2.5 Estructura molecular de la celulosa, quitina y quitosano (Fuente: Ifuku, 2014).

2.7.1 Mecanismo de acción del quitosano

El quitosano tiene múltiples mecanismos de acción, con propiedades antimicrobianas directas, actividades de formación de películas y inducción de los mecanismos de defensa del hospedero (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; López-Moya et al., 2019; Sharif et al., 2018; Zhang et al., 2011).

2.7.1.1 Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana del quitosano contra una amplia gama de fitopatógenos es una de las principales propiedades; y esta va a depender de la concentración que se aplique (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Romanazzi et al., 2018). Se ha comprobado que el quitosano es capaz de afectar la germinación y dañar las membranas plasmáticas de esporas, hifas y micelio de hongos patógenos en postcosecha de importancia económica, de modo que la interacción electrostática entre la cadena catiónica y los residuos cargados negativamente de macromoléculas expuestas en la superficie de la célula fúngica provocan una permeabilización de la pared celular y membrana plasmática, que conduce a la fuga de electrolitos intracelulares y otros constituyentes causando la muerte del patógeno (López-Moya et al., 2019; Romanazzi et al., 2018; Sharif et al., 2018). Incluso cuando se aplica un quitosano de bajo peso molecular es capaz de penetrar en el

núcleo de la célula interactuando con el ADN e interfiriendo con la síntesis de RNA mensajero que afecta la síntesis de proteínas y la inhibición de la acción de muchas enzimas (celulasa, cutinasa, pectinmetilesterasa) impidiendo el crecimiento del patógeno (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Zhang et al., 2011).

2.7.1.2 Formación de películas

El quitosano al ser aplicado en la superficie de algún producto vegetal forma un recubrimiento, el cual produce un barrera para el intercambio de gases y una respiración reducida, y en caso de las frutas, retrasa su maduración (Romanazzi et al., 2018). Así mismo esta película provoca la limitación de nutrientes para el patógeno y causa la modificación de la arquitectura de la pared celular (baja ramificación de glucanos) lo que afecta en el crecimiento del hongo (López-Moya et al., 2019)

2.7.1.3 Inducción de los mecanimos de defensa

El quitosano al tener contacto con la superficie del hospedero induce ligeramente una respuesta inmune que causa la acumulación de hormonas (auxinas, fitoalexinas) y proteínas-PR (beta-1,3,-glucanasas, quitinasas, entre otras) esto provoca una cascada de señalización en el interior de la célula con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y hormonas como ácido jasmónico y ácido saicílico (López-Moya et al., 2019). Debido a que el quitosano no tiene receptores específicos en el hospedero no se activa eficazmente la respuesta inmune (Yin et al., 2016). Este mecanismo inductor se puede simular a una respuesta por estrés abiótico o biótico, en este sentido el hospedero puede quedar protegido contra infecciones causadas por importantes hongos como *Fusarium spp.* (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Romanazzi et al., 2018).

CAPÍTULO 3 JUSTIFICACIÓN

El maíz es el principal producto agrícola en México y constituye la base alimentaria de los mexicanos. Dado el alto consumo del maíz en la dieta y la insuficiencia a nivel nacional, México es uno de los principales países importadores de este grano. Su producción se ve afectada en campo y durante el almacenamiento por especies de hongos de los géneros *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium spp.* que provocan daño en las características organolépticas, nutricionales y la presencia de micotoxinas, lo que conlleva a pérdidas económicas y efectos perjudiciales a la salud de animales y humanos. Los tratamientos para controlar la proliferación de los hongos son principalmente de naturaleza química, capaces de causar toxicidad aguda y crónica, algunos son persistentes en el medio ambiente y se ha reportado que causan resistencia al patógeno. Por lo anterior, es relevante contar con alternativas ecológicas que no causen daño a la salud a través de la alimentación y que favorezcan la preservación del maíz durante su almacenamiento.

Dada la importancia del maíz y su conservación, el presente trabajo evaluó la eficacia de la propiedad antifúngica del quitosano comercial de alto peso molecular en un modelo de maíz *in vitro* e *in vivo* frente a la proliferación de hongos micotoxigénicos, con el fin de mejorar el control y alargar la conservación del grano de maíz durante su almacenamiento en relación al crecimiento de hongos potencialmente productores de micotoxinas simulando condiciones de almacenamiento.

CAPÍTULO 4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de quitosano comercial en el control de hongos patógenos productores potenciales de micotoxinas en granos de maíz durante su almacenamiento.

4.2 Objetivos Específicos

- Aislar, purificar e identificar los hongos productores potenciales de micotoxinas establecidos en los granos de maíz almacenados.
- Evaluar el efecto del quitosano de alto peso molecular (QAPM) comercial a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %, sobre el desarrollo de los hongos productores de micotoxinas mediante pruebas “*in vitro*”.
- Analizar mediante pruebas “*in vivo*”, el efecto de QAPM comercial en el control de los hongos productores de micotoxinas inoculados en granos de maíz, mediante pruebas de severidad e incidencia.
- Evaluar sistemas de aplicación de QCAPM y su efecto en la calidad del grano de maíz.

CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en 3 etapas. En la primera etapa, se evaluó la calidad de las muestras de granos de maíz mediante el contenido de humedad y el porcentaje de germinación. Por otro lado, se llevó a cabo el aislamiento, purificación e identificación a nivel de género de los hongos patógenos productores potenciales de micotoxinas en granos de maíz mediante características macro y microscópicas. En la segunda etapa se llevó a cabo la aplicación de quitosano como agente de control biológico y se evaluó la efectividad de las diferentes concentraciones mediante pruebas “*in vitro*” (inhibición del micelio, cuantificación de esporas y porcentaje de germinación). En la tercera etapa se realizaron las pruebas “*in vivo*”, donde se aplicaron los mejores tratamientos de las pruebas “*in vitro*”. El maíz fue inoculado con esporas de los hongos identificados en la primera etapa. Se realizaron pruebas de incidencia y severidad, así como pruebas de calidad para evaluar el control de estos hongos patógenos y que la calidad del grano de maíz no sea afectada.

5.1 PRIMERA ETAPA

5.1.1 Obtención de granos de maíz

Las muestras de maíz fueron proporcionadas por la compañía global de alimentos GRUMA, de la marca MASECA ubicada en la Ciudad de Acaponeta Nayarit. Se evaluaron los parámetros de calidad de las muestras de maíz mediante el contenido de humedad y el porcentaje de germinación.

5.1.2 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad del grano se usó el método de secado en estufa (Zumbado, 2002), que consistió en pesar las cajas de aluminio, después se colocaron 5 gramos de granos de maíz. Las cajas fueron tapadas e inmediatamente se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente, las cajas fueron destapadas y las tapas se colocaron debajo de su respectiva caja para ser introducidas a la

estufa y se mantuvieron a una temperatura de 130 ° C durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se procedió a tapar las cajas dentro de la estufa. Las cajas fueron colocadas en un desecador que contenía sílica gel, para permitir su enfriamiento sin que ganará humedad. Posteriormente se pesaron en una balanza analítica. El porcentaje del contenido de humedad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde:

P1 = Peso en gramos de la caja.

P2 = Peso en gramos de la caja y los granos húmedos.

P3 = Peso en gramos de la caja y de los granos después del secado en la estufa.

5.1.3 Prueba de germinación de la semilla en toallas de papel enrolladas

La germinación se realizó en toallas de papel enrolladas según el manual de laboratorio *Ensayos para la semilla de maíz y trigo* (CIMMYT) (Warham et al., 2003). Se tomaron 200 semillas de cada unidad experimental (4 repeticiones de 50 semillas). Se colocó cada semilla separada por espacios uniformes a la mitad de las toallas, el extremo de la radícula hacia la parte inferior de la toalla y con el lado del embrión hacia arriba. Posteriormente las toallas se doblaron a la mitad, se cubrieron por completo, se enrollaron y se introdujeron en bolsas de plástico individual abiertas en la parte superior. Las bolsas se mantuvieron en incubación a 25±2 ° C durante 7 días.

La germinación se determinó según el manual de Laboratorio CIMMYT, donde se realizó el conteo de plántulas normales, plántulas anormales y semillas no germinadas en cada repetición (Warham et al., 2003).

Las plantulas normales tuvieron las siguientes características: 2.5 cm de crecimiento de la plúmula y radical; con 2 o 3 raíces. Como plántulas anormales y sin germinar se consideraron aquellas que no contaron con las características antes mencionadas (Warham et al., 2003).

5.1.4 Aislamiento, purificación e identificación morfológica de hongos a nivel de género

Para aislar e identificar la micoflora de los granos se emplearon 150 granos. Los granos fueron esterilizados en su superficie, el procedimiento consistió en sumergir las semillas durante 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, se enjuagó con agua estéril y se colocaron en papel filtro estéril para eliminar el excedente de agua. Posteriormente, diez semillas se sembraron en medio papa dextrosa agar (PDA). Las cajas de Petri se incubaron a 25 °C por un periodo de 72 h en oscuridad (Ahmad et al., 2016). Una vez detectada la presencia de micelio se realizó la purificación a partir de las colonias que se presentaron en la periferia del grano. Las esporas aisladas fueron resembradas en medio de maíz y se incubaron a 25±2 °C durante 6 días hasta obtener un solo tipo de morfología por placa (Akonda et al., 2016).

La identificación del hongo se basó en el análisis de las características macroscópicas y microscópicas de la colonia. Para el análisis microscópico, la muestra fue teñida con colorante azul de metileno. El micelio y las esporas se observaron bajo objetivos 40X y 100X en un microscopio óptico marca Motic BA300. Para la determinación del género, con la ayuda de claves taxónomicas, se comprobaron las características externas, estructuras reproductoras y conidios (Mohamed et al., 2020; Pitt & Hocking, 2009).

5.1.5 Identificación de hongos a nivel de especie

La identificación se llevó a cabo por técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación, el protocolo utilizado fue previamente

estandarizado en el colegio de postgraduados (COLPOS) en el estado de México (Fuentes-Aragón et al., 2020; Juárez-Vázquez et al., 2019). Se utilizó la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADNr genómico con los cebadores ITS1 e ITS4 para *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*; y el gen del factor de elongación de la traducción-1alfa (TEF-1 α) con los cebadores EF1 Y EF2 para *Fusarium spp.* Para el análisis del árbol filogenético se utilizó la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) en la base de datos NCBI.

5.1.6 Preparación y aplicación de quitosano

Se utilizó quitosano de alto peso molecular de grado comercial y se preparó según la metodología descrita por Ferrochio et al., (2014) con algunas modificaciones. Las soluciones de quitosano se prepararon a concentraciones de 0 (control), 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% (w/v) en agua destilada, se agregó de 10 a 15 mL de vinagre, dependiendo de la concentración de quitosano, por cada 100 mL. Las soluciones se agitaron por 24 h a temperatura ambiente y después se ajustaron a un pH de 5.6 con una solución de NaOH al 1 N valorada previamente. Por último se añadió 0.1 mL de Tween 80 por cada 100 mL y se esterilizaron en autoclave. Una vez esterilizadas las soluciones de quitosano se vaciaron a cajas de Petri con medio PDA y se dejaron gelificar.

5.2 SEGUNDA ETAPA (Pruebas “*in vitro*”)

Una vez aplicados los tratamientos de quitosano se evaluó su efecto antifúngico mediante los siguientes parámetros:

5.2.1 Determinación del crecimiento micelial

Se tomaron discos de 8 mm de diámetro del micelio proveniente de la periferia de la colonia de los hongos ya identificados (4 días de crecimiento), para los tres hongos identificados. El disco se colocó en el centro de la caja Petri con los

diferentes tratamientos y medio PDA. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 ± 2 °C y el crecimiento micelial de la colonia se midió cada 24 horas (hasta que el hongo cubrió la superficie de la caja control) para los tres hongos (Saharan et al., 2013). Se utilizó el software ImageJ 1.52p (Imagen Processing and Analysis in Java, 2019). Se realizaron tres replicas para cada hongo.

5.2.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se utilizó la ecuación 2 (Mohamed et al., 2020).

Inhibición del crecimiento micelial (%) =

$$\frac{G_0 - G_t}{G_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

En donde:

G_0 = Diámetro promedio (mm) de las colonias del hongo bajo el tratamiento control.

G_t = Diámetro promedio (mm) de las colonias del hongo bajo el tratamiento de quitosano.

5.2.3 Cuantificación de esporas

Una vez que la caja de Petri estaba cubierta por completo de micelio, considerando los tres hongos diferentes, se preparó una solución de esporas para calcular el número de esporas por placa de Petri. Se añadieron 10 mL de agua estéril y 0.1 mL de tween 80 en cada caja de Petri, se raspó la superficie con una varilla estéril para posteriormente filtrar a través de una gasa estéril sobre un embudo de vidrio, se depositaron las suspensiones en tubos de ensaye (Godana et al., 2020; Parra et al., 2004). Se realizaron diluciones 1:10 en los tres hongos.

Para el conteo de esporas se tomaron 10 μ L y se cargo en una cámara de Neubauer. La cuenta se llevó a cabo en un microscopio óptico marca Motic BA300 bajo el

objetivo 40x. Los resultados fueron expresando en número de esporas/mL. Para calcular el número de esporas/mL se utilizó la ecuación 3 (Aquiahuatl et al., 2010).

$$\frac{\text{Cel}}{\text{mL}} = \text{NPC} * 25 * 10000 * \text{FD} \quad (\text{Ec. 3})$$

En donde:

NPC: Suma total de células contadas en 5 cuadrados

25: Numero de cuadrados en cada cámara

10⁴: Factor para pasar el número de células en el cuadrado central (volumen= 0.1mm³ = 0.1 µL) a número de células por mL (1000mm³ = 1000µL) 10N

FD: Factor de dilución

5.2.4 Porcentaje de germinación

Previamente se determinó las horas de incubación para cada hongo. Las suspensiones de esporas se llevaron a una concentración de 1X10⁶ esporas/mL. Se prepararon discos de medio PDA (20 mm de diámetro) con los diferentes tratamientos (quitosano al 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%). Estos discos se inocularon con 100 µL de las suspensiones de esporas, se colocaron en portaobjetos y se incubaron a 25±2 °C (Gutiérrez-Alonso et al., 2001).

El conteo de esporas germinadas se realizó considerando las diferentes especies fúngicas, y se observaron al microscopio óptico (Motic BA300) bajo el objetivo 40X. Las esporas se consideraron germinadas cuando la longitud del tubo germinativo fue el doble del diámetro de la misma.

Para calcular el porcentaje de germinación se utilizó la ecuación 4.

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{No. de esporas germinadas}}{\text{No. de esporas totales}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

5.2.5 Diseño experimental y análisis estadístico de los ensayos “*in vitro*”

Para el análisis de datos se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado.

Donde:

FACTOR	NIVELES				
Concentración de quitosano	Control	0.5	1.0	1.5	2.0

Bloques: Días

Variables de respuesta: Crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico paquete STATISTICA 12. El experimento se realizó por triplicado en dos experimentos independientes.

5.3 TERCERA ETAPA (Pruebas “*in vivo*”)

5.3.1 Preparación y aplicación de quitosano a granos de maíz

Para la preparación de la solución más efectiva en las pruebas “*in vitro*” se siguió la metodología descrita por Lizárraga-Paulín et al., (2013) con algunas modificaciones, donde se utilizó un biopolímero de alto peso molecular de grado comercial a una concentración del 2% (20 g / L) que se disolvió en agua destilada y vinagre (Member 's Mark, México), 15 mL por cada 100 mL. La solución se agitó por 24 h a temperatura ambiente y después se ajustó a un pH de 5.6 con una solución de NaOH al 1 N valorada previamente. Por último se añadió 0.1 mL de Tween 80 por cada 100 mL; y se esterilizó en autoclave.

La aplicación del tratamiento se realizó por inmersión, se utilizaron 110 granos previamente desinfectados. Los granos de maíz se sumergieron unos minutos en la solución de quitosano al 2% y se dejó secar durante tres horas a temperatura ambiente para contrarrestar los efectos del exceso de humedad (Lizárraga-Paulín et al., 2011a). Todo este proceso se llevó a cabo en la campana de flujo laminar. Los granos que se sumergieron en agua destilada estéril se utilizaron como control.

5.3.2 Inoculación del patógeno a los granos de maíz

Previamente se realizaron suspensiones de esporas para cada hongo como se describe en el punto 5.2.3. Una vez que los granos se encontraban secos con el tratamiento, estos se colocaron en cajas de Petri estéril (5 granos por caja), y se inoculó al patógeno mediante aspersion con la suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) con ayuda de un atomizador manual hasta escurrir y se almacenaron.

Los granos se mantuvieron a dos temperaturas, 12° C y 25° C, se evaluó el desarrollo de hongos en el grano mediante la incidencia y severidad.

5.3.3 Porcentaje de incidencia y de severidad

Los granos que tuvieron crecimiento micelial se cuantificaron como granos contaminados. La incidencia se evaluó utilizando la ecuación 5 (Ahmad et al., 2016).

$$\text{Infección del grano de maíz (\%)} = \frac{\text{No. de granos contaminados}}{\text{No. total de granos}} \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

La severidad se determinó mediante una escala diagramática (Pabón-Baquero et al., 2015), donde se utilizó una imagen del grano infectado por los tres diferentes hongos, dividido en 5 partes (Figura 5.1).

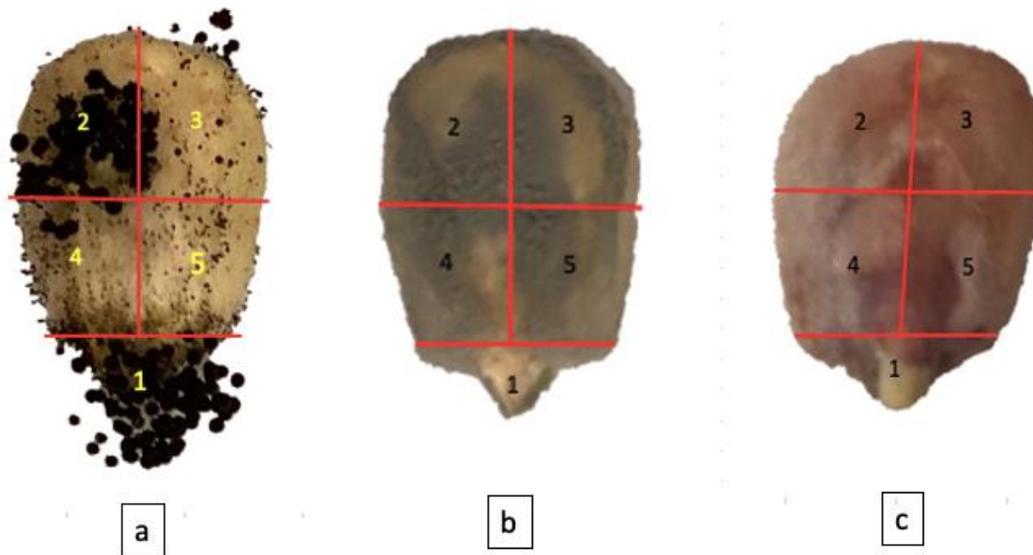


Figura 5.1 Representación de escala diagramática del grano infectado por a) *Aspergillus niger*, b) *Penicillium funiculosum* y c) *Fusarium verticillioides*.

En donde:

- 1= 0-20%
- 2= 21-40%
- 3= 41-60%
- 4= 61-80%
- 5= 81-100%.

5.3.4 Parámetros de calidad de los granos de maíz con aplicación de quitosano

Se determinó el contenido de humedad y se realizó la prueba de germinación de la semilla en toallas de papel húmedas para evaluar los granos de maíz después de la aplicación del quitosano por inmersión y aspersion, siguiendo la metodología antes descrita en los puntos 5.1.2 y 5.1.3.

5.3.5 Diseño experimental y análisis estadístico de los ensayos “*in vivo*”

Para el análisis de datos se utilizó un diseño factorial 2^2

Donde:

FACTOR	NIVELES	
Tratamiento de quitosano	0 %	2.0 %
Temperatura de almacenamiento	12 °C	25 °C

Variables de respuesta: porcentaje de incidencia y porcentaje de severidad.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), y se realizó una comparación de medias por una prueba de Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico paquete STATISTICA 12. El experimento se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PRIMERA ETAPA

6.1.1 Contenido de humedad y germinación como parámetros de calidad de en maíz

Para determinar la calidad de la semilla de maíz se evalúa la sanidad, viabilidad, germinación y vigor. Las pruebas mas utilizadas son la prueba del embrión, prueba con papel secante, prueba en placas de agar, determinación del contenido de humedad, prueba de germinación de la semilla en toallas de papel enrolladas (FAO & OMS, 2007; Warham et al., 2003). En este trabajo de investigación se determinó el contenido de humedad (Figura 6.1) y la capacidad de germinación de la semilla en toallas de papel húmedas enrolladas (Figura 6.2). El contenido de humedad es uno de los factores más importantes para mantener la calidad del grano de maíz almacenado, el grano debe ser secado hasta alcanzar una humedad $\leq 14.5\%$, misma que debe conservarse o disminuir durante todo el tiempo de almacenamiento (FAO & OMS, 2007; NOM 247, 2008).



Figura 6.2 Determinación del contenido de humedad de los granos de maíz.



Figura 6.1 Germinación de la semilla en toallas de papel húmedas enrolladas.

La tabla 6.1 muestra el contenido de humedad en las muestras ($<14.5\%$), las cuales cumplieron con los parámetros de calidad recomendados en los granos de maíz almacenado.

Tabla 6.1 Determinación del contenido de humedad y la germinación de los granos de maíz almacenados.

Muestra	Humedad (%)	Germinación (%)
1	11.51 ± 0.48	49.6 ± 16.16
2	11.32 ± 0.64	85.7 ± 7.02
3	11.87 ± 0.56	83 ± 6.85

El resultado es el promedio de cinco experimentos en tres repeticiones independientes. Media ± desviación estándar.

Las semillas son portadoras de una micoflora que varía según la especie, algunos patógenos como bacterias, hongos, virus e insectos pueden provocar enfermedades en dichas semillas (Akonda et al., 2016; Hernández-delgado et al., 2007). Estas enfermedades son factores que provocan su deterioro, y esto puede medirse de manera cuantitativa a través de la germinación de la semilla. Una prueba de germinación que resulta por debajo del 90%, es una germinación no satisfactoria. En cuanto al parámetro de germinación, los resultados fueron no satisfactorio (<90%). Esto podría deberse al manejo y almacenamiento inadecuado del grano, las diferencias en las condiciones de almacenamiento y los tipos de patógenos transmitidos en los granos provenientes desde campo (Akonda et al., 2016; Warham et al., 2003). Al hacer el conteo de germinación se pudo comprobar la presencia de hongos en las semillas, y con las condiciones adecuadas estos se desarrollaron de manera rápida (Figura 6.3).



Figura 6.3 Desarrollo de patógenos fúngicos en grano de maíz.

6.1.2 Aislamiento, purificación e identificación a nivel de género de hongos productores de micotoxinas presentes en granos de maíz

Los granos aparentemente sanos (Figura 6.4a), sin ninguna infección o daño físico mostraron cambios durante el tiempo de incubación que indicaron la presencia de hongos. A las 72 horas se observó la presencia de micelio y germinación en los granos (Figura 6.4b), se realizó la toma de muestras de micelio para obtener colonias más puras. A los 5 días los granos presentaron una germinación avanzada y un crecimiento mayor de micelio donde se podían distinguir las diferentes características macroscópicas como su color y textura (Figura 6.4c).

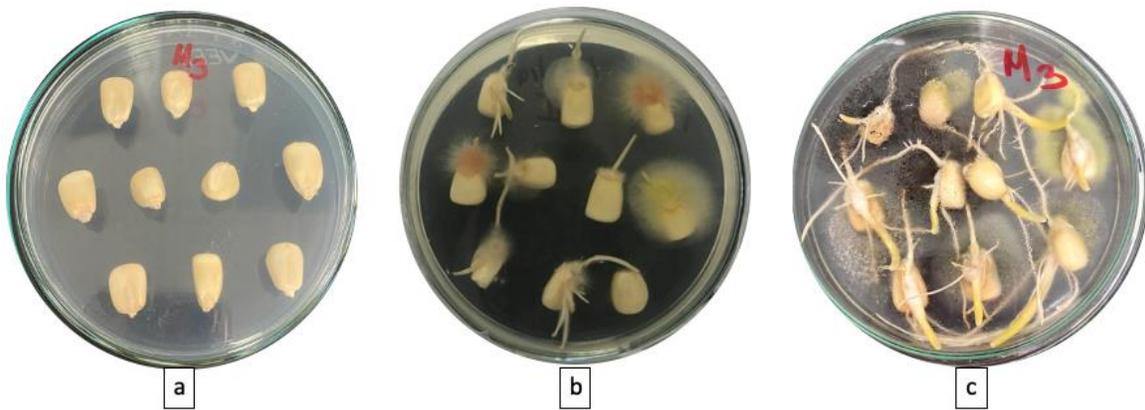


Figura 6.4 Granos de maíz sembrados en cajas de Petri con medio PDA. a) granos de maíz a tiempo 0. b) granos de maíz a las 72 horas con presencia de hongos y germinación. c) granos de maíz a las 120 horas con una mayor proliferación de hongos y germinación.

Se aislaron tres hongos (Figura 6.5). En todas las muestras se observó una mayor incidencia del hongo que formó colonias de color blanco subsuperficial y una capa de color negro en la superficie y correspondió con las características de *Aspergillus spp.*, (Figura 6.5a), el segundo correspondió con las características de *Penicillium spp.* (Figura 6.5b) y con menos frecuencia el tercer hongo tuvo relación con las características de *Fusarium spp.* (Figura 6.5c).

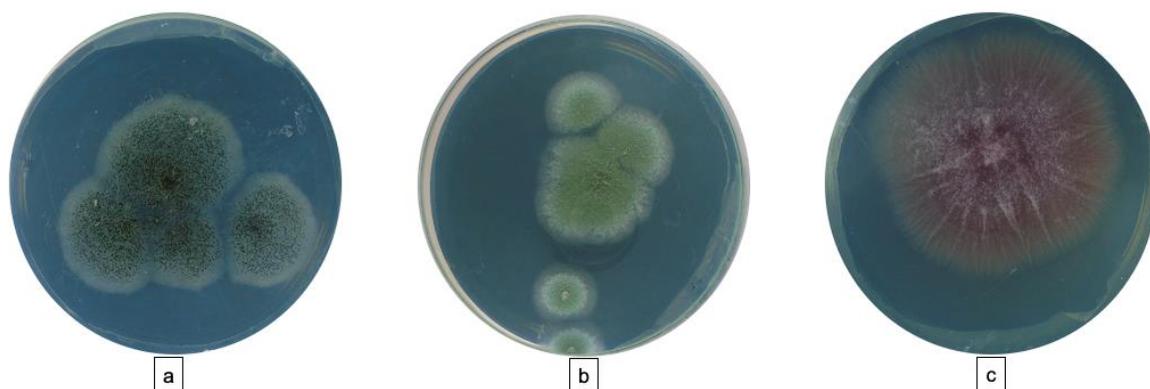


Figura 6.5 Características macroscópicas de los hongos aislados y purificados de los granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) colonias de color blanco subsuperficial y una capa de color negro en la superficie. b) colonias de color verde con textura pulverulenta. c) colonia de color rosa-violeta en forma filamentososa

Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura, el género *Aspergillus spp.* es uno de los hongos que se presenta con mayor frecuencia en maíz almacenado seguido del género *Penicillium spp.*, mientras que en campo la mayor incidencia la presenta el género *Fusarium spp.* (Akonda et al., 2016; Gulbis et al., 2016; Hernández-delgado et al., 2007; Lumi Abe et al., 2015; Martínez-Padrón et al., 2013; Muhammad et al., 2019; Pfliegler et al., 2020).

Las especies del género *Aspergillus spp.* se caracterizan por la formación de conidióforos con estípites grandes, de paredes gruesas y ápices hinchados denominados vesículas. Las vesículas por lo general son esféricas, pero en algunas especies están más alargadas o menos hinchadas. Las vesículas pueden tener fiálides o métulas y fiálides con producción de abundantes conidios grandes (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009). Una característica muy importante para diferenciar las especies de *Aspergillus* de las de *Penicillium* es que los estípites de *Aspergillus* suelen formarse a partir de una célula corta denominada célula del pie dentro de una hifa fértil y no son septados, por lo que las vesículas, los estípites y célula del pie forman una sola célula muy grande (Pitt & Hocking, 2009; Wadzani et al., 2019).

El análisis microscópico favoreció la identificación de *Aspergillus spp.*, se observaron conidiofóros con cabezas conidiales y radiales, estípes de color marrón sin septos y vesículas esféricas portando métulas y fiálides compactadas en la

superficie (Figura 6.6b), sus conidios se observaron globosos de color marrón con crestas irregulares (Figura 6.6c), con esta descripción identificamos al hongo perteneciente al género *Aspergillus spp.* Sin embargo, al observar las características macroscópicas (Figura 6.6a) este hongo se puede clasificar en la sección *Nigri* ya que sus colonias cubren por completo la caja de petri en pocos días (4-5 días), éstas tienen un micelio blanco subsuperficial y una capa de color negro característico de los conidióforos en la superficie. Al reverso tiene una coloración amarillo pálido (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009; Warham et al., 2003).

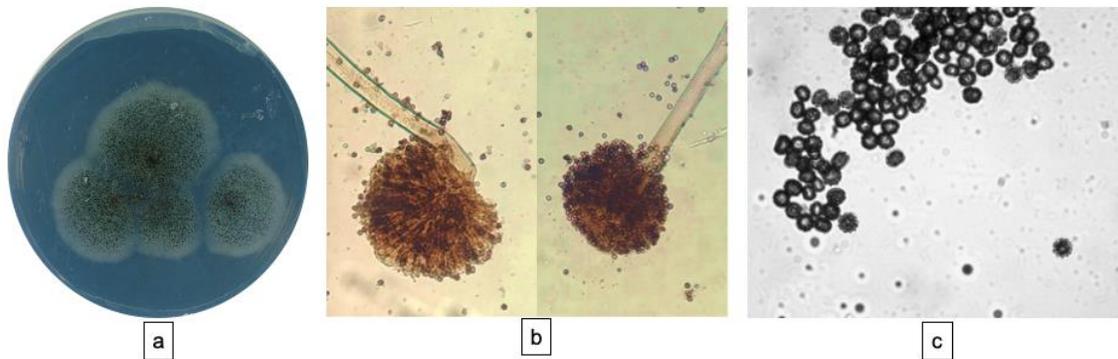


Figura 6.6 Características macroscópicas y microscópicas de cepa aislada de granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) colonias de color blanco subsuperficial y una capa de color negro en la superficie. b) conidióforos con cabezas conidiales y radiales de color marrón. c) conidios con crestas irregulares.

La identificación a nivel de especies del género *Penicillium* es difícil desde el punto de vista taxonómico, tanto por las numerosas especies que existe así por las pequeñas diferencias aparente entre las especies (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

Las especies del género *Penicillium* son saprófitos, ubicuos, oportunista y muchos son psicrotróficos. Todas las especies que se encuentran en los alimentos por lo general son del mismo color y apariencia en sus colonias (Yadav et al., 2018). Para su identificación su estructura reproductora es muy característica, ya que es un conidióforo con un estípote que termina en un penicillus. La forma del penicillus

determina la división taxonómica primaria del género en subgéneros (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

Dentro de las especies con más interés se encuentran en el subgénero *Penicillium* ya que son muy importantes en el deterioro de los alimentos, con ocurrencia universal en cereales, alimentos refrigerados y muchos otros ambientes (Gulbis et al., 2016; Muhammad et al., 2019). Las colonias que desarrolla el subgénero *Penicillium* pueden crecer muy rápido de 5 a 9 días, en su mayoría son con coloración verde-azul, pulverulentas, y sus bordes color blanco, tales como se obtuvo de las muestras de grano de maíz (Figura 6.7a) (Wadzani et al., 2019). La estructura reproductora característica de este subgénero es un conidióforo con un estípote que termine en un penicillus terverticilado (Pitt & Hocking, 2009). Así mismo en el microscopio se observaron estos conidióforos terverticilados, hialinos, septados, con una serie de ramificaciones típicas filídes hialinas, que producen cadenas largas de conidios pequeños (Figura 6.7b).

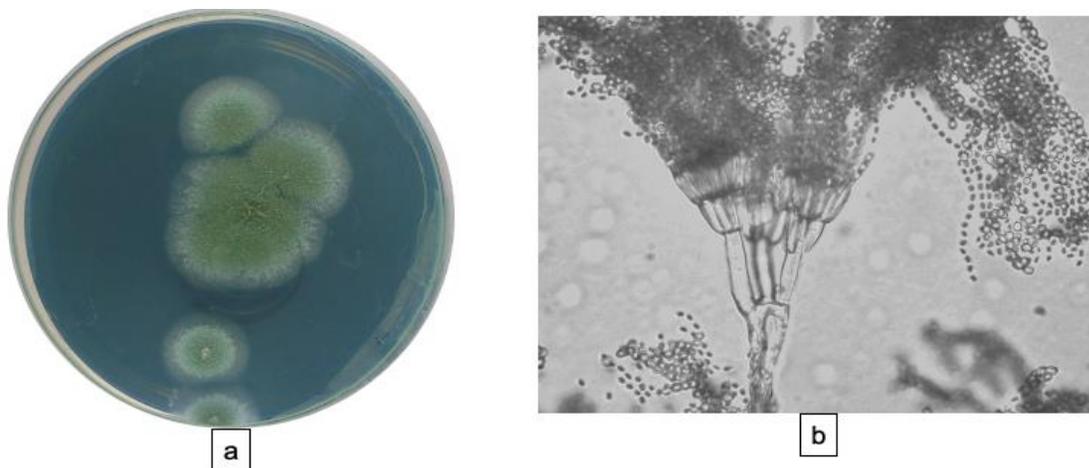


Figura 6.7 Características macroscópicas y microscópicas de cepa aislada de granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) micelio con coloración verde-azul, textura pulverulenta y bordes de color blanco. b) Conidióforo terverticilado, hialino y septado con cadenas largas de conidios pequeños.

El género *Fusarium spp.* presenta una amplia distribución, tanto en suelos como en sustratos orgánicos, y es una causa importante de producción en frutas, verduras y cereales. En el mismo sentido, las características distintivas del género *Fusarium*

se pudieron observar en el microscopio, las cuales fueron abundantes microconidias de forma elipsoidal, que se producen de monofiálides en forma de cabezas falsas (Figura 6.8b) y cadenas cortas o largas de microconidios (Figura 6.8c). Sin embargo, en la literatura se ha reportado que los macroconidios son difícil de observar, ya que no están ampliamente distribuidos en la colonia (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009). Las características más importantes para la identificación de este género son la presencia o ausencia de microconidios, la forma en la que se producen y el tipo de fiálide, así como la producción de macroconidios, su forma y tamaño, números de septos, formación de esporodoquios o pionnotes. Muchas especies también pueden producir clamidoconidios, ya sea terminales o intermedios (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009; Torre-hernández et al., 2014). Dentro de las características macroscópicas que se obtuvieron, la colonia cubrió por completo la caja de Petri en aproximadamente 8-9 días, mostró una coloración rosa-violeta con forma filamentosa, y micelio con textura elevada algodonosa de color blanco (Figura 6.8a), tales características son particulares de las especies de *Fusarium spp.* (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009; Warham et al., 2003). Las especies que frecuentemente se aíslan en el grano de maíz almacenado son *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* (Akonda et al., 2016; Ferrochio et al., 2014; Gulbis et al., 2016).

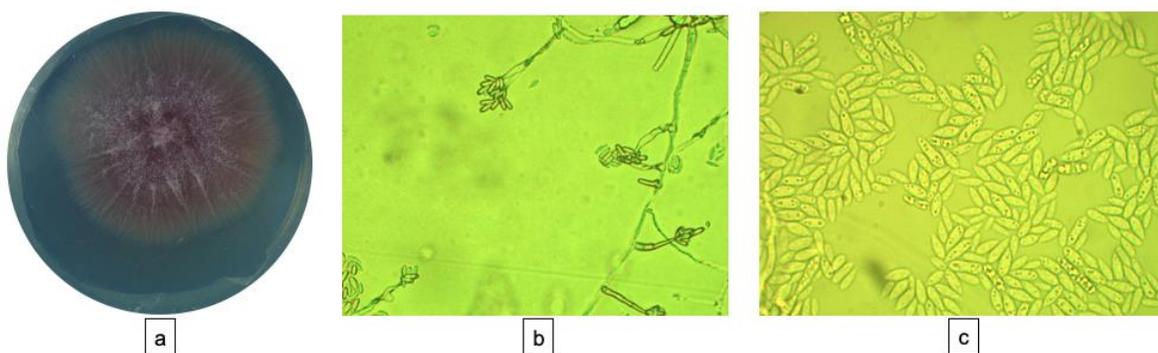


Figura 6.8 Características macroscópicas y microscópicas de cepa aislada de granos de maíz a los 6 días de crecimiento. a) micelio de color rosa-violeta, con forma filamentosa, y textura elevada y algodonosa de color blanco. b) estructuras características del género *Fusarium* llamadas esporodoquios. c) Microconidios hialinos unicelular y muy pocos bicelulares.

6.1.3 Identificación de hongos presentes en granos de maíz a nivel de especie

Los métodos basados en ADN, en particular los de PCR, permiten una identificación rápida, altamente sensible y específica (Jedidi et al., 2018). La secuenciación de los productos de amplificación con ITS1- ITS4 y EF1-EF2, permitieron identificar a nivel de especie los 3 hongos aislados. De acuerdo con la búsqueda en BLAST, el árbol de consenso obtenido para el análisis de *Aspergillus sp.* fue de 100% de cobertura y 100% de identidad con *Aspergillus niger*, para *Penicillium sp.* se obtuvo 100% de cobertura y 100% de identidad con *Penicillium funiculosum* y para *Fusarium spp.* se obtuvo 99% de cobertura y 99.57% de identidad para *Fusarium verticillioides*.

Con frecuencia los hongos patógenos productores de micotoxinas, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides*, son aislados de cereales en especial de maíz, en todo el mundo (Frisvad, 2018; Jedidi et al., 2018; Lumi-Abe et al., 2015; Muhammad et al., 2019; Niaz & Dawar, 2009; Odebode et al., 2020; Pfliegler et al., 2020).

6.2 SEGUNDA ETAPA (Pruebas “in vitro”)

6.2.1 Inhibición del crecimiento micelial

Para determinar el efecto del quitosano se midió el crecimiento micelial (cm²) para cada hongo a los 5, 8 y 9 días de incubación para *Aspergillus niger* (Figura 6.9), *Penicillium funiculosum* (Figura 6.10) y *Fusarium verticillioides* (Figura 6.11) respectivamente.

La aplicación de quitosano del 1.0 al 2.0% retraso el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*, a los 3 días con respecto al control, sin embargo, este efecto no se observó a los 5 días con las concentraciones de 1.0 y 1.5%. La concentración mas alta (2.0%) redujo el crecimiento micelial de *Aspergillus niger* a los 5 días de incubación ($p < 0.05$) comparado con el control (Figura 6.9), estos resultados son similares con el estudio de Dewi & Nur, (2018); dos Santos et al., (2012) y Ziani et al., (2009) donde utilizaron concentraciones de 2.0 a 4.0% de quitosano para obtener un porcentaje de inhibición cercano al 100%.

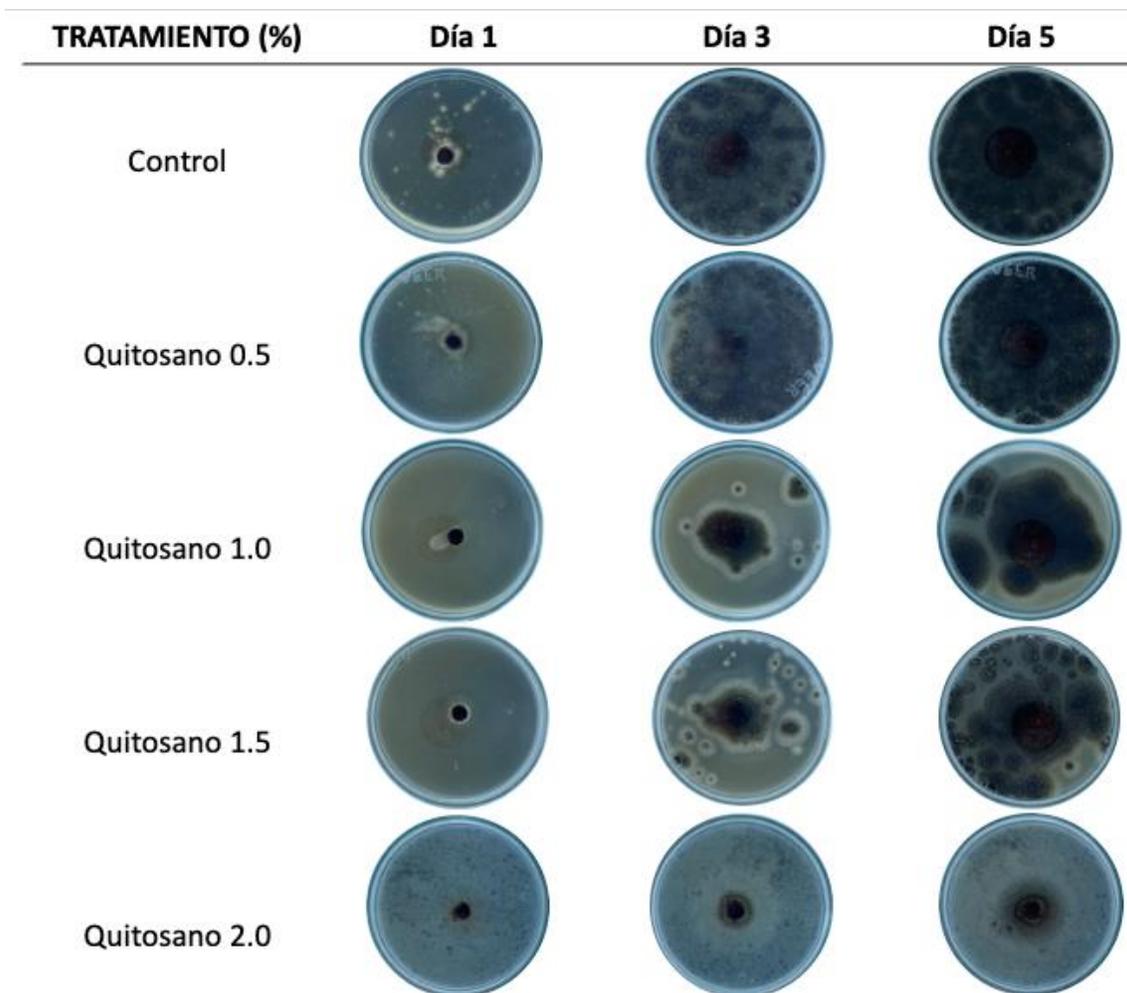


Figura 6.9 Crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en medio PDA a diferentes concentraciones de quitosano durante 5 días de incubación a 25 ± 2 ° C.

El tratamiento de quitosano fue efectivo para controlar el crecimiento de *Penicillium funiculosum* en todos los tratamientos (de 0.5-2.0%) a partir del día 3, comparado con el control (Figura 6.10). La aplicación de quitosano al 0.5% causó un retraso en el crecimiento del diámetro micelial al día 1, sin embargo, el crecimiento del hongo aumentó al día 5, resultados similares se obtuvieron con las concentraciones de quitosano a 1.0%, y 1.5%. El tratamiento más efectivo fue a la concentración más alta reduciendo casi por completo el crecimiento micelial. Estos resultados son consistentes con los encontrados previamente en varias especies de *Penicillium sp.* (Al-Sheikh & Yehia, 2016; Carvalho et al., 2020; Shi et al., 2018; Zhang et al., 2011).

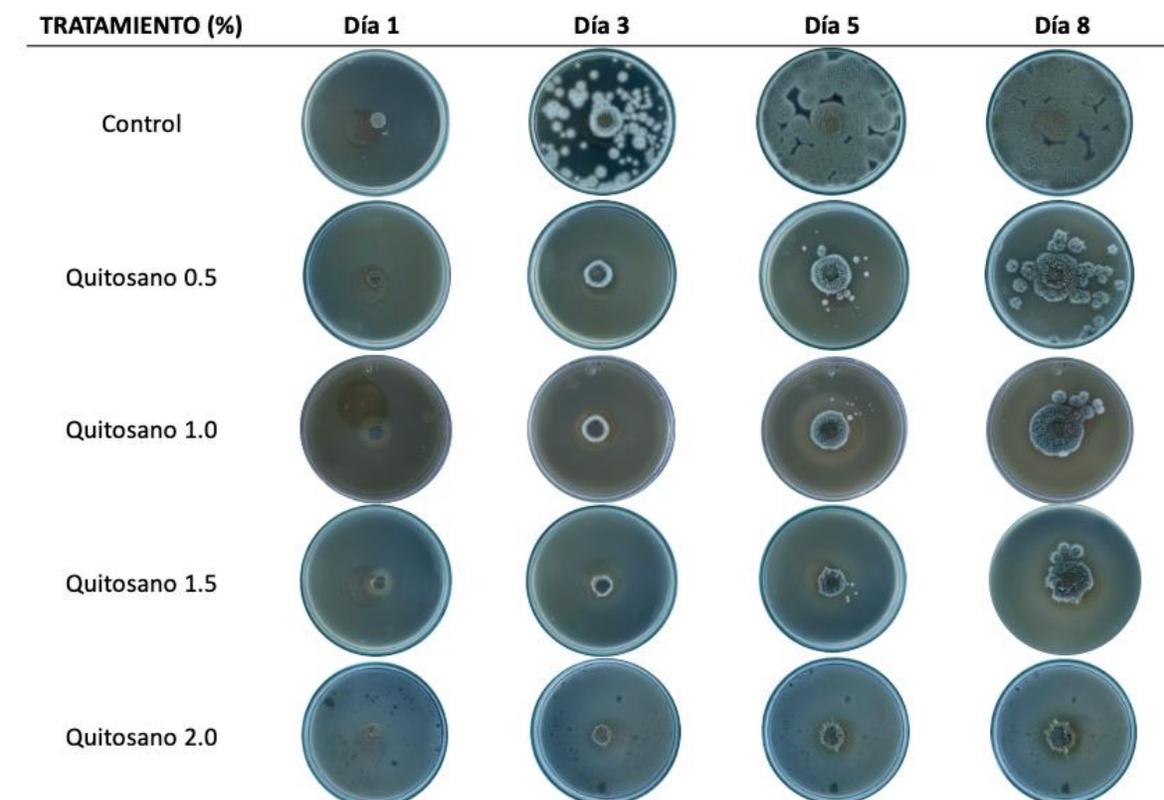


Figura 6.10 Crecimiento micelial de *Penicillium funiculosum* en medio PDA a diferentes concentraciones de quitosano durante 8 días de incubación a 25 ± 2 ° C.

El crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides* en presencia de quitosano al 1.0% y 1.5% retrasaron el crecimiento del hongo; en el caso del tratamiento de quitosano al 1.0% se observó mayor crecimiento micelial en el día 9, sin diferencia significativa respecto al control. En contraste, la presencia de quitosano al 2.0% mostró una correlación negativa entre la concentración del biopolímero sobre el desarrollo del hongo durante todo el periodo de incubación (Figura 6.11). Resultados similares se observan en el estudio de Ferrochio et al., (2014) donde se muestra el potencial uso del quitosano, ya que el aumento de las concentraciones provoca un aumento en la fase de latencia y disminuye el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides*.

La tabla 6.2 muestra la inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* con los diferentes tratamientos de quitosano, calculado con el área del último día de incubación. De acuerdo con los resultados, existen diferencias significativas para cada hongo utilizando las diferentes concentraciones. Los hongos con mayor inhibición fueron *Penicillium*

funiculosum y *Fusarium verticillioides* conforme se fueron aumentando las concentraciones de quitosano, *Aspergillus niger* resultó ser mas resistente al tratamiento. Romanazzi et al., (2018), demostraron que para lograr la inhibición de algunos patógenos fúngicos se necesita una aplicación de quitosano mayor al 1.0%. El porcentaje máximo de inhibición del crecimiento micelial se alcanzó a una concentración del 2.0% de quitosano ya que mostró ser el tratamiento más efectivo logrando inhibir un 74.97, 93.19 y 89.79% para *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides*, respectivamente.

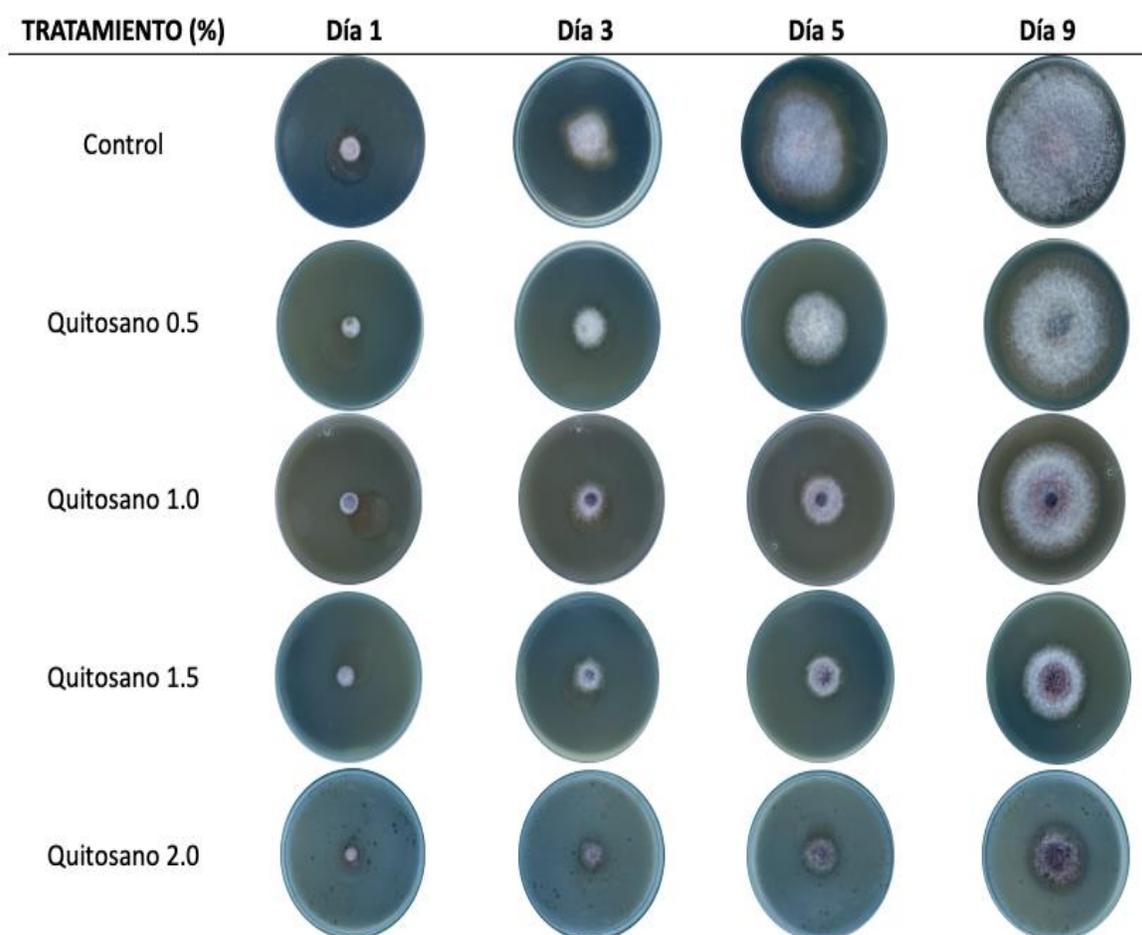


Figura 6.11 Crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides* en medio PDA a diferentes concentraciones de quitosano durante 9 días de incubación a 25 ± 2 ° C.

Tabla 6.2 Porcentaje de inhibición en el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* a los 5, 8 y 9 días incubación respectivamente a 25 ± 2 ° C, con las diferentes concentraciones de quitosano.

Tratamiento (%)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
Control	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a	0.0±0.0 ^a
Quitosano 0.5	0.27±0.44 ^a	81.48±9.25 ^b	31.82±6.98 ^b
Quitosano 1.0	24.99±9.05 ^b	82.68±1.57 ^b	60.14±1.56 ^c
Quitosano 1.5	19.40±5.83 ^b	90.58±0.76 ^c	74.99±3.95 ^d
Quitosano 2.0	74.97±2.61 ^c	93.19±3.20 ^c	89.79±2.57 ^e

Cada valor es la media de 2 repeticiones de 3 experimentos independientes. Media ± Desviación estandar seguida de la misma letra en la columna de cada tratamiento no son significativamente diferente ($p < 0.05$).

El efecto antifúngico del quitosano puede variar depende a sus características como son la fuente de donde se extrae, su peso molecular y su grado de desacetilación (Carvalho et al., 2020). En este estudio se utilizó un quitosano de alto peso molecular comercial con un grado de desacetilación del 90% logrando obtener resultados positivos como fungiestático a las concentraciones mas altas (1.5 y 2.0%) en los diferentes hongos empleados.

Los resultados de este estudio están de acuerdo con lo reportado en investigaciones anteriores, en las que se ha demostrado que el uso de un quitosano de bajo o alto peso molecular con un grado de desacetilación arriba del 90% muestra efectos fungicidas y fungiestáticos dependiendo, de las concentraciones utilizadas y el tipo de hongo a tratar (Carvalho et al., 2020; Dewi & Nur, 2018; Ferrochio et al., 2014; Ziani et al., 2009).

Se han propuesto varios mecanismos para la acción antifúngica del quitosano, el principal está basado en la carga positiva de sus grupos aminos libres a pH ácido, conferida por la protonación. Por lo tanto, un quitosano policationico puede interactuar potencialmente con los componentes de la membrana celular de los hongos que se encuentran cargados negativamente (fosfolipidos, proteínas), ésta interacción electroestática da como resultado una permeabilización de la membrana

plasmática interfiriendo en el crecimiento normal y el metabolismo de las células del hongo (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; López-Moya et al., 2019; Palma-Guerrero et al., 2010; Romanazzi et al., 2018; Sharif et al., 2018). En este sentido, Palma-Guerrero et al., (2010) investigaron la sensibilidad o resistencia del quitosano en algunos hongos filamentosos caracterizando los componentes de la membrana plasmática y determinaron a los componentes lipídicos (ácidos grasos insaturados) capaces de conferir mayor sensibilidad al quitosano. Los resultados mostraron que el nivel de insaturación de ácidos grasos y el grado de fluidez de la membrana puede explicar la sensibilidad de quitosano en algunas especies fúngicas frente al quitosano, como es en *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides*.

6.2.2 Cuantificación de esporas

Las esporas son producidas en grandes cantidades por numerosos hongos incluidos *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Fusarium spp.* que representan la principal forma de contaminación en los alimentos (Camardo Leggieri et al., 2018). La figura 6.12 muestra la concentración de esporas en los diferentes tratamientos para *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* a los 5, 8 y 9 días de crecimiento respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados para cada hongo ($p < 0.05$). El mejor tratamiento para estos patógenos fue a la concentración de 2.0%. La producción de esporas para *Aspergillus niger* y *Penicillium funiculosum* disminuyó un 83.89 y 90.55% respectivamente. *Fusarium verticillioides* fue ligeramente más sensible, con una reducción de esporas del 95.5%. El quitosano demuestra ser efectivo al disminuir la producción de esporas y con esto controlar la diseminación y proliferación del patógeno. Resultados similares fueron reportados por Ferrochio et al., (2014); Gutiérrez-Martínez et al., (2018); Pabón-Baquero et al., (2015) y Zhu et al., (2016) para las tres diferentes especies evaluadas en el presente trabajo.

Los reguladores centrales de los hongos para llevar a cabo la esporulación son activados por diversas señales del exterior, la presencia de nutrientes o factores adversos pueden alterar de manera positiva o negativa la producción de esporas.

El efecto negativo del quitosano en la producción de esporas se ha relacionado con un efecto fungistático, a nivel intra y extracelular lo que causa la permeabilización de la membrana, y cuando los daños son irreversibles en este momento la célula deja de ser activamente funcional. Las proteínas de superficie (proteínas G) sufren daños estructurales y son incapaces de responder a señales extracelulares y transmitir esta información de forma intracelular, por lo tanto la cascada de señalización y numerosos procesos biológicos, como es la esporulación no se pueden regular (Baltussen et al., 2019).

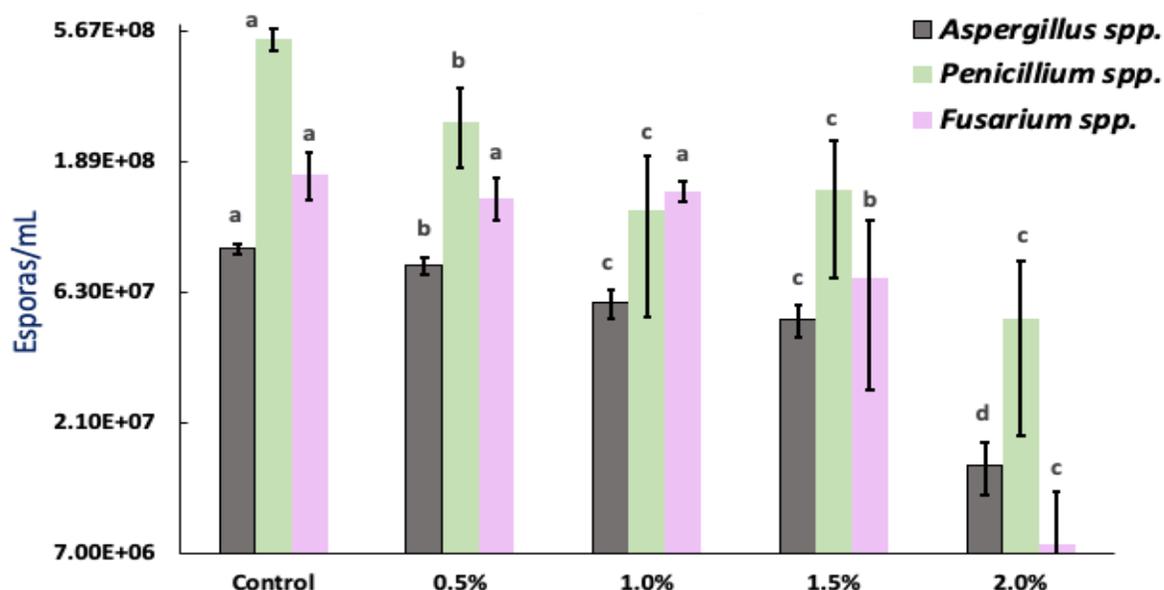


Figura 6.12 Esporulaci3n de *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* a los 5, 8 y 9 d1as incubaci3n respectivamente a 25 ± 2 ° C. Las letras en la barra indican la diferencia entre tratamientos en la misma especie ($p < 0.05$).

6.2.3 Porcentaje de Germinaci3n

El proceso de germinaci3n de las esporas se considera como la primera etapa del desarrollo del hongo con la formaci3n de la hifa para causar la enfermedad (Baltussen et al., 2019; G1lvez-Iriqui et al., 2019), por ello es importante que el tratamiento empleado actu3e inhibiendo principalmente este proceso para evitar el

crecimiento de estos patógenos. La germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo fueron inhibidas de una manera dependiente a las concentraciones de quitosano (Tabla 6.3). La mayor inhibición (100%) se observó en *Fusarium verticillioides* (Figura 6.15) y *Penicillium funiculosum* (Figura 6.14), seguido de *Aspergillus niger* (83%) cuando se usó una concentración del 2% de quitosano (Figura 6.13).

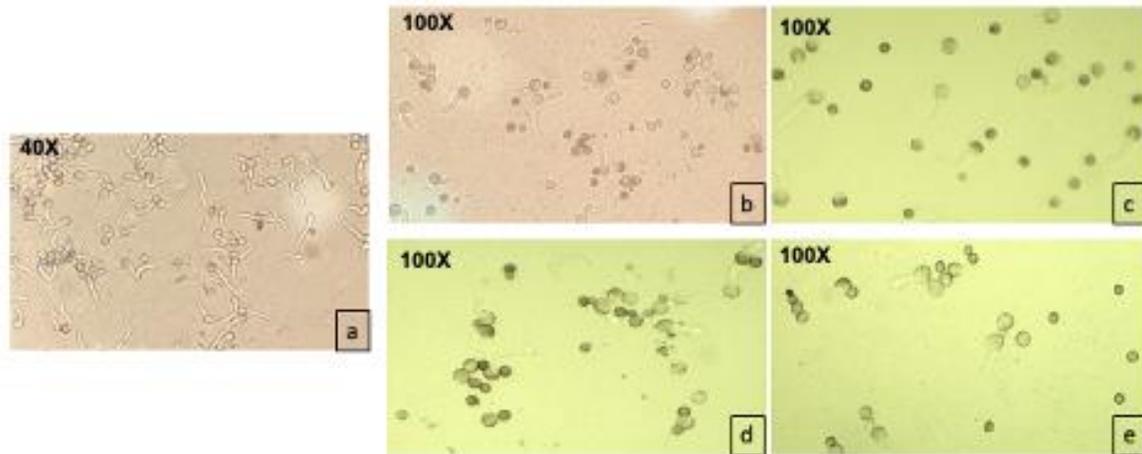


Figura 6.13 Germinación de esporas de *Aspergillus niger* sometidas a diferentes concentraciones de quitosano en medio PDA durante 9 horas. a) Control; b) Quitosano 0.5%; c) Quitosano 1.0%; d) Quitosano 1.5%; e) Quitosano 2.0%.

Se ha descrito que el quitosano tiene la capacidad de quelar nutrientes de bajo peso molecular como sales inorgánicas, azúcares y aminoácidos que son necesarios para los procesos relacionados con la germinación de las esporas. Al privar al hongo de nutrientes, diversas reacciones enzimáticas son alteradas y se refleja en cambios fisiológicos y morfológicas de la célula (Baltussen et al., 2019; Gutiérrez-Martínez et al., 2018; López-Moya et al., 2019; Romanazzi et al., 2018; Sharif et al., 2018; Ziani et al., 2009).

En la figura 6.13 se muestran esporas expuestas a las distintas concentraciones de quitosano (25 °C, 9 h). La germinación de *Aspergillus niger* fue significativamente diferente en todos los tratamientos ($p < 0.05$), respecto al control. Las esporas que no germinaron se observaron en agregaciones y ligeramente hinchadas sin perder

su color marrón. Sin embargo, este biopolímero no demostró ser completamente efectivo. Estos resultados coinciden con los reportados por Gálvez-Irriqui et al., (2019), los autores reportaron que la aplicación de quitosano a *A. niger* no inhibió el proceso de germinación pero si provocó una reducción.

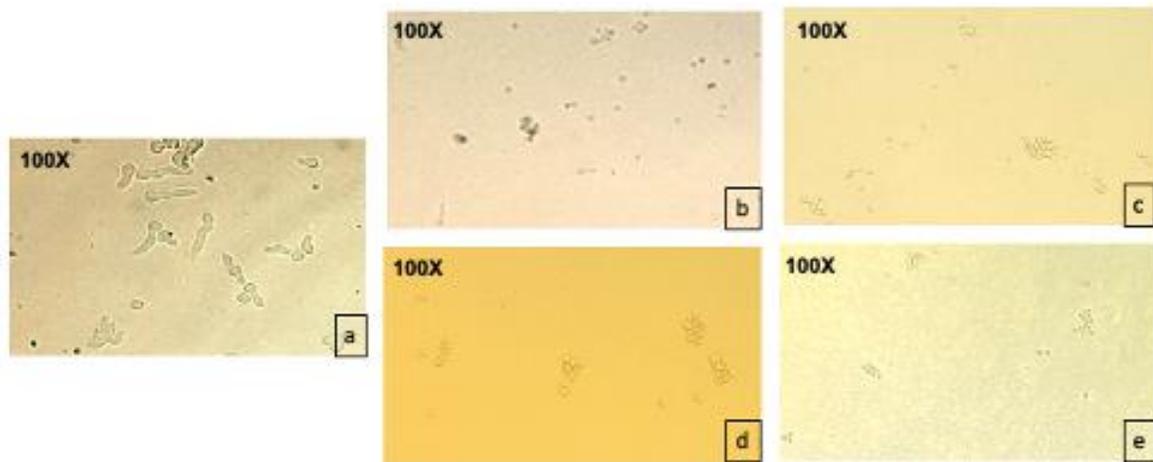


Figura 6.14 Germinación de esporas de *Penicillium funiculosum* sometidas a diferentes concentraciones de quitosano en medio PDA durante 12 horas. a) Control; b) Quitosano 0.5%; c) Quitosano 1.0%; d) Quitosano 1.5%; e) Quitosano 2.0%.

Para *Penicillium funiculosum* en la Figura 6.14a se muestra el proceso de germinación sin quitosano (control) que se llevó a cabo en condiciones óptimas en un lapso de 12 horas a una temperatura de 25 °C, a partir de la concentración 0.5% de quitosano el proceso de germinación fue casi nulo (Figura 6.14b y c) y a concentraciones de 1.5 y 2.0% fue 100% inhibido (Figura 6.14d y e). El efecto fúngico y fungiestático del quitosano en especies de *Penicillium* es variado, Carvalho et al., (2020) utilizaron quitosano de diferentes pesos moleculares y diferentes especies de *Penicillium*. El porcentaje de inhibición fue diferente entre especies *P. citrinum* y *P. mallochii*, sin embargo se acercaron al 100%.

La actividad antimicrobiana del quitosano también se puede atribuir al uso de un quitosano de alto peso molecular, se puede inferir que las moléculas son teóricamente más grandes y al unirse a la pared celular causan un obstáculo

estérico que hace imposible el intercambio de nutrientes y metabolitos por la célula, interfiriendo en la germinación del hongo (Carvalho et al., 2020).

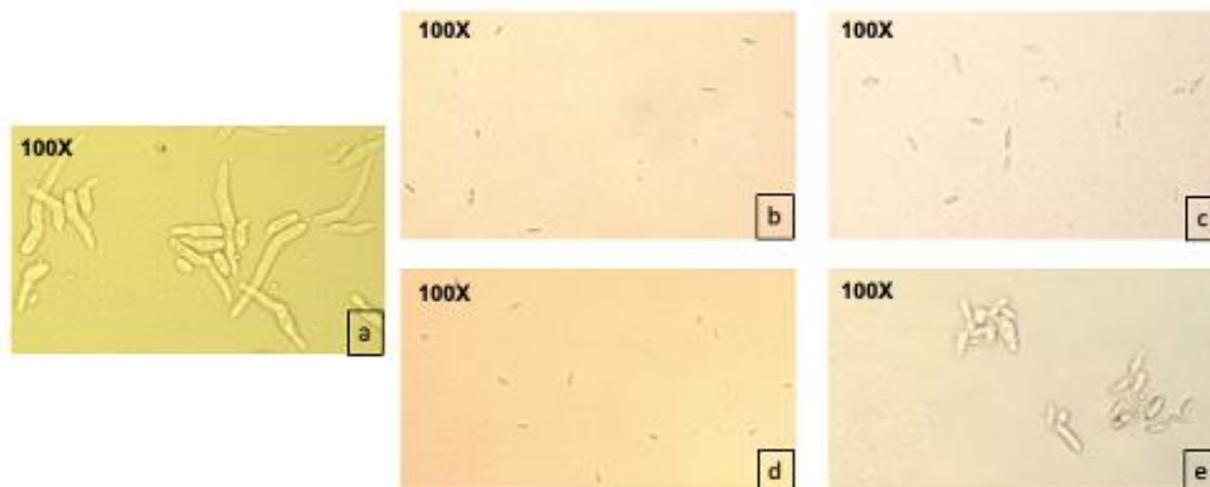


Figura 6.15 Germinación de esporas de *Fusarium verticillioides* sometidas a diferentes concentraciones de quitosano en medio PDA durante 8 horas. a) Control; b) Quitosano 0.5%; c) Quitosano 1.0%; d) Quitosano 1.5%; e) Quitosano 2.0%.

Tabla 6.3 Porcentaje de germinación “*in vitro*” de *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* a las 9, 12 y 8 horas respectivamente, a diferentes concentraciones de quitosano.

Tratamiento	% Germinación		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicilium funiculosum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
Control	98.67±1.03 ^a	98.44±0.34 ^a	97.33±1.60 ^a
Quitosano 0.5 %	28.78±1.66 ^b	2.44±1.87 ^b	0.0±0.0 ^b
Quitosano 1.0 %	23.45±2.32 ^c	0.22±0.34 ^c	0.0±0.0 ^b
Quitosano 1.5 %	35.12±2.56 ^d	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
Quitosano 2.0 %	16.78±3.88 ^e	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b

Cada valor es la media de 3 repeticiones de 3 experimentos independientes. Media ± Desviación estandar seguida de la misma letra en la columna de cada tratamiento no son significativamente diferente (p=0.05).

En el caso de *Fusarium verticillioides* la inhibición del proceso de germinación (Figura 6.15) fue efectivo a partir de la concentración mínima en comparación con su control a un tiempo de 8 horas en condiciones óptimas. Se ha demostrado que las especies de *Fusarium* son sensibles al tratamiento de quitosano, como fue informado por Ferrochio et al., (2014); Gutiérrez-Martínez et al., (2018); Hassan & Chang, (2017) y Pabón-Baquero et al., (2015).

6.3 TERCERA ETAPA (Pruebas “*In vivo*”)

6.3.1 Prueba de incidencia y severidad

El uso de quitosano como un recubrimiento en semillas es una alternativa para el control de enfermedades postcosecha (Lizárraga-Paulín et al., 2013; Pabón-Baquero et al., 2015; Ziani et al., 2009). Las Figuras 6.16, 6.17 y 6.18 muestran la incidencia de la enfermedad para *A. niger*, *P. funiculosum* y *F. verticillioides* respectivamente, con el desarrollo de micelio y cambios de color en los granos de maíz sin tratar y con la aplicación de quitosano al 2.0% con diferentes temperaturas de almacenamiento.

A. niger empezó a desarrollarse a las 72 horas en el grano de maíz sin quitosano (control) a una temperatura de 25 °C, el micelio blanco cubrió los granos y a los 6 días la superficie estaba cubierta con esporas de color negro (Figura 6.16). El grano con el recubrimiento de quitosano no mostró diferencias significativas con el control obteniendo una incidencia del 100% a una temperatura de 25 °C (Tabla 6.4). En cambio, en el porcentaje de severidad si se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con una reducción del 20% en el grano tratado. A una temperatura de 12 °C no hubo desarrollo del hongo tanto para el control como para el grano con quitosano hasta los 15 días de almacenamiento. *A. niger* tiene un crecimiento óptimo a temperatura de 35-37 °C y una mínima de 8 °C (Pitt & Hocking, 2009), por lo tanto el uso de bajas temperaturas es un factor importante para controlar su desarrollo. La aplicación de quitosano no fue tan prometedora para el control de este hongo, dos Santos et al., (2012) y Guan et al., (2009) aplicaron quitosano con

otros compuestos a semillas logrando obtener una reducción alrededor del 100%. En este sentido podemos inferir que la aplicación de quitosano en combinación con otros tratamientos además de un control de temperatura pueden llegar a hacer un método eficaz para inhibir las pérdidas postcosecha de este hongo.



Figura 6.16 Crecimiento de *Aspergillus niger* en granos de maíz tratados con quitosano al 2.0% almacenados a 25 °C y 12 °C.

La Figura 6.17 muestra el crecimiento de *P. funiculosus* en granos de maíz control a los 8 días de incubación a una temperatura de 25 °C. El grano con quitosano no mostró diferencias significativas con el control en la incidencia pero si ante la severidad. En este sentido el crecimiento de *P. funiculosus* se redujo 35.78% en la prueba de severidad (Tabla 6.4). Al emplear una temperatura de 12 °C no se observó desarrollo del hongo tanto para el control como el grano tratado, esto puede deberse a que la temperatura de crecimiento para *P. funiculosus* va de 8-42 °C con una óptima de 25-28 °C (Xu et al., 2014). Al igual que *A. niger* la temperatura es un factor importante que puede ir de la mano con la aplicación de tratamientos en el control de dichos patógenos para retardar o inhibir su crecimiento. Carvalho et

al., (2020) compararon la efectividad del quitosano en pruebas *in vivo* para controlar distintas especies de *Penicillium*, donde obtuvieron diferentes porcentajes de la incidencia de la enfermedad después de 14 días de almacenamiento dependiendo el tipo de especie, estos resultados pueden ser comparados con los del presente trabajo.

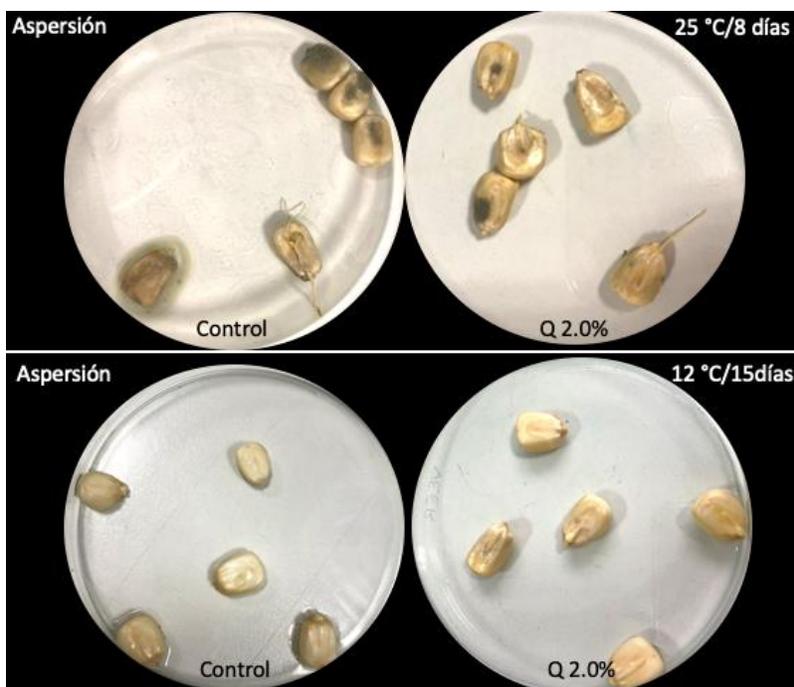


Figura 6.17 Crecimiento de *Penicillium funiculosum* en granos de maíz tratados con quitosano al 2.0% almacenados a 25 °C y 12 °C.

Al contrario de *A. niger* y *P. funiculosum* la baja temperatura empleada, no es un factor que interfiera en el crecimiento para *F. verticillioides*, debido a que este hongo puede desarrollarse a una temperatura óptima de 25 °C y una mínima de 2 °C sin problema (Pitt et al., 2012; Pitt & Hocking, 2009).

F. Verticillioides tuvo un crecimiento rápido en las muestras control a 25 °C, se observó una coloración rosa al grano a los 4 días de incubación (Figura 6.18), con la aplicación de quitosano a la misma temperatura la incidencia fue de 15.55% y la severidad de 14.9% (Tabla 6.4). Los resultados obtenidos en una condición de temperatura relativamente baja (12 °C) no mostró diferencia en estos parámetros

pero se observó un retardo en el desarrollo del hongo que se prolongó hasta el día 10 de almacenamiento. La efectividad en el maíz tratado fue similar a la temperatura de 25 °C, ya que los porcentajes fueron menores a 20% (17.78 y 11.56% respectivamente), lo que confirma que el quitosano puede ser efectivo para controlar o inhibir los síntomas de infección.

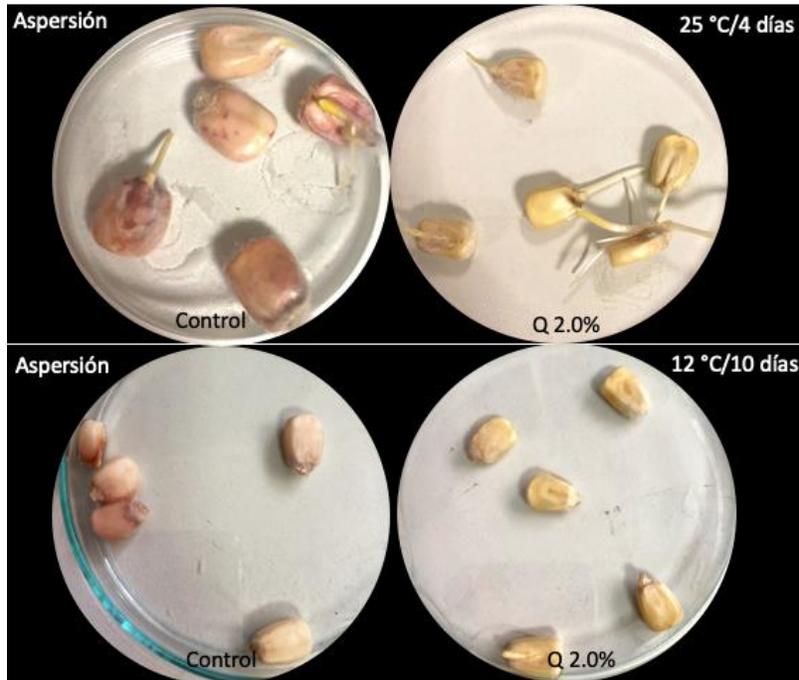


Figura 6.18 Crecimiento de *Fusarium verticillioides* en granos de maíz tratados con quitosano al 2.0% almacenados a 25 °C y 12 °C.

El recubrimiento de quitosano actúa como una película semipermeable que regula el intercambio de gases, reduce la pérdida de agua y la captación de nutrientes, así el desarrollo de los hongos se ve afectado. Por otro lado, el quitosano puede inducir mecanismos de defensas en frutas y vegetales tales como la síntesis de compuestos fenólicos, enzimas antifúngicas hidrolasas como las quitinasas y glucanasas, que hidrolizan los principales componentes de la pared celular de los hongos inhibiendo así su crecimiento, y en este sentido se puede controlar o inhibir el desarrollo de enfermedades postcosechas y prolongar la duración en el almacenamiento para frutas, vegetales y semillas (Gutiérrez-Martínez et al., 2018;

López-Moya et al., 2019; Romanazzi et al., 2018; Romanazzi et al., 2016b; Sharif et al., 2018).

Tabla 6.4 Porcentaje de incidencia y severidad para *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* en grano de maíz con tratamiento de quitosano al 2.0% almacenado a dos temperaturas (12 y 25 °C).

Hongo	Tratamiento	Incidencia (%)		Severidad (%)	
		12 °C	25 °C	12 °C	25 °C
<i>Aspergillus niger</i>	Control	0 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
	Quitosano 2.0%	0 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	80 ± 7.7 ^b
<i>Penicillium funiculosum</i>	Control	0 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
	Quitosano 2.0%	0 ± 0 ^a	97.78 ± 3.85 ^a	0 ± 0 ^a	64.22 ± 23.01 ^b
<i>Fusarium verticillioides</i>	Control	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
	Quitosano 2.0%	17.78 ± 3.85 ^b	15.55 ± 10.18 ^b	11.56 ± 4.28 ^b	14.9 ± 8.7 ^b

Los valores son la media ± desviación estándar de 3 repeticiones en 3 experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna en el mismo hongo representa una diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de tukey ($p < 0.05$).

Las condiciones evaluadas en el presente trabajo pueden ser aplicadas en condiciones de almacenamiento en silos para evaluar que el recubrimiento de quitosano y una baja temperatura pueden controlar el desarrollo de estos patógenos hasta 15 días de almacenamiento y reducir el deterioro de los granos. En este

sentido, otras investigaciones han concluido que la actividad antifúngica del quitosano como recubrimiento puede prevenir a *A. niger* (dos Santos et al., 2012), *P. funiculosum* (Carvalho et al., 2020) y *F. verticillioides* (Lizárraga-Paulí et al., 2011b; Mohamed et al., 2020).

6.3.2 Parámetros de calidad de los granos de maíz con la aplicación de quitosano

Los parámetros de calidad analizados mostraron diferencias significativas en relación al porcentaje de humedad, dependiendo el tipo de aplicación (Tabla 6.5). En contraste en el porcentaje de germinación no se presentaron diferencias significativas en los granos tratados con quitosano (Tabla 6.5), confirmando que el polímero no afecta la calidad del grano ante este parámetro. Se ha reportado que la aplicación de quitosano mejora diversos parámetros de calidad en frutas, verduras y semillas (Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Mohamed et al., 2020; Romanazzi et al., 2018; Romanazzi, et al., 2016b). Diversos autores (Guan et al., 2009; Lizárraga-Paulín et al., 2011a, 2011b, 2013; Pabón-Baquero et al., 2015) mostraron resultados similares a los obtenidos en esta trabajo, en todos los casos, el porcentaje de germinación no mostró diferencias significativas comparadas con el control, por lo tanto, el uso de quitosano no afecta la germinación de las semillas.

Tabla 6.5 Parámetros de calidad de granos de maíz con aplicación de quitosano al 2.0% por inmersión y aspersión.

Tratamiento	Humedad (%)		Germinación (%)	
	Inmersión	Aspersión	Inmersión	Aspersión
Control	14.18 ± 0.4 ^a	12.3 ± 0.7 ^a	89.60 ± 6.16 ^a	85.70 ± 7.02 ^a
Quitosano 2.0%	20.1 ± 0.64 ^b	16.32 ± 0.38 ^b	86.16 ± 7.65 ^a	87.67 ± 0.29 ^a

Los valores son la media ± desviación estándar. El resultado para humedad es el promedio de tres repeticiones en tres experimentos independientes y para germinación 4 repeticiones en tres experimentos independientes. Letras diferentes dentro de una columna en la forma de aplicación representa una diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparación de medias de tukey ($p < 0.05$).

Se ha sugerido que otros sistemas de aplicación deben ser evaluados o añadir un método de secado antes de almacenar el grano, ya que el recubrimiento con quitosano aplicado por inmersión y aspersion, no se considera un tratamiento viable al aumentar el porcentaje de humedad arriba del 15.5%, esto vuelve al grano de maíz más susceptible a ser atacado por hongos patógenos (Guan et al., 2009).

CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES

- Los hongos *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* y *Fusarium verticillioides* se lograron aislar del grano de maíz para consumo humano, los cuales son productores potenciales de micotoxinas que causan efectos adversos a la salud.
- El tratamiento “*in vitro*” de quitosano al 2.0% mostró ser una alternativa para el control de hongos productores de micotoxinas en el modelo estudiado, que puede impactar en la conservación de los granos almacenados y la disminución de la exposición a micotoxinas. Sin embargo, es necesario evaluar concentraciones de quitosano mas altas para hongos de mayor resistencia como *Aspergillus niger*.
- El tratamiento “*in vivo*” junto con el factor de temperatura (<12 °C) mostraron ser una alternativa de control eficaz para los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium funiculosum*, en contraste de *Fusarium verticillioides*, que la temperatura no impacta en el desarrollo del hongo.
- El modelo de aplicación de quitosano por aspersion mostró mejores resultados en relación al porcentaje de humedad, sin afectar la calidad del grano en relación a la germinación. En cuanto al tratamiento de quitosano por inmersión se observó que el modelo estudiado podría ser aplicado a las condiciones de almacenamiento en campo para prevenir el desarrollo de los hongos potenciales productores de micotoxinas, principalmente *Fusarium verticillioides* seguido de *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO 8 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, L., Pathak, N., & Zaidi, R. (2016). Antifungal Potential of Plant Extracts against Seed-borne Fungi Isolated from Barley Seeds (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 07(05), 5–8. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000350>
- Akonda, M. R., Yasmin, M., & Hossain, I. (2016). Incidence of seedborne mycoflora and their effects on germination of maize seeds. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR)*, 8(1), 87–92. <http://www.innspub.net/ijaar/incidence-of-seedborne-mycoflora-and-their-effects-on-germination-of-maize-seeds/>
- Al-Sheikh, H., & Yehia, R. S. (2016). In vitro antifungal efficacy of *Aspergillus niger* ATCC 9642 chitosan-AgNPs composite against post-harvest disease of citrus fruits. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(4), 413–420. <https://doi.org/10.1134/S0003683816040177>
- Aquiahuatl, M. de los A., Volke, tania, Ramírez, F., Salazar, M., Prado, L., & Shirai, K. (2010). *Manual De Prácticas Del Laboratorio De Microbiología General*. http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/crl/Microbiologia/16P/Manual_Micro-16P.pdf
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2019). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1), 1–31. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00049-19>
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. In *Crop Protection* (Vol. 25, Issue 2, pp. 108–118). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.03.010>
- Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., & Battilani, P. (2018). Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology*, 278(January), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Carvalho, T., Costa, M., Rosa, L. H., de Oliveira, A. M., & Oliveira Júnior, E. N. de. (2020). *Penicillium citrinum* and *Penicillium mallochii*: New phytopathogens of orange fruit and their control using chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 234(January). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115918>
- CIMA. (2020). *Centro de información de Mercadeos Agroalimentarios* .
- de Oliveira Pedro, R., Takaki, M., Castilho Gorayeb, T. C., del Bianchi, V. L., Thomeo, J. C., Tiera, M. J., & de Oliveira Tiera, V. A. (2013). Synthesis,

- characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 168(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.006>
- Dewi, R., & Nur, R. M. (2018). *Antifungal Activity of Chitosan on Aspergillus spp* . 2(4), 24–30.
- dos Santos, N. S. T., Athayde Aguiar, A. J. A., de Oliveira, C. E. V., Veríssimo de Sales, C., de Melo e Silva, S., Sousa da Silva, R., Stamford, T. C. M., & de Souza, E. L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32(2), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.014>
- Dubale, B., Solomon, A., Geremew, B., Sethumadhava, G., & Waktole, S. (2014). MYCOFLORA OF GRAIN MAIZE (*Zea mays* L.) STORED IN TRADITIONAL STORAGE CONTAINERS (gombisa and sacks) IN SELECTED WOREDAS OF JIMMA ZONE, ETHIOPIA. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 14(2), 8676–8694.
- FAO, & OMS. (2007). *Codex alimentarius: cereales, legumbres, leguminosas, productos derivados y proteínas vegetales*. FAO.
- FAOSTAT. (2013). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.
- FAOSTAT. (2018). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.
- Ferrochio, L. v., Cendoya, E., Zachetti, V. G. L., Farnochi, M. C., Massad, W., & Ramirez, M. L. (2014). Combined effect of chitosan and water activity on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize-based media. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.011>
- Frisvad, J. C. (2018). A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 73–100. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294>
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenář, F., Mahakaranchanakul, W., Samson, R. A., & Houbraeken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Fuentes-Aragón, D., Silva-Rojas, H. v., Guarnaccia, V., Mora-Aguilera, J. A., Aranda-Ocampo, S., Bautista-Martínez, N., & Téliz-Ortíz, D. (2020). *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: Current status. *Plant Pathology*, 69(8), 1513–1528. <https://doi.org/10.1111/ppa.13234>

- Gabler, F. M., Smilanick, J. L., Ghosop, J. M., & Margosan, D. A. (2005). Impact of postharvest hot water or ethanol treatment of table grapes on gray mold incidence, quality, and ethanol content. *Plant Disease*, 89(3), 309–316. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0309>
- Gálvez-Irqui, A. C., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Calderón-Santoyo, M., Argüelles-Monal, W. M., & Plascencia-Jatomea, M. (2019). Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 2985–3000. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09670-w>
- Giorni, P., Camardo Leggieri, M., Magan, N., & Battilani, P. (2012). Comparison of temperature and moisture requirements for sporulation of *Aspergillus flavus* sclerotia on natural and artificial substrates. *Fungal Biology*, 116(6), 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.03.003>
- Godana, E. A., Yang, Q., Wang, K., Zhang, H., Zhang, X., Zhao, L., Abdelhai, M. H., & Guillaume Legrand, N. N. (2020). Bio-control activity of *Pichia anomala* supplemented with chitosan against *Penicillium expansum* in postharvest grapes and its possible inhibition mechanism. *Lwt*, 124(December 2019), 109188. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109188>
- Guan, Y., Hu, J., Wang, X., & Shao, C. (2009). Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(6), 427–433. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
- Gueye, M. T., Seck, D., Wathelet, J.-P., & Lognay, G. (2012). Typologie des systèmes de stockage et de conservation du maïs dans l'est et le sud du Sénégal. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 16(1), 49–58.
- Gulbis, K., Bankina, B., Bimšteina, G., Neusa-Luca, I., Roga, A., & Fridmanis, D. (2016). Fungal Diversity of Maize (*Zea Mays* L.) Grains. *Rural Sustainability Research*, 35(330), 2–6. <https://doi.org/10.1515/plua-2016-0001>
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Vaquera-Huerta, H., Martínez-Damián, T., & Delgadillo-Sánchez, F. (2001). Características de Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 90–93.
- Gutiérrez-Martínez, P., Ledezma-Morales, A., Romero-Islas, L. del C., Ramos-Guerrero, A., Romero-Islas, J., Rodríguez-Pereida, C., Casas-Junco, P., Coronado-Partida, L., & González-Estrada, R. (2018). Antifungal Activity of Chitosan against Postharvest Fungi of Tropical and Subtropical Fruits. In *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76095>

- Gutiérrez-Martínez, P., Ramos-Guerrero, A., González-Estrada, R. R., Romanazzi, G., & Landi, L. (2020). Effects of chitosan in the control of postharvest anthracnose of soursop (*Annona muricata*) Fruit. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), 99–108. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio527>
- Hassan, O., & Chang, T. (2017). Chitosan for Eco-friendly Control of Plant Disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, 11(2), 53–70. <https://doi.org/10.3923/ajppaj.2017.53.70>
- He, J., & Zhou, T. (2010). Patented Techniques for Detoxification of Mycotoxins in Feeds and Food Matrices. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2(2), 96–104. <https://doi.org/10.2174/1876142911002020096>
- Hernández, H. (2005). *Influencia de la L-alfa lisofosfatidilcolina sobre las propiedades térmicas y estructurales del almidón de maíz nativo*.
- Hernández-delgado, S., Reyes-lópez, M. Á., García-, J. G., Mayek-pérez, N., Nacional, I. P., De, C., Genómica, B., Piña, E., Mendoza, C. N., Cp, M., Reyes-méndez, C. A., Experimental, C., Bravo, R., Postal, A., Matamoros-reynosa, C., Bravo, R., & Correspondencia, M. C. P. (2007). Incidencia de Hongos Potencialmente Toxígenos en Maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 127–133.
- Ifuku, S. (2014). Chitin and chitosan nanofibers: Preparation and chemical modifications. *Molecules*, 19(11), 18367–18380. <https://doi.org/10.3390/molecules191118367>
- Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M. T., & Said, S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(5), 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.050>
- Jiménez-Mejía, R., Arceo-Martínez, M. T., & Loeza-Lara, P. D. (2018, December 20). Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. *E-CUCBA*, 17–23. <https://doi.org/doi.org/10.32870/e-cucba.v0i9.98>
- Juarez-Morales, L. A., Hernandez-Cocoletzi, H., Chigo-Anota, E., Aguila-Almanza, E., & Tenorio-Arvide, M. G. (2018a). Chitosan-Aflatoxins B1, M1 Interaction: A Computational Approach. *Current Organic Chemistry*, 21(28). <https://doi.org/10.2174/1385272821666170511165159>
- Juarez-Morales, L. A., Hernandez-Cocoletzi, H., Chigo-Anota, E., Aguila-Almanza, E., & Tenorio-Arvide, M. G. (2018b). Chitosan-Aflatoxins B1, M1 Interaction: A Computational Approach. *Current Organic Chemistry*, 21(28). <https://doi.org/10.2174/1385272821666170511165159>
- Juárez-Vázquez, S. B., Silva-Rojas, H. v., Rebollar-Alviter, A., Maidana-Ojeda, M., Osnaya-González, M., & Fuentes-Aragón, D. (2019). Phylogenetic and

- morphological identification of *Colletotrichum godetiae*, a novel pathogen causing anthracnose on loquat fruits (*Eriobotrya japonica*). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(6), 593–598. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00264-2>
- Kato-Yamakake, T. Á., Mapes-Sánchez, C., Mera-Ovando, L. M., Serratos-Hernández, J. A., & Bye-Boettler, R. A. (2009). *ORIGEN MAÍZ*.
- Khan, M. R., & Doohan, F. M. (2009). Comparison of the efficacy of chitosan with that of a fluorescent pseudomonad for the control of *Fusarium* head blight disease of cereals and associated mycotoxin contamination of grain. *Biological Control*, 48(1), 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.014>
- Lizárraga-Paulí, E. G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., & Miranda-Castro, S. P. (2011). Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level b. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6439–6446. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1448>
- Lizárraga-Paulín, E. G., Miranda-Castro, S. P., Moreno-Martínez, E., Lara-Sagahón, A. V., & Torres-Pacheco, I. (2013). Maize seed coatings and seedling sprayings with chitosan and hydrogen peroxide: Their influence on some phenological and biochemical behaviors. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 14(2), 87–96. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200270>
- Lizárraga-Paulín, E. G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., & Miranda-Castro, S. P. (2011a). Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6439–6446. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1448>
- Lizárraga-Paulín, E. G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., & Miranda-Castro, S. P. (2011b). PROTECCIÓN CONTRA ESTRÉS BIÓTICO INDUCIDA POR QUITOSÁN EN PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2, 813–827.
- López, A., Vélez, M., Sánchez, M. S., Bonilla, C. R., & Gallo, P. I. (2006). *Evaluation of vegetable extracts for control of the pathogenic fungi in banana and strawberry in post harvest storage*.
- López-Moya, F., Suarez-Fernandez, M., & Lopez-Llorca, L. (2019). Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 332. <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>
- Lumi-Abe, C. A., Bertechini-Faria, C., Fernandes de Castro, F., Regina de Souza, S., dos Santos, F. C., Novais da Silva, C., Tessmann, D. J., & Barbosa-Tessmann, I. P. (2015). Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15328–15346. <https://doi.org/10.3390/ijms160715328>

- Martínez-Padrón, H., Hernández-Delgado, S., Reyes-Méndez, C. A., & Vázquez-Carrillo, G. (2013). *The Genus Aspergillus and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives*.
- Martínez-Padrón, H. Y., Hernández-Delgado, S., Reyes-Méndez, C. A., & Vázquez-Carrillo, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 1–21.
- Mohamed, A. A., El-Hefny, M., El-Shanhorey, N. A., & Ali, H. M. (2020). Foliar Application of Bio-Stimulants Enhancing the Production and the Toxicity of *Origanum majorana* Essential Oils Against Four Rice Seed-Borne Fungi. *Molecules*, 25(10), 2363. <https://doi.org/10.3390/molecules25102363>
- Moreno-Limón, S., González-Solis, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Avila, M. L., & Perales-Ramírez. (2011). EFECTO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS DE GOBERNADORA (*Larrea tridentata* L.) SOBRE LA INHIBICIÓN in Vitro DE *Aspergillus flavus* y *penicillium* sp. *POLIBOTÁNICA*, 32, 193–205.
- Muhammad, H. K., Apeh, D. O., Muhammad, H. L., Olorunmowaju, Y. B., Ifeji, E., & Makun, H. A. (2019). Mycoflora of Maize in Niger State, Nigeria. *Advanced Research in Life Sciences*, 3(1), 40–45. <https://doi.org/10.2478/arls-2019-0009>
- Niamketchi, L., Chatigre, O., Amane, D., Nyamien, Y., & Ezoua, P. (2015). Descriptive Study of Maize Storage Methods (*Zea Mays*) Used in Rural Environment in Three Zones of Cote D ' ivoire. *Journal of Advanced Research in Agricultural Sciences*, 4(10), 663–672.
- Niaz, I., & Dawar, S. (2009). Detection of seed borne mycoflora in maize (*Zea mays* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41(1), 443–451.
- NOM 247, S. (2008). *Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.* (pp. 1–117).
- Odebode, A., Adekunle, A., Stajich, J., & Adeonipekun, P. (2020). Airborne fungi spores distribution in various locations in Lagos, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(2), 87. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8038-3>
- Ortíz-Rosales, M., Ramírez-Abarca, O., González-Elías, J., & Velázquez-Monter, A. (2014). *Almacenes de maíz en México : tipología y caracterización*. 23, 164–184.
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>

- Pabón-Baquero, D., Velázquez-del Valle, M. G., Evangelista-Lozano, S., León-Rodríguez, R., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2015). Chitosan effects on phytopathogenic fungi and seed germination of *Jatropha curcas* L. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, *XXI*(3), 241–253. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.10.051>
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J. A., Pérez-Berná, A. J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N. D., & Lopez-Llorca, L. v. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, *75*(4), 1021–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
- Parra, R., Aldred, D., Archer, D. B., & Magan, N. (2004). Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(2–3), 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.04.012>
- Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Győri, Z., & Pusztahelyi, T. (2020). *The Aspergilli and their mycotoxins : metabolic interactions with plants and the soil biota*. February, 1–50. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02921>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pitt, J. I., Wild, C. P., Baan, R. A., Gelderblom, W. C. A., Miller, D. J., Riley, R. T., & Wu, F. (2012). *IMPROVING PUBLIC HEALTH THROUGH MYCOTOXIN CONTROL*.
- Rodríguez-Guzmán, C. A., González-Estrada, R. R., Bautista-Baños, S., & Gutiérrez-Martínez, P. (2019). Efecto del quitosano en el control de *Alternaria* sp. en plantas de jitomate en invernadero. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *22*, 1–7. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.161>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S. B., & Sivakumar, D. (2017). Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(3), 579–601. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., & Sivakumar, D. (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, *9*(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02745>
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Gutiérrez Martínez, P., & Alkan, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *122*, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.003>

- Romanazzi, G., Smilanick, J. L., Feliziani, E., & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.003>
- SAGARPA. (2017a). *Boletín mensual: Balanza disponibilidad-consumo*.
- SAGARPA. (2017b). MAÍZ GRANO BLANCO Y AMARILLO MEXICANO. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*, 1(1), 1–28.
- SAGARPA, ASERCA, & CIMA. (2016). *CLARIDADES AGROPECUARIAS: ALMACENAMIENTO EN MÉXICO* (Vol. 271).
- Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A. (2013). Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>
- Sánchez, J. J., Goodman, M. M., & Stuber, C. W. (2000). ISOZYMATIC AND MORPHOLOGICAL DIVERSITY IN THE RACES OF MAIZE OF MEXICO. *Economic Botany*, 54(1), 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- Sanzani, S. M., Nigro, F., Mari, M., & Ippolito, A. (2009). *Innovations in the Control of Postharvest Diseases of Fresh Fruits and Vegetables*.
- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., & Geisen, R. (2013). Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.019>
- Sharif, R., Mujtaba, M., Ur Rahman, M., Shalmani, A., Ahmad, H., Anwar, T., Tianchan, D., & Wang, X. (2018). The Multifunctional Role of Chitosan in Horticultural Crops; A Review. *Molecules*, 23(4), 872. <https://doi.org/10.3390/molecules23040872>
- Shi, Z., Wang, F., Lu, Y., & Deng, J. (2018). Combination of chitosan and salicylic acid to control postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum* in grapefruit fruit. *Scientia Horticulturae*, 233, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.039>
- SIAP. (2018). *Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera* .
- Silva-Aguayo, G. (2002). *CONTROL ORGÁNICO (NATURAL) DE PLAGAS DE LOS GRANOS ALMACENADOS*.
- Torre-hernández, M. E. de, Sánchez-rangel, D., Galeana-sánchez, E., & Plasencia-de, J. (2014). FUMONISINAS –SINTESIS Y FUNCION EN LA INTERACCION fusarium verticillioides - maíz. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77–91.
- Tubbs, T., Baributsa, D., & Woloshuk, C. (2016). Impact of opening hermetic storage bags on grain quality, fungal growth and aflatoxin accumulation. *Journal of*

- UNAM. (2017, November 15). *Procesos tecnológicos de cereales*. Maíz (Zea Mays).
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., & Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.002>
- Vigouroux, Y., Glaubitz, J. C., Matsuoka, Y., Goodman, M. M., Sánchez G., J., & Doebley, J. (2008). Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany*, 95(10), 1240–1253. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800097>
- Wadzani, D. P., Alao, S. E. L., & Musa, H. (2019). Effect of Plant Extracts on Sporulation of *Aspergillus Niger* and *Penicillium chrysogenum*. from Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seeds. *Journal of Food Stability*, 2(1), 43–48. <https://doi.org/10.36400/J.Food.Stab.2.1.2019-0010>
- Waongo, A., Yamkoulga, M., Dabire-Binso, C. L., Ba, M. N., & Sanon, A. (2013). Conservation post-récolte des céréales en zone sud-soudanienne du Burkina Faso : Perception paysanne et évaluation des stocks. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(3), 1157–1167. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v7i3.22>
- Warham, E. J., Butler, L. D., & Sutton, R. C. (2003). *Ensayos para la semilla de maíz y de trigo*.
- Xu, X., Chen, J., Xu, H., & Li, D. (2014). Role of a major facilitator superfamily transporter in adaptation capacity of *Penicillium funiculosum* under extreme acidic stress. *Fungal Genetics and Biology*, 69, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.002>
- Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., Gupta, V. K., & Saxena, A. K. (2018). Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 3–18). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Yin, H., Du, Y., & Dong, Z. (2016). Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: Two similar but different plant elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 7(APR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00522>
- Zhang, H., Li, R., & Liu, W. (2011). Effects of Chitin and Its Derivative Chitosan on Postharvest Decay of Fruits: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 917–934. <https://doi.org/10.3390/ijms12020917>
- Zhu, Y., Hassan, Y. I., Watts, C., & Zhou, T. (2016). Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients-A review of recent

patents. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 19–29.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.030>

Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., & Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2309–2314. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.005>

Zumbado, H. (2002). *Análisis Químico de los Alimentos*.