UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

Departamento Académico de Investigación y Posgrado

Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente

Efectividad biológica de Biosoup® y Tribiosoil® en la reducción de micotoxinas producidas por hongos fitopatógenos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)

Quien presenta

I.A. Luz Adriana Franco Valbuena

Para la obtención del grado

Maestra en Fitopatología y Medio Ambiente

Directoras

Dra. Rocío Velázquez Robledo

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero

Los Mochis, Sinaloa, julio de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el dia 16 del mes junio del año 2023, la que suscribe Luz Adriana Franco Valbuena alumna del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente con número de matrícula 21021200, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de: Dra. Rocío Velázquez Robledo y Guadalupe Arlene Mora Romero y cede los derechos del trabajo titulado **"Efectividad biológica de Biosoup® y Tribiosoil® en la reducción de micotoxinas producidas por hongos fitopatógenos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)."**, a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Luz Adriana Franco V.

Ing. Luz Adriana Franco Valbuena

CamScanner

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: **carta conclusión de tesis para opción de grado.**
Los Mochis Sinaloa, a 16 de junio 2023

Dra. Karla Mariela Sandoval Cota
Jefa del Departamento de Investigación y Posgrado
Unidad Regional Los Mochis
Presente.-

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante: **Luz Adriana Franco Valbuena** Matrícula: **21021200**

Nombre de Tesis: **"Efectividad biológica de Biosoup® y Tribiosoil® en la reducción de micotoxinas producidas por hongos fitopatógenos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)".**

Nombre del Programa Educativo: **Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.**

Atentamente.

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero
Directora de Tesis

CamScanner

UAdeO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

El presente trabajo de investigación titulado **"Efectividad biológica de Biosoup® y Tribiosoil® en la reducción de micotoxinas producidas por hongos fitopatógenos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)"** realizado por la **Ing. Luz Adriana Franco Valbuena** con matrícula: **21021200**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestra en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero
Directora de interna

Dra. Rocío Velázquez Robledo
Directora externa

Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal
Asesora

M.C. Cecilia de Los Ángeles Romero Urías
Asesora

Los Mochis, Sinaloa a 16 de junio de 2023

CamScanner

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de SINQUÍMICA S.A. de C.V. bajo la dirección de la Dra. Rocío Velázquez Robledo y en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Occidente Unidad Regional Los Mochis bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero.

DEDICATORIA

A mi abuelita Fabiola, a mi madre Consuelo y a mis hermanas Sandra y Lina, quienes le dan sentido a mi vida, son ejemplo de fortaleza y nobleza

AGRADECIMIENTOS

Primero gracias a Dios porque su voluntad me ha llevado por este maravilloso camino de la ciencia, a mi familia Valbuena quienes me han acompañado y apoyado en la construcción de mis sueños incondicionalmente. A los compañeros de la Universidad Autónoma de Occidente (UAdeO) y SinQuímica S. A. de C.V. por su hospitalidad y ayuda en el desarrollo de este trabajo. Resaltar el don de gente y servicio de los ciudadanos de Los Mochis, Sinaloa pues su calor humano hizo de mis dos años de estancia una experiencia inolvidable. A Luis Felipe González Concha porque me dio a conocer en este programa de posgrado, pues sus recomendaciones y orientaciones me permitieron estar hoy cumpliendo este logro profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por su apoyo económico durante la realización de mis estudios de posgrado. Al núcleo básico de profesores de la Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente de la UAdeO quienes me compartieron sus conocimientos y las bases necesarias para mi crecimiento profesional, especialmente al Dr. Rubén Félix Gastélum por permitirme hace parte de este programa, por su confianza y consejos que hicieron de mí una mejor profesional y persona. A la Dra. Guadalupe Arlene Mora por su apoyo en la realización de este trabajo, por brindarme su amistad, por enseñarme que la academia y la empatía van de la mano. A la Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal, a la M.C. Cecilia de los Ángeles Romero Urías y al Dr. Luis Gerardo Sarmiento López porque sus contribuciones hicieron de este un mejor trabajo.

Al grupo empresarial Quimia y SinQuímica S. A. de C.V. por el financiamiento de este proyecto y apoyo económico durante mi estancia. A los ingenieros Ernesto Machado y Raymundo Soto por sus contribuciones, al biólogo Juan Alemán del Laboratorio de Suelos por su apoyo en los análisis, a las analistas del Laboratorio de Investigación y Desarrollo Gabriela Soto, Karen Parra y Perla Escalante por su disposición de enseñanza, por su acompañamiento, por su trabajo en equipo, por acogerme y hacerme sentir en casa. A la Dra. Rocío Velázquez Robledo por su confianza, por guiarme y darme las pautas necesarias, por no dejarme sola en los momentos difíciles, por preocuparse por mi bienestar y sobre todo por enseñarme el maravilloso mundo de la micotoxicología. Finalmente, al ingeniero Martín Díaz y al agricultor Adalberto Moreno Rodríguez, sin ellos no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS i

ÍNDICE DE FIGURAS ii

RESUMEN v

ABSTRACT vi

I. INTRODUCCIÓN 1

II. ANTECEDENTES 7

III. JUSTIFICACIÓN 9

IV. HIPÓTESIS 11

V. OBJETIVOS 12

5.1. Objetivo general 12

5.2. Objetivos específicos 12

VI. MATERIALES Y MÉTODOS 13

6.1. Área de estudio 13

6.2. Aislamiento de hongos productores de micotoxinas 15

6.2.1. Preparación de las muestras de suelo 15

6.2.2. Preparación de las muestras de mazorca 15

6.3. Purificación de hongos productores de micotoxinas 17

6.4. Identificación de aislados a nivel de género 17

6.5. Pruebas para detección rápida de micotoxinas 19

6.5.1. Comparación de la intensidad de fluorescencia (Primera etapa) 20

6.5.2. Intensidad de fluorescencia en diferentes medios de cultivo (Segunda etapa) 22

6.6. Preservación de aislados 22

6.6.1. Método de conservación en papel filtro 23

6.6.2. Método de conservación en palillos de dientes 23

6.6.3. Método de conservación en glicerol al 20 % 23

6.6.4. Método de conservación en caldo nutritivo con glicerol al 25 % 24

6.6.5. Método de conservación con suspensión de conidios 24

6.6.6. Reactivación de los aislados 25

6.6.7. Viabilidad de los aislados 26

6.7. Identificación molecular 28

6.7.1. Extracción de ADN 28

6.7.2. Amplificación por PCR punto final 29

6.7.3. Secuenciación y análisis filogenético 30

6.8. Cuantificación de micotoxinas 31

6.8.1. Estandarización metodología para inoculación de semillas de maíz (Fase 1) 31

6.8.2. Inoculación semillas de maíz para cuantificación de micotoxinas (Fase 2) 34

6.9. Pruebas de eficacia de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® 36

6.9.1. Pruebas de antibiosis y micoparasitismo 36

6.9.2. Capacidad antagónica del biofertilizante Tribiosoil® 39

6.10. Estimación de costos 40

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 41

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42

8.1. Aislamiento de hongos productores de micotoxinas 42

8.1.1. Descripción de lote muestreado 42

8.1.2. Aislados obtenidos 43

8.1.3. Pruebas para detección rápida de micotoxinas 44

8.1.4. Descripción de aislados seleccionados 53

8.2. Identificación molecular 56

8.2.1. *Fusarium* spp. 57

8.2.2. *Aspergillus* spp. 62

8.3. Cuantificación de micotoxinas 67

8.4. Pruebas de eficacia de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® 72

8.4.1. Pruebas de antibiosis (para Biosoup®) y micoparasitismo (para Tribiosoil®) 72

8.4.2. Capacidad del biofertilizante Tribiosoil® para reducir la producción de micotoxinas 82

8.5. Estimación de costos 85

IX. CONCLUSIONES 89

X. BIBLIOGRAFÍA 90

ANEXOS 102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de muestreo y los respectivos híbridos de maíz. 14
Tabla 2. Distribución por grupo de *Aspergillus* spp. sembrado. 20
Tabla 3. Medios de cultivo empleados en la primera etapa de la prueba de fluorescencia.....21
Tabla 4. Clasificación de toxicidad empleando la técnica de vapor de amonio.....21
Tabla 5. Medios de cultivo empleados en la segunda etapa de la prueba de fluorescencia 22
Tabla 6. Oligonucleótidos y temperatura de alineamiento empleados para la amplificación. 30
Tabla 7. Descripción de los tratamientos empleados para evaluar condiciones de inoculación. ..33
Tabla 8. Aislados para inoculación y cuantificación de micotoxinas. 35
Tabla 9. Microorganismos benéficos que componen los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil®37
Tabla 10. Tratamientos a evaluar en la prueba de antibiosis.....39
Tabla 11. Tratamientos a evaluar en la capacidad antagónica del biofertilizante Tribiosoil®. 40
Tabla 12. Total de aislados seleccionados con su respectiva codificación. 51
Tabla 13. Colonia y estructuras de los aislados seleccionados 53
Tabla 14. Lecturas de la cuantificación y calidad del DNA extraído.....57
Tabla 15. Características y efecto en la salud al consumir productos contaminados por micotoxinas producidas por *Fusarium* spp. 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plano del sitio de muestreo, lote comercial con siembra de maíz (*Zea mays*). 13
Figura 2. Preparación de cámara húmeda para granos de mazorca de maíz (*Zea mays*).....16
Figura 3. Aislamiento de hongos en hojas de mazorca de maíz (*Zea mays*) 17
Figura 4. Montaje del microcultivo para observación de estructuras 18
Figura 5. Codificación dada para identificar aislados obtenidos. 19
Figura 6. Siembra en agar coco natural con cuatro aislados diferente de *Aspergillus* spp. para pruebas rápida de detección de micotoxinas 20
Figura 7. Conservación de aislados en papel filtro y palillos de dientes 25
Figura 8. Preparación de semillas de maíz para inoculación 32
Figura 9. Inoculación de semillas comerciales de maíz.....34
Figura 10. Envío de muestras a cuantificar.....35
Figura 11. Prueba de antibiosis 38
Digura 12. Síntomas de la pudrición del tallo en el lote muestreado.....42
Figura 13. Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC/g de suelo) presentes por punto muestreado dentro del lote. Muestreos realizados en enero y junio de 2022.....44
Figura 14. Prueba grupal de fluorescencia para aislados obtenidos de *Aspergillus* spp. 45
Figura 15. Prueba grupal de amonio para aislados obtenidos de *Aspergillus* spp. 46
Figura 16. Prueba individual de fluorescencia.....48
Figura 17. Cambios en la fluorescencia para el aislado *Aspergillus* sp. SQSA_8 49
Figura 18. Prueba individual de vapor de amonio al 25 % 52
Figura 19. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados de factor de elongación (EF1) y la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2) regiones génicas de especies del complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*.58
Figura 20. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados de factor de elongación (EF1) y la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2) regiones génicas de especies del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* 60
Figura 21. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes

que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM), regiones de la sección *Cremei* de *Aspergillus* spp. 63
Figura 22. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM), regiones de la sección *Circumdati* de *Aspergillus* spp. 65
Figura 23. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM), regiones de la sección *Nigri* de *Aspergillus* spp. 66
Figura 24. Intensidad de fluorescencia en granos de maíz (*Zea mays*).....68
Figura 25. Intensidad de fluorescencia en granos de maíz (*Zea mays*).....69
Figura 26. Cantidad de micotoxinas producidas por los aislados evaluados 69
Figura 27. Daños en semillas ocasionados por *Fusarium verticillioides* SQSFv_16.. 70
Figura 28. Daños en semillas ocasionados por *Fusarium verticillioides* SQSFv_16. 71
Figura 29. Prueba de antibiosis a las 96 h. Técnica en espiral *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 73
Figura 30. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (% PICR) de *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 en la prueba de antibiosis, técnica en espiral. 74
Figura 31. Prueba de antibiosis a las 96 h. Técnica en espiral *Aspergillus* sp. SQSA_8.....75
Figura 32. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (% PICR) de *Aspergillus* sp. SQSA_8 en la prueba de antibiosis, técnica en espiral. 76
Figura 33. Prueba de antibiosis a las 168 h. Consorcio microbiano versus *Aspergillus* sp. SQSA_8 y *Fusarium verticillioides* SQSFV_16.....79
Figura 34. Micoparasitismo a las 96 h. Confrontación dual con *Trichoderma viride* Q07 versus *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8.....80
Figura 35. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (% PICR). Confrontación dual entre *Trichoderma viride* Q07 versus *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8. 81

Figura 36. Prueba de antibiosis a las 168 h, observación de fluorescencia *Aspergillus* sp. SQSA_8 82
Figura 37. Efecto del biofertilizante Tribiosoil® en la reducción de aflatoxinas producidas por *Aspergillus* sp. SQSA_8 y fumonisinas producidas por *Fusarium verticillioides* SQSFv_16. 83
Figura 38. Semillas de maíz inoculadas con los Hongos Productores de Micotoxinas (HPM) *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8 recubiertas con Tribiosoil® y semillas sin recubrimiento.....84
Figura 39. Costos de aplicación de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® en el ciclo agrícola de un cultivo comercial de maíz (*Zea mays*).....85
Figura 40. Lote comercial de maíz (*Zea mays*) con tratamientos. 85
Figura 41. Medidas vegetativas en estado fenológico R3: grano lechoso. 86
Figura 42. Apariencia interna del lote comercial evaluado.....87
Figura 43. Peso fresco de mazorca de maíz (*Zea mays*).. 88
Figura 44. Presencia de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en el lote comercial evaluado.....88

Efectividad biológica de Biosoup® y Tribiosoil® en la reducción de micotoxinas producidas por hongos fitopatógenos asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)

RESUMEN

Las micotoxinas son producidas por hongos que atacan cultivos agrícolas, estas pueden ocasionar efectos adversos en la salud. Al menos una se encuentra presente en los alimentos de consumo animal y humano. El maíz es un cultivo económicamente importante que es afectado por hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp., los cuales son productores de micotoxinas principalmente de fumonisinas y aflatoxinas, respectivamente. La producción de estas se puede presentar en cualquier momento del desarrollo del cultivo y poscosecha, por lo que su manejo debe realizarse de manera integrada sin perder la calidad del grano dentro del marco de sustentabilidad. De esta manera, se realizó un muestreo de suelo en un lote comercial de maíz para obtener aislados de *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp., con estos últimos se llevaron a cabo pruebas de detección rápida de micotoxinas. Para ambos géneros se seleccionaron los posibles aislados productores de micotoxinas y con estos se inocularon semillas comerciales de maíz para cuantificar la cantidad de toxinas producidas, los dos aislados con mayor cantidad se sometieron a pruebas de antibiosis y micoparasitismo con los componentes biológicos de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil®, también se evaluó la capacidad antagónica de Tribiosoil® en la reducción de micotoxinas producidas por los aislados seleccionados. En las pruebas de antibiosis se obtuvieron porcentajes de inhibición superiores al 80 % a las 144 h de seguimiento y en micoparasitismo del 100 % a las 120 h. Tribiosoil® demostró su capacidad antagónica al reducir el 96 % y el 100 % de aflatoxinas y fumonisinas, respectivamente. Este trabajo permitió demostrar que los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® son una alternativa promisoria para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos micotoxigénicos y en reducir la cantidad de toxinas producidas por estos.

Palabras claves: Biofertilizante, *Aspergillus* spp., aflatoxinas, *Fusarium* spp., fumonisinas, micotoxigénico, inocuidad de alimentos.

Biologic effectiveness by Biosoup® and Tribiosoil® on mycotoxins reduction producing by phytopathogenic fungi associated to maize crop (*Zea mays* L.)

ABSTRACT

Mycotoxins produced by fungi that cause diseases on crops may cause adverse health effects. At least one toxin is present on food and animal feed. Crop maize is economically important and its affected by phytopathogenic fungi as *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp., those are mycotoxins producers like fumonisins and aflatoxins, respectively. Toxins production can occur in any time of crop development and post-harvest, thus, their management must to do it integrated way and a sustainable way without losing kernel quality. In this way, a soil samples was taken from of a maize crop to obtain *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. isolates, whit those last one were carry out rapid detection of mycotoxins test. Were selected isolates of *Fusarium* spp. and *Aspergillus* spp. possible mycotoxins producers then, maize seed were inoculated to quantify the toxins production. The isolates with higher quantities of mycotoxins production were evaluated by antibiosis and mycoparasitism with the biological compounds of Biosoup® and Tribiosoil® biofertilizers. Furthermore, was evaluated Tribiosoil® antagonic capability over reduction of mycotoxins produced by the isolates. Antibiosis test obtained inhibition percentage over 80 % at 144 h of monitoring and the mycoparasitism test raise 100 % inhibition at 120 h. Tribiosoil® reveals its antagonic capability to reduce aflatoxins and fumonisins at 96 % and 100 %, respectively. The investigation results allowed to prove that Biosoup® and Tribiosoil® biofertilizers are a potential alternative to inhibit the phytopatogenic fungi grownth and reduce the quantity of mycotoxins produced by them.

Key words: Biofertilizer, *Aspergillus* spp., aflatoxins, *Fusarium* spp., fumonisins, micotoxigenic, food and feed harmlessness.

I. INTRODUCCIÓN

México, ocupa el puesto número 12 en la producción de alimentos y número 11 en la producción de cultivos a nivel mundial, con un aporte de 675 mil millones de pesos y una producción de 262,5 millones de toneladas, donde tres de las cinco regiones de México, el maíz es el cultivo principal; siendo la zona Noroeste la de mayor superficie sembrada y con la mayor participación en la producción nacional (7,314,339 toneladas y 26,837 millones de pesos; SIAP, 2020). Sinaloa es el estado de mayor producción, con un incremento de 10.7 % (96,4 millones de toneladas) para el 2020, obteniéndose 23,514 millones de pesos y con una participación del 20,1 % en la producción nacional de maíz blanco para consumo humano (López Reyes & Becerra Perez, 2018; SIAP, 2020).

El cultivo de maíz es de importancia en la economía mexicana, ya que forma parte de la base de la alimentación, con un consumo per cápita promedio anual de 335.8 kg, siendo el maíz blanco el que se posiciona en mayor producción con un 86 % y un 24 % de producción para el maíz amarillo, este último destinado para la alimentación de aves y ganado pero no cubre la demanda de consumo nacional; por lo que, México es el primer importador de este tipo de grano (López Reyes & Becerra Perez, 2018; SIAP, 2020).

El grano obtenido del cultivo de maíz es el de mayor demanda a nivel mundial por su consumo directo y amplio rango de alternativas de uso en procesos industriales, ya sea para consumo diario en la dieta básica alimentaria, producción de almidón, fécula de maíz, glucosa, bebidas destiladas, bioetanol, aceite y el uso de maíz nixtamalizado para la preparación de tortillas y botanas como los totopos; así también como la materia prima en la formulación de alimento para animales (aves, ganado, porcinos, ovejas, cabras) que por lo tanto, serán convertidos para consumo humano en forma de carnes, leche y huevos (Martinez & Fernandez, 2019).

El volumen de producción se ve afectado por factores bióticos y abióticos que limitan el desarrollo óptimo del cultivo como es el caso de problemas fitosanitarios principalmente por agentes fitopatógenos de interés económico como, *Fusarium* spp. y *Pythium* spp. causantes de la pudrición del tallo, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. asociados a la pudrición de la mazorca (Castro del Ángel *et al*., 2020; Gonzalez *et al*., 2020); además, de especies

pertenecientes al complejo *Fusarium fujikuroi,* las cuales son contaminantes naturales en el cultivo de maíz (Mohammadi *et al*., 2016).

En ese orden de ideas, es importante mencionar que, especies de los géneros de *Fusarium* y *Aspergillus* no solamente afectan el desarrollo vegetativo y productivo de las plantas de maíz, sino que también producen metabolitos secundarios llamados micotoxinas, las cuales, tienen un impacto negativo en la salud humana y animal al consumir alimentos contaminados por éstas (Da Silva *et al*., 2022).

La afectación ocasionada por estos hongos y su producción de toxinas se puede presentar en diferentes etapas de la cadena productiva del cultivo, ya sea en su desarrollo vegetativo, reproductivo, cosecha y manejo poscosecha, que por condiciones ambientales extremas (temperatura y estrés hídrico), prácticas agrícolas inadecuadas (manejo nutricional inapropiado, uso excesivo de productos químicos, desfase en las fechas de siembra y cosecha), susceptibilidad del cultivo, calidad del suelo que involucra propiedades químicas y físicas que estimulan la producción de micotoxinas y a su vez incrementa la presencia de estas en el grano de maíz que será procesado y consumido (Leite *et al*., 2021).

Alimentos derivados del maíz pueden estar contaminados con micotoxinas de los grupos fumonisinas (FB1, FB2, FB3) y tricotecenos (deoxinivalenol, toxina T2 y toxina HT2) producidas por especies del género *Fusarium,* por otra parte, se encuentran las ocratoxinas y aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2) producidas por especies de *Aspergillus,* siendo la AFB1 considerada la más agresiva y clasificada como cancerígena, mientras que las fumonisinas son clasificadas como posiblemente cancerígenas y los tricotecenos no se clasifican como cancerígenos según la Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés).

A pesar de que los tricotecenos no son catalogados como cancerígenos, no significa que no afecten la salud de los consumidores, pues su ingesta como es el caso de las micotoxinas de tipo deoxinivalenol producen alteraciones que inducen vómito, diarrea, necrosis cutáneas, taquicardia y toxicidad en los sistemas sanguíneo y nervioso (Da Silva *et al*., 2022). En otras palabras, los

diferentes tipos de micotoxinas (400 reportadas) ocasionan toxicidad en órganos pertenecientes a los sistemas nervioso, digestivo, urinario, endocrino, cardiovascular, reproductivo, son capaces de inducir teratogénesis y carcinogénesis en los consumidores de alimentos contaminados por estas (Ostry *et al*., 2017; Pitt *et al*., 2012).

En consecuencia, alrededor de mundo y a través de la historia se han reportado enfermedades tanto en humanos como en animales causadas por la ingesta de alimentos contaminados por micotoxinas. En humanos se conoce el ergotismo en la Edad Media, la enfermedad letal aleukia alimentaria tóxica en la Unión Soviética entre 1940 y 1950, ocasionada por el consumo de cereales contaminados por la toxina T2 producida principalmente por *F. sporotrichioides* (Krska *et al*., 2012). El eccema facial en ovejas por el consumo de pasto contaminado con esporidesmina producida por *Pithomyces chartarum*, descubierta en 1950 y aún afecta la industria ovejera en Nueva Zelanda. En 1960 se presentó en Inglaterra la enfermedad X del pavo por la ingesta de alimento para animal preparado con harina de maní contaminada por aflatoxinas producidas por *A. flavus, A. parasiticus* y *A. nomius* (Krska *et al*., 2012; Daou *et al*., 2021; Leslie *et al*., 2021).

La enfermedad masiva o estaquibotriotoxicosis provocada por la estaquibotriotoxina producida por el moho negro *Stachybotrys atra*, afectó humanos e indujo la muerte de miles de caballos en la Unión Soviética en 1930, más tarde (1965) en Estados Unidos se observaron brotes de esta enfermedad en caballos y otros animales (aves de corral, porcinos y bovinos), estos brotes estaban relacionados con una condición que afectaba al cultivo de maíz llamada toxicosis del maíz mohoso, en donde el Dr. Forgacs determinó que la causa de los problemas económicos y de salud en animales y humanos estaban ligados a hongos micotoxigénicos (Krska *et al*., 2012).

Se han reportado padecimientos en la salud humana por la ingesta de alimentos contaminados por micotoxinas como, la intoxicación con arroz amarillo (Shoshin-Kakke) en Japón que provocó beriberi cardíaco agudo, la enfermedad Onyalai en África, la enfermedad akakabibyo en Oriente, enfermedades renales crónicas, toxicidad hepática en Algeria, mortalidades en India y África. En afectación sobre la salud animal se conocen, la aflatoxicosis, síndromes tremorgénicos en porcinos, ovinos y caninos, leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en porcinos, síndromes hemorrágicos en aves de corral (Krska *et al*., 2012; Shekhar *et al*., 2017; Leslie *et al*., 2021).

De esta manera, para restringir el consumo de alimentos contaminados por micotoxinas, en diferentes países se tienen establecidos límites que permiten cierta cantidad de toxinas en productos alimenticios para consumo humano y animal, como es el caso de la Unión Europea que permite entre 2 - 4 µg/kg de AFB1, por otra parte en Suramérica se admiten alimentos contaminados con un promedio de 11 µg/kg de AF y 5 µg/kg para ocratoxinas, en Centroamérica 20 µg/kg de AF y en Norteamérica (Estados Unidos y Canadá) 1000 µg/kg para deoxinivalenol y 500 µg/kg para fumonisinas (Kumar *et al*., 2018). En México el límite permitido de AF es de 20 µg/kg en alimentos para consumo humano y 12 µg/kg para harina de maíz nixtamalizado según la NOM-247-SSA1-2008; Kumar *et al*. (2018) reporta un límite de 200 µg/kg en alimentos a base de maíz para consumo animal en México.

Estas micotoxinas se ven favorecidas por el uso excesivo de fertilizantes mineralizados y de productos químicos empleados en el manejo agronómico y fitosanitario del cultivo de maíz, además que su producción se puede presentar durante las diferentes etapas del cultivo, así como en poscosecha y durante el almacenamiento de los granos (Da Silva *et al*., 2022), por lo que, para reducir la producción de estas es conveniente realizarlo dentro del marco de manejo integrado de cultivos que involucren buenas prácticas agrícolas, debido a características que poseen las micotoxinas en cuanto a termoestabilidad y capacidad de acumulación en los tejidos (Daou *et al*., 2021; Logrieco *et al*., 2021). Por lo anterior, su manejo debe orientarse bajo el concepto de prevención desde la preparación de suelo hasta el almacenamiento del grano de maíz, para así evitar o minimizar la presencia de hongos fitopatógenos micotoxigénicos y la prevalencia de micotoxinas en alimentos que serán consumidos al final de la cadena productiva.

Las prácticas adecuadas para esto son: 1) en campo: rotación de cultivos, densidad de siembra apropiada, buena calidad de semilla, uso de híbridos con tolerancia a enfermedades; preparación y calidad del suelo para mejorar las propiedades físico-químicas y microbiológicas; 2) durante el desarrollo del cultivo: uso eficiente de fertilizantes, riegos adecuados y oportunos, control de maleza e insectos plaga, detección temprana de hongos fitopatógenos, control químico responsable y uso de controladores biológicos; 3) cosecha y secado: realizarla oportuna y rápidamente, secado rápido para alcanzar el contenido de humedad deseado, barreras físicas entre el cultivo y la cosecha en caso de secarse bajo el sol, prevención de daño en los granos, uso de maquinaria y equipos

desinfestados, inspección visual objetiva, eliminación de material vegetal contaminado, manejo de residuos vegetales; 4) poscosecha; control de temperatura y humedad (< 14 %) en el almacenamiento, manejo de buenas prácticas durante el almacenamiento, manejo de ventilación, almacenamiento por periodos cortos; 5) procesamiento y descontaminación: empleo de métodos físicos, químicos y biológicos (Krska et al., 2012; Vanhoutte *et al*., 2016; Palumbo *et al*., 2020; Daou *et al*., 2021; Logrieco *et al*., 2021).

Para descontaminar y desintoxicar los alimentos de micotoxinas existen métodos físicos que consisten en la clasificación, lavado, descascarillado, cocción por extrusión, irradiación, plasma frío, desintoxicación fotocatalítica, nixtamalización, calentamiento con vapor, con infrarrojos, con microondas y radiofrecuencia; los métodos físicos no involucran químicos y son efectivos con algunas micotoxinas, pero estos son imprácticos, costosos y pueden alterar el color y calidad de los alimentos (Magan & Olsen, 2004; Daou *et al*., 2021; Carvajal-Moreno, 2022).

Los métodos químicos emplean ácidos orgánicos, ácido clorhídrico, hidróxido de amonio, peróxido de hidrógeno, bisulfato de sodio, tratamientos con clorina, ozono, formaldehído y extractos naturales. Estos métodos son asequibles y efectivos; sin embargo, pueden tener efectos sobre la salud, la formación de bioproductos, enmascaran las micotoxinas, mejoran la biodisponibilidad de las micotoxinas y son tóxicos con el ambiente (Palumbo *et al*., 2020; Daou *et al*., 2021).

En cuanto a la descontaminación y desintoxicación mediante métodos biológicos se utilizan hongos, bacterias, levaduras y algas (Vanhoutte *et al*., 2016; Palumbo *et al*., 2020; Daou *et al*., 2021; Carvajal-Moreno, 2022); este tipo de manejo es efectivo en la reducción en la producción de micotoxinas, es económico y ambientalmente amigable que no involucra componentes químicos; sin embargo, uno de sus mayores cuestionamientos es sobre su efectividad en campo. En ese sentido, se han realizado investigaciones tanto a nivel *in vitro* como en invernadero con aplicaciones de agentes de biocontrol (microbiales) como biotransformadores del agrosistema, tal es el caso de bacterias como *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., levaduras, hongos como *Trichoderma* spp*., Clonostachys rosea,* entre otros consorcios microbianos y productos comerciales no químicos, los cuales han presentado una reducción superior al 70 % en cuanto la producción de micotoxinas (Shi *et al*., 2013; Verheecke *et al*., 2015; Chourasia, 2016; Sivparsad

& Laing, 2016; Samsudin *et al*., 2017; Siahmoshteh *et al*., 2017; Lagogianni & Tsitsigiannis, 2019; Pellan *et al*., 2020).

Por lo anterior, es importante continuar con investigaciones que aporten alternativas de manejo amigables con el ambiente para disminuir la producción de micotoxinas e implementar manejos integrados de cultivo, cosecha y poscosecha que permitan un uso eficiente y racional de los recursos de manera que, se evite la pérdida de la calidad del suelo, incremente la población de microorganismos benéficos y permita entregarle al consumidor final alimentos libres o con cantidades mínimas permitidas de micotoxinas (Patibanda y Ranganathswamy, 2017).

II. ANTECEDENTES

Aspergillus spp. producen varios grupos de micotoxinas como, citreoviridina (CTV), ácido ciclopiazónico (CPA), ácido kojic (KA), viomelleina (VIOM), vioxantina (VIOX), xantomegnina (XATH), gliotoxina (GT), esterigmatocistina (STG), ocratoxina B (OTB), ocratoxina A (OTA) y aflatoxinas (AF) (Da Silva *et al*., 2022; Weidenbörner, 2017), siendo las ocratoxinas y aflatoxinas con las que se han realizado trabajos de investigación enfocados en la biodegradación o inhibición en la biosíntesis de estas moléculas tóxicas.

Bacillus subtilis CW 14, es un microorganismo benéfico evaluado en pruebas *in vitro*, observándose una biodegradación del 47.1 % de ocratoxinas y hasta de un 33.3 % en la inhibición de la tasa de crecimiento de *A. carbonarius* y *A. ochraceus,* especies productoras de ocratoxinas, siendo entonces un agente promisorio de biocontrol para mitigar la producción de este tipo de micotoxinas (Shi *et al*., 2013).

Otras especies de *Bacillus* han demostrado su efectividad antifúngica y antimicotoxigénica tanto en pruebas *in vitro* como en semillas de pistacho (*Pistacia vera*). Se observó que a los cinco días de inoculación inhibió el crecimiento de *A. parasiticus* y a los ocho días las aflatoxinas totales se redujeron en un 54.9 % con aplicaciones de *B. amyloliquefaciens* y del 52.5 % con aplicaciones de *B. subtilis* (Siahmoshteh *et al*., 2017). Así mismo, Chourasia (2016), evaluó siete cepas de bacterias, en donde *B. megaterium* presentó la mayor inhibición del crecimiento de *A. flavus* y su producción de aflatoxinas en el cultivo de cacahuate.

También, se han desarrollado ensayos con cepas de *Streptomyces* sp. como complemento en las aplicaciones para el biocontrol de aflatoxinas en el cultivo de maíz, debido al antagonismo que ejerce cuando entra en contacto con *A. flavus* y que induce a la reducción del contenido de aflatoxinas de tipo B (AFB1) con una concentración residual por debajo del 17 % y una reducción de hasta el 76.6 %, así mismo como su potencial para prevenir la acumulación de estas (Verheecke *et al*., 2015).

Sivparsad & Laing (2016) evaluaron la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* T77 sobre *A. flavus*, en ensayos de invernadero y de campo, en cultivo de maíz (estado R1: floración femenina). Realizaron aplicaciones de este agente de biocontrol y se logró ver el micoparasitismo de *T. harzianum* como modo de acción sobre la tasa de infección de *A. flavus* en granos de maíz.

Finalmente Lagogianni & Tsitsigiannis (2019), realizaron el primer trabajo que demostró a nivel *in vitro* y en campo, el potencial de productos comerciales no químicos para disminuir en un 21.9 % la severidad de la pudrición de la mazorca del maíz ocasionada por *A. flavus,* en reducir la producción de conidios de este patógeno en un 63.1 % y en un 43.1 % su producción de AFB1 en semillas de maíz; para esto, se evaluó un consorcio microbiano compuesto por *T. harzianum*, *Aureobasidium pullulans*, *S. griseoviridis, B. subtilis*, un mineral aluminosilicato microporoso (zeolita) y laminarina, el cual es un glucano almacenado de *Laminaria digitata.*

Por otra parte, se han reportado micotoxinas de tipo beauvericina (BEA), ácido fusárico (FA), fusarin C (FUS-C), moniliformina (MON), toxina HT-2 (HT-2), acetyldeoxynivalenol (AcDON), fusarenon-X (FUS-X), nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA) y fumonisinas (FUM) (Da Silva *et al*., 2022; Weidenbörner, 2017), donde los trabajos relacionados para reducir la producción de micotoxinas han sido enfocados con las toxinas de tipo DON; ZEA y FUM. Por lo anterior, se publicó el primer estudio detallado sobre el papel antagónico sobre *Fusarium verticillioides* con dos agentes de biocontrol: *Clonostachys rosea* y una bacteria gramnegativa en diferentes estados de desarrollo de la mazorca de maíz, considerando factores determinantes en la biotransformación, a la temperatura y la actividad del agua (Aw), teniendo con la bacteria una reducción del 46.1 % y para *C. rosea* un 73.1 % de reducción de fumonisinas tipo B (FB1) (Samsudin *et al*., 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

El maíz es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial por su demanda para consumo humano como animal, además, forma parte del sector industrial para obtención de bioetanol y de aceites comestibles. Este grano forma parte de la canasta básica familiar alrededor del mundo, es un cultivo de interés económico para países desarrollados y en desarrollo, pues su producción influye de manera directa en el producto interno bruto como es el caso de México, país de origen de este grano, en donde, el estado de Sinaloa es el de mayor producción.

Sin embargo, este cultivo es afectado por enfermedades ocasionadas por *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. que causan la pudrición del tallo y la pudrición de mazorca, respectivamente, al mismo tiempo son productores de micotoxinas. Lo anterior, no sólo afecta el rendimiento del maíz tanto en campo como en grano almacenado, también ocasiona pérdidas económicas a los productores de este grano, además del riesgo de afectaciones en la salud humana y animal por la ingesta de productos contaminados con micotoxinas. De esta manera, es importante mencionar que, las fumonisinas y las aflatoxinas además de ser consideradas como carcinogénicas también promueven enfermedades en el hígado, riñones, causan efectos teratogénicos, además de ser causantes de la leucoencéfalomalacia equina y el edema pulmonar porcino.

Lo anterior, son algunos de los ejemplos de problemas en la salud humana y animal por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas, pues su ingesta causa hemorragias internas, dermatitis severa, necrosis superficial e interna en los tejidos corporales, entre otros padecimientos a causa de su consumo. La prevalencia de micotoxinas a nivel mundial es superior al 80 % y la exposición de riesgo de consumirlas se encuentra entre el 60 y 90 %, lo anterior, indica que nos enfrentamos ante una crisis mundial en cuanto a calidad y consumo de alimentos que repercute en la salud de los consumidores.

Por la magnitud de este problema y las consecuencias del cambio climático es necesario proponer alternativas de manejo sustentables y amigables al ambiente, desde el campo para minimizar la producción de las micotoxinas asociadas al cultivo de maíz, debido a que el manejo convencional ha sido una opción, su práctica ha inducido a la resistencia de estos fitopatógenos, así mismo

mejorar el microbioma benéfico del suelo, las propiedades organolépticas y calidad del producto final; además, es necesario considerar el impacto del cambio climático que influye de manera directa en la adaptación de estos microorganismos por las alteraciones a los factores bióticos y abióticos del agroecosistema.

Las investigaciones realizadas con hongos y bacterias antagónicas han demostrado que el uso de agentes de biocontrol son una alternativa para la biotransformación del suelo, biodesintoxicación y biodescontaminación de micotoxinas producidas por hongos, así como inhibir el desarrollo de estos fitopatógenos que afectan al cultivo de maíz como es el caso de *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp.

Por lo anterior, este trabajo propone una alternativa de manejo biológica necesaria de incorporar en la cadena productiva de maíz, desde el establecimiento y durante el desarrollo del cultivo, con la finalidad de entregarle al consumidor final un alimento saludable bajo una comercialización responsable dentro de los criterios de salud pública, con la finalidad de reducir los casos de toxicidad en animales y humanos. Además, este tipo de prácticas que hacen parte del manejo integrado de cultivos permiten potencializar la agricultura a través de adopciones tecnológicas, las cuales brindan un valor agregado que se ve reflejado en incremento de la productividad del cultivo en pro a la competitividad del sector agropecuario.

IV. HIPÓTESIS

Las aplicaciones de Biosoup® y Tribiosoil®, productos desarrollados por SINQUÍMICA S.A. de C.V., pueden mejorar la fitosanidad del suelo disminuyendo la presencia de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.).

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar en condiciones *in vitro* la efectividad biológica de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® para reducir la producción de micotoxinas de hongos fitopatógenos aislados de un cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en el Norte de Sinaloa, México.

5.2. Objetivos específicos

- Obtener aislados de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas a partir de un lote comercial de maíz.

- Caracterizar molecularmente los aislados de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas.

- Cuantificar las micotoxinas producidas por los aislados de hongos fitopatógenos obtenidos.

- Evaluar en condiciones *in vitro* la capacidad antagónica de Biosoup® y Tribiosoil® sobre hongos fitopatógenos y su efecto en la producción de micotoxinas.

- Estimar los costos asociados a la aplicación de Biosoup® y Tribiosoil® como estrategia de manejo de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas en un lote comercial de maíz en el Norte de Sinaloa.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El lote de estudio presenta un área total de 5.41 ha, de esta se tomaron 1.42 ha para delimitar los seis puntos de muestreo **(Tabla 1)**, este lote se encuentra a 1.30 km del ejido Francisco R. Serrano y a 35.40 km del municipio de Guasave en el estado de Sinaloa. El lote evaluado limita al noroeste con la vía principal y cuenta con dos canales de riego, uno hacia el sur y el otro hacia este; finalmente hacia el norte limita con un lote de finalidad agrícola **(Figura 1).**

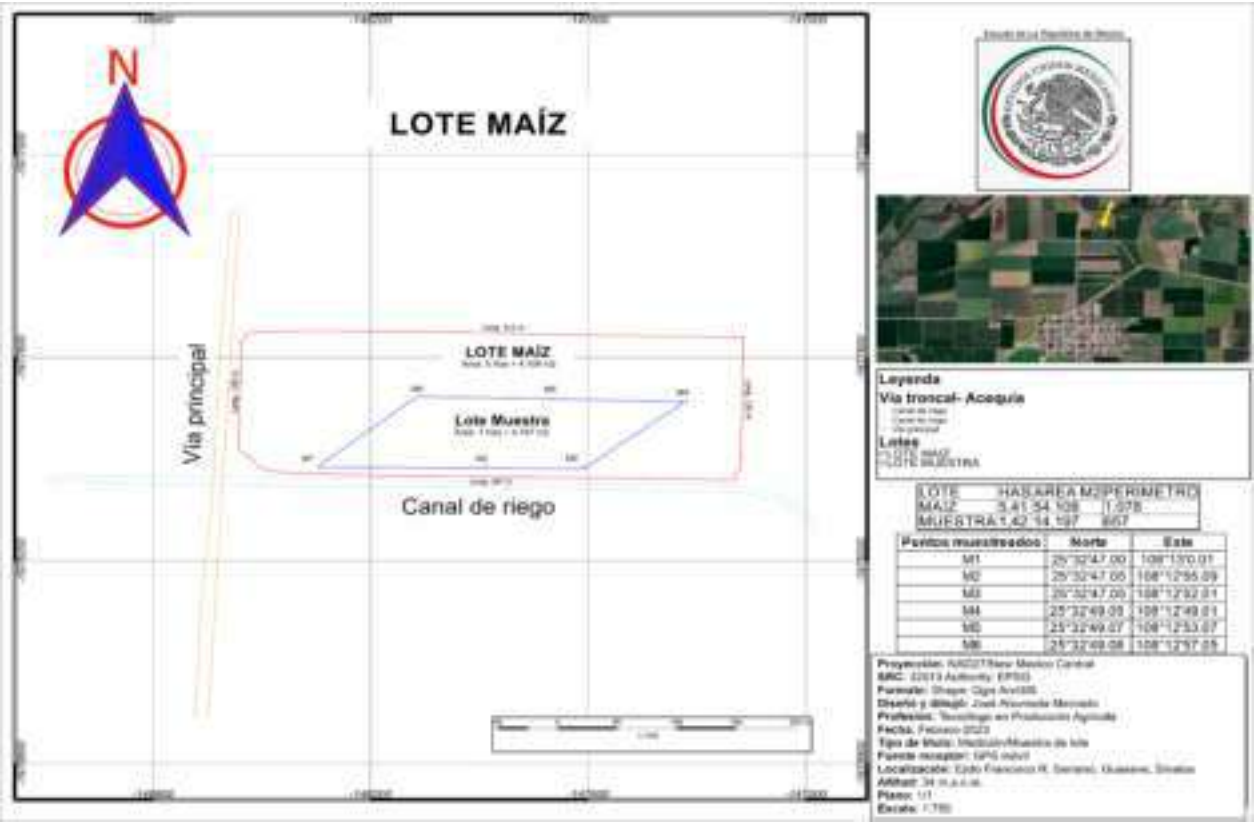


Figura 1. Plano del sitio de muestreo, lote comercial con siembra de maíz (*Zea mays*).

Este lote se encuentra a una altura de 34 msnm con temperatura promedio de 37 °C y máxima reportada de 45 °C en época verano. La velocidad del viento es de 2 m/s y la precipitación promedio anual es de 392.8 mm (Gobierno de Guasave, 2017); por lo que el lote ha sido utilizado para fines agrícolas como es la siembra comercial de maíz, donde el requerimiento hídrico del cultivo lo

suplen mediante riego rodado abastecido por módulo 742 de Guamúchil, el cual otorga un riego de asiento y tres de auxilio durante el ciclo agrícola.

Previo a los muestreos se realizó una entrevista al productor (**Anexo 8**) con la finalidad de conocer el manejo del cultivo, principales características y la historia del lote. El trabajo de campo se llevó a cabo durante los ciclos agrícolas otoño-invierno de los años 2021, 2022 y 2023; se realizaron en total cinco muestreos de suelo, dos en la trilla, uno al momento en la soca, uno en la etapa fenológica V8 (ocho hojas) y otro en R3 (grano lechoso). El muestreo para el aislamiento de los microorganismos de interés se realizó en junio de 2022 en el estado R7 (cosecha), al momento de la trilla, en seis puntos **(Tabla 1)** distribuidos sobre el perímetro de la zona de muestreo dentro del lote **(Figura 1).**

En cada punto se tomaron muestras compuestas de suelo en la zona de goteo a 20 cm de profundidad y se desprendieron de manera manual seis mazorcas por planta. Las muestras se etiquetaron y se almacenaron en bolsas de polipropileno a temperatura ambiente para ser llevadas hasta el laboratorio de Investigación y Desarrollo de SINQUÍMICA S.A. de C.V para su procesamiento.

Tabla 1. Puntos de muestreo y los respectivos híbridos de maíz.

Muestra	Latitud (N)	Longitud (W)	Híbrido
M1	25°32'47.5"	108°13'00.1"	
M2	25°32'47.5"	108°12'55.9"	Brevant (B-3787)
M3	25°32'47.5"	108°12'52.1"	
M4	25°32'49.5"	108°12'49.1"	
M5	25°32'49.7"	108°12'53.7"	Brevant (B-3788)
M6	25°32'49.8"	108°12'57.5"	

6.2. Aislamiento de hongos productores de micotoxinas

6.2.1. Preparación de las muestras de suelo

Por cada muestra individual, se pesaron 10 g de suelo y se agregaron a un frasco con 90 mL de agua purificada estéril (APE) + 0.05 % de Tween® 80, se agitaron por 30 minutos para homogenizar la muestra y a partir de esta (solución madre o solución stock) se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5}, en la campana de flujo laminar. Lo anterior, consistió en tomar 1 mL de la solución madre y agregarlo a un tubo de ensayo con 9 mL de APE (dilución 10^{-1}), se homogenizó en vortex (Gene 2 modelo No. 560) por 30 segundos y se procedió a obtener la siguiente dilución (10^{-2}), de esta manera hasta llegar a 10^{-5}.

Al finalizar, se agitaron en vortex por diez segundos cada dilución y se tomaron 100 µL para sembrarlos por extensión sobre placas de Papa Dextrosa Agar (PDA: BD Difco™ Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) suplementado con clorhidrato de oxitetraciclina (cuprimicina agrícola 5 % HYPER®, Ciudad de México, México) y Triton X-100 al 0.05% (Octoxynol, 5 mL/L, M.R. de ROHM & HAAS; Zapopan, Jalisco), luego se rotularon y se incubaron a 27 $\pm$ 2 °C por aproximadamente cinco días o hasta obtener las colonias de los hongos.

6.2.2. Preparación de las muestras de mazorca

De las mazorcas de maíz provenientes del lote de muestreo, se desgranaron y se seleccionaron granos afectados y con apariencia sana **(Figura 2a).** Se realizó el tren de desinfección de acuerdo a la metodología sugerida por Mezzalama *et al.* (2015), la cual consistió en ubicar los granos dentro de un matraz de 250 mL con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO al 3 %), etanol (C_2H_6O al 10 %) y tres gotas de Tween® 20, este se agitó en vortex por 10 minutos a 250 rpm, después se eliminó la solución y se les realizó un triple lavado a los granos con agua purificada estéril, esto último dentro de la campana de flujo laminar.

Luego, se preparó una solución con NaClO al 0.05 % para sumergir papeles filtro (Whatman No. 1) durante de 30 a 60 segundos **(Figura 2b)**, se retiraron y se escurrieron los papeles para eliminar

el exceso de la solución. Posteriormente se colocaron tres papeles filtro en la base de cajas Petri estériles y sobre estos se dispusieron los granos de maíz previamente desinfestados; por último, se creó una cámara húmeda con algodón impregnado con glicerol al 25 % **(Figura 2c)**. Se sellaron los recipientes y se incubaron a 27 ± 2 °C por 48 h, se almacenaron en congelador por 24 h y se incubaron nuevamente a 27 ± 2 °C por 15 días (Mezzalama *et al*., 2015).

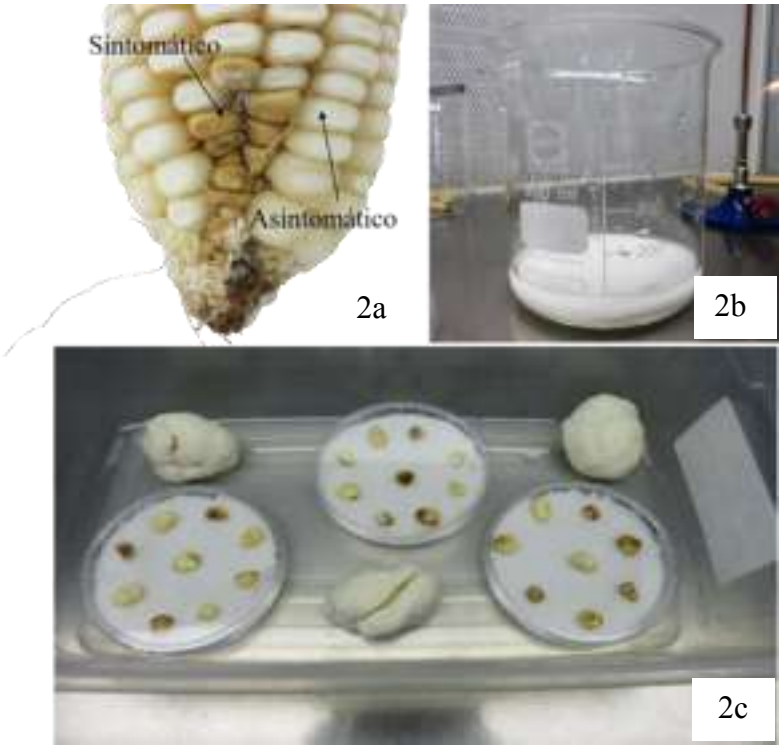


Figura 2. Preparación de cámara húmeda para granos de mazorca de maíz (*Zea mays* L.). **(2a)** Mazorca con granos sintomáticos y asintomáticos; **(2b)** Papel filtro sumergido en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.05 %; **(2c)** Granos de maíz dispuestos sobre papel filtro en caja Petri en cámara húmeda (Fotografías: de la autora).

A las hojas de las mazorcas se les realizó un corte de 1 cm^2 en las zonas del tejido afectado, posterior se sumergieron cinco minutos en NaClO al 0.5 %, se lavaron tres veces con APE, se sumergieron en etanol al 70 % **(Figura 3a)** y se lavaron nuevamente con APE. Posteriormente, los cortes de las hojas se colocaron sobre un papel absorbente para su secado y una vez secas se sembraron en PDA suplementado con cuprimicina **(Figura 3b)** y se incubaron a 27 ± 2 °C por 48 h.

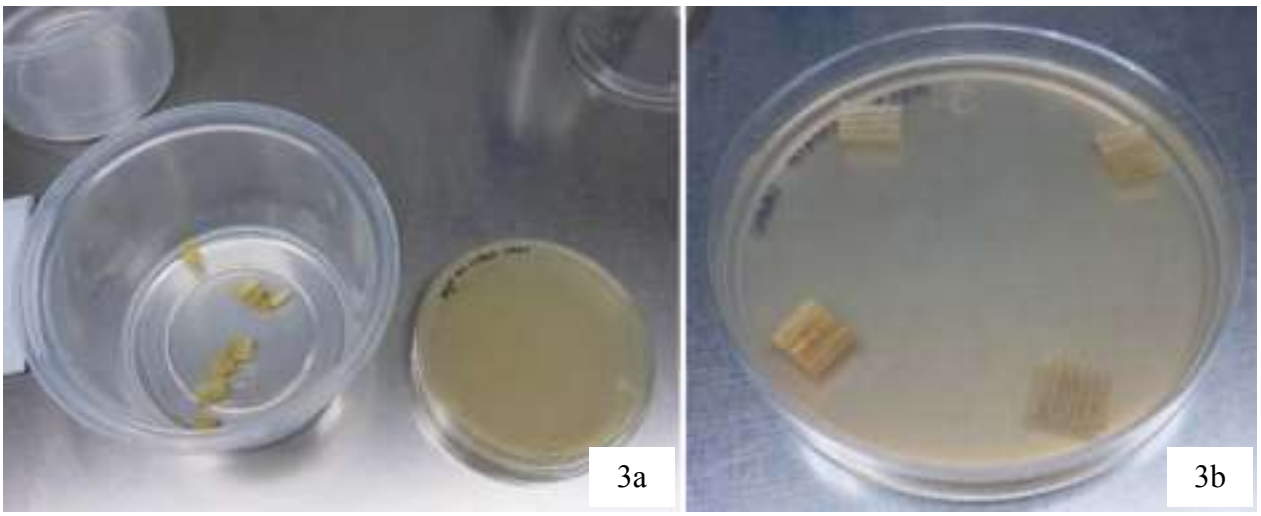


Figura 3. Aislamiento de hongos en hojas de mazorca de maíz (*Zea mays* L.). (**3a**) Tratamiento para desinfestar tejido; (**3b**) Siembra de hojas de mazorca en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar + cuprimicina (Fotografías: de la autora).

6.3. Purificación de hongos productores de micotoxinas

Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras procesadas y descritas con anterioridad, se transfirieron colonias características a los géneros de *Fusarium* y *Aspergillus,* a nuevo medio PDA, incubándose de nuevo hasta su desarrollo y para su purificación se siguió el método de cultivos monoconidiales según Crous *et al*. (2009, 2021) y Leslie & Summerell (2006).

Después de siete días de crecimiento del hongo se suspendieron los conidios en 10 mL de APE. De la suspensión, se le realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-2} y 10^{-3}, se sembraron por extensión 100 µL de la suspensión en cajas Petri con medio de cultivo agar agua. Las cajas se incubaron a 27 $\pm$ 2 °C por 24 h a luz constante; transcurrido este tiempo se revisaron las siembras al microscopio estereoscópico (Luxeo 4D) y se tomó un sólo conidio germinado con una aguja de calibre 25G y longitud de 5/8”, la cual se flameó previamente. El conidio germinado se sembró en PDA y se incubó a 27 $\pm$ 2 °C por 48 h a luz constante.

6.4. Identificación de aislados a nivel de género

Se realizaron microcultivos, ubicados dentro de una caja de Petri, creando una cámara húmeda con papel absorbente humedecido con glicerol al 25 %. Luego se ubicaron portaobjetos en forma de

cruz y sobre los extremos (lado derecho y lado izquierdo) se dispusieron discos de PDA con 13 mm de diámetro recubiertos con micelio del hongo con siete días de incubación, después, se ubicó un cubreobjetos sobre cada disco **(Figuras 4a – 4c)** y se incubó por 27 $\pm$ 2 °C.

Posteriormente, entre las 24 y 48 h siguientes al tiempo de incubación, se verificó la presencia de estructuras fúngicas bajo un microscopio compuesto (Axio Lab. A1 Zeiss) a 40 X. Para esto se depositaron 10 µL de azul de lactofenol en un portaobjetos y sobre este se ubicó el cubreobjetos **(Figura 4d)** empleado en el microcultivo (Guerra *et al*., 2019).

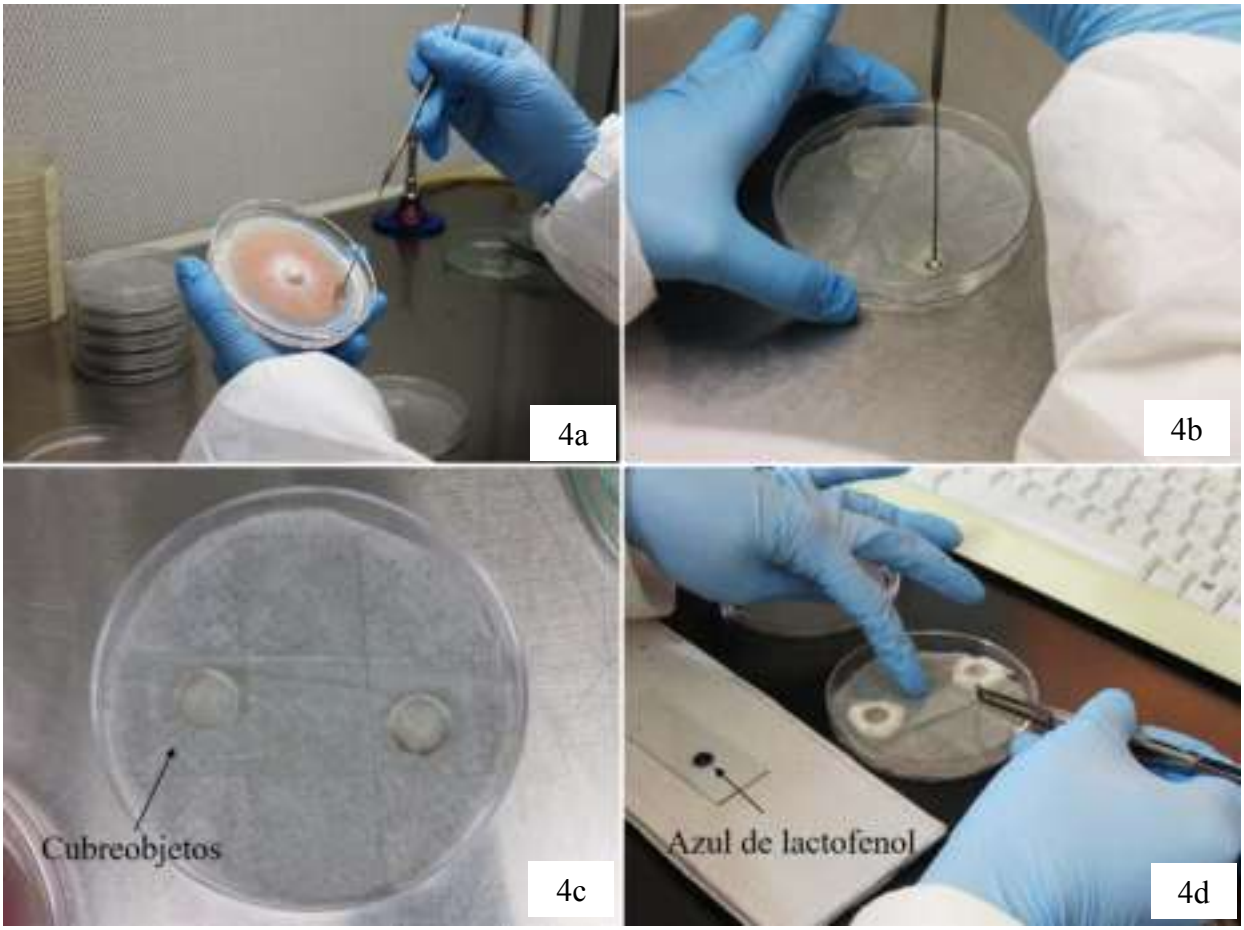


Figura 4. Montaje del microcultivo para observación de estructuras. (**4a**) Recolecta de micelio con asa bacteriológica; (**4b**) Recubrimiento del borde del disco de Papa Dextrosa Agar (PDA) con el micelio recolectado; (**4c**) Microcultivo; (**4d**) Desprendimiento del cubreobjetos para observar estructuras en el microscopio (Fotografías: de la autora).

Por otra parte, las estructuras morfológicas se describieron teniendo en cuenta las características descritas por Crous *et al*. (2009); Frisvad & Samson (2004); Samson *et al*. (2014), las cuales

permitieron identificar los aislados de *Aspergillus* spp., y Leslie & Summerell (2006) y (Crous *et al*., 2021) para los de *Fusarium* spp., con los aislados seleccionados se realizaron las pruebas posteriores para determinar si producían micotoxinas.

Se asignaron códigos para cada aislado seleccionado de manera que, permitiera identificar su a) dominio, b) zona de la que fue aislado: suelo, grano u hoja, c) género identificado en microcultivo, d) especie identificada a nivel molecular y e) consecutivo dado durante el aislamiento **(Figura 5)**. De esta manera, se codificaron los aislados con los cuales se llevó a cabo el presente trabajo y se seguirán mencionando en el documento.

Figura 5. Codificación dada para identificar aislados obtenidos.

6.5. Pruebas para detección rápida de micotoxinas

Esta prueba sólo se realizó para los aislados obtenidos de *Aspergillus*, por la naturaleza química de las moléculas de las micotoxinas que producen, tipo aflatoxinas y ocratoxinas, las cuales se excitan bajo la luz UV a 365 nm (Vanhoutte *et al*., 2016; Suzuki & Iwahashi, 2016), por lo que, como criterio de selección se estableció que, el aislado que emitiera fluorescencia dentro del conjunto de *Aspergillus* aislados se continuaba con las pruebas posteriores y los que no se descartaron.

Este escrutinio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la siembra de los aislados obtenidos de *Aspergillus* en agar coco y PDA (**Tabla 3**), para comparar entre ellos cuáles emitían fluorescencia en los diferentes medios. La segunda etapa se basó en utilizar solamente el medio de cultivo PDA, pero suplementado con carbón activado y β-ciclodextrina (**Tabla 5**), para intensificar la fluorescencia de los aislados seleccionados en la primera etapa.

6.5.1. Comparación de la intensidad de fluorescencia (Primera etapa)

Inicialmente, se prepararon cajas Petri con tres tipos de medio de cultivo **(Tabla 3; Anexo 1)**, Agar Coco Natural, Agar Coco Natural Suplementado con Carbón Activado (**Tabla 3**) y PDA (**Tabla 5**), en cada una de ellas se sembraron discos de 6 mm de diámetro de cuatro aislados diferentes de *Aspergillus*, con siete días de crecimiento (un disco por aislado ubicado en cada punto cardinal de la caja **(Figura 6)**; cuatro aislados diferentes por cada caja), se incubaron a 27 $\pm$ 2 °C por 48, 120 y 168 h en oscuridad total (Lin & Dianese, 1976; Takahashi, 1993; Gupta & Gopal, 2002; Ouattara-Sourabie *et al*., 2011; Suzuki & Iwahashi, 2016;). Se realizaron cuatro repeticiones por cada medio de cultivo. En la **Tabla 2** se presenta la división por grupo de los aislados obtenidos de *Aspergillus* para realizar el escrutinio de estos.

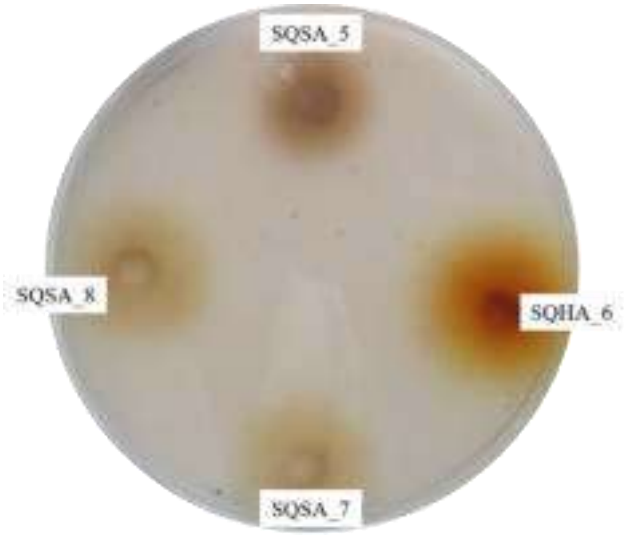


Figura 6. Siembra en agar coco natural con cuatro aislados diferente de *Aspergillus* spp. para pruebas rápida de detección de micotoxinas.

Tabla 2. Distribución por grupo de *Aspergillus* spp. sembrado.

Grupo	Aislado
1	SQSA_1
	SQSA_2
	SQSA_3
	SQSAm_4
2	SQSA_5
	SQHA_6
	SQSA_7
	SQSA_8
3	SQSAn_9
	SQSAn_10
	SQSA_11

Tabla 3. Medios de cultivo empleados en la primera etapa de la prueba de fluorescencia. Modificado de Lin & Dianese (1976); Takahashi (1993); Gupta & Gopal (2002); Suzuki & Iwahashi (2016).

Medio de cultivo	
Agar Coco Natural	CAM
Agar Coco Natural + 0,3 mg/mL de Carbón Activado*	CAM+CA
Papa Dextrosa Agar	PDA

* Elaborado por Carbotecnia S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco

A las 48, 120 y 168 h de incubación, se evaluó de manera visual con una lámpara de luz ultravioleta (UV) de 365 nm, en donde se observó la parte posterior de las cajas Petri, para seleccionar a los aislados de *Aspergillus* que emitían fluorescencia, como criterio de producción de micotoxinas del tipo aflatoxinas u ocratoxinas según lo indicado por Lin & Dianese (1976); Takahashi (1993); Gupta & Gopal (2002); Ouattara-Sourabie *et al*. (2011) y Suzuki & Iwahashi (2016).

Por otra parte, con los aislados seleccionados se llevó a cabo la técnica de vapor de amonio (Fani *et al.*, 2014), la cual consistió en depositar en el centro de la tapa de la caja Petri, donde se encontraba la siembra de los hongos, 100 µL de hidróxido de amonio (NH_4OH) al 25 % y se dejó la caja Petri invertida durante 20 minutos aproximadamente; al finalizar este tiempo se revisó la intensidad en la pigmentación de la colonia de manera visual y se clasificó según la coloración el nivel de toxicidad de los aislados de acuerdo Shekhar *et al*. (2017) **(Tabla 4).**

Tabla 4. Clasificación de toxicidad empleando la técnica de vapor de amonio (Fani *et al*., 2014; Shekhar *et al*., 2017).

Color	Nivel de toxicidad	Partes por billón (ppb) o µg/ kg
Rojo ciruela	Altamente tóxico	> 2000
Rojo	Tóxico	501 – 2000
Rosado	Moderado	21 – 500
Crema	Menos tóxico/no tóxico	< 20

6.5.2. Intensidad de fluorescencia en diferentes medios de cultivo (Segunda etapa)

Los aislados seleccionados en la primera etapa se sembraron de manera individual en los diferentes tipos de medios de cultivo, pero suplementado con β-ciclodextrina **(Tabla 5, Anexos 4-6),** con la finalidad de evaluar visualmente la intensidad de fluorescencia entre los aislados seleccionados, como testigo para realizar la comparación se empleó un aislado de *Fusarium* sp. que no emitía fluorescencia.

Tabla 5. Medios de cultivo empleados en la segunda etapa de la prueba de fluorescencia (Suzuki & Iwahashi; 2016).

Medio de cultivo	
PDA + 0,3 mg/mL de carbón activado*	PDA+CA
PDA + 3 mg/mL de β-ciclodextrina**	PDA+β-Cd
PDA + 0,3 mg/mL de carbón activado + 3 mg/mL de β-ciclodextrina**	PDA+CA+β-Cd

* Elaborado por Carbotecnia S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco

** Betadex D2121 elaborado por ChemLogis S.A. de C.V, Ciudad de México, México

Para lo anterior, se realizaron siembras por duplicado por cada aislado y por medio de cultivo empleado **(Tabla 5)**, en donde, se sembró en el centro de la caja de Petri un disco de 6 mm de diámetro con crecimiento micelial de siete días, se incubaron a 27 $\pm$ 2 °C por 48, 120 y 168 h en oscuridad constante, finalmente se realizó la prueba de fluorescencia y la técnica de vapor de amonio descritas con anterioridad.

Se realizó un escrutinio cualitativo para verificar la presencia de micotoxinas de tipo ocratoxinas y aflatoxinas en los aislados de *Aspergillus*, lo que permitió distinguir dentro de estos los que emitían fluorescencia para seleccionarlos. Los aislados seleccionados de *Aspergillus*, así como los de *Fusarium* se preservaron para pruebas posteriores, incluida la identificación molecular.

6.6. Preservación de aislados

Los aislados descritos como *Fusarium* y *Aspergillus*, a nivel de género, se conservaron empleando cinco métodos con la intención de garantizar la disponibilidad de estos hongos para las pruebas

posteriores. Es importante mencionar que, la reactivación se realizó en medio PDA y se evaluó la viabilidad de los aislados en cada método de conservación empleado.

6.6.1. Método de conservación en papel filtro

Se emplearon cortes de aproximadamente 1 cm^2 de papel filtro Whatman No. 1, previamente esterilizados por 15 min a 121 °C y 15 psi, los papeles estériles se distribuyeron sobre cajas Petri con medio de cultivo PDA: papa dextrosa agar y CZA: czapeck agar **(Figura 7a; Anexos 3 y 7)**, las cuales contenían en centro un disco de PDA de 8 mm de diámetro con siete días de crecimiento micelial del hongo **(Figuras 7c y 7f)**, lo anterior con el fin de que el hongo se desarrollara y colonizara **(Figuras 7d y 7g)** los papeles filtros dispuestos en el medio de cultivo (Iqbal *et al*., 2017). Las cajas se incubaron 27 $\pm$ 2 °C por cuatro días en oscuridad total y cuatro días en luz constante, transcurrido este tiempo, se extrajo del medio cada papel filtro colonizado por el hongo **(Figuras 7d y 7g)**, estos se depositaron en cajas Petri estériles vacías, se sellaron con papel Parafilm® y se almacenaron a 35 °C por 30 días aproximadamente hasta eliminar la humedad del papel filtro colonizado por el hongo. Las muestras completamente secas **(Figuras 7e y 7h)**, se transfirieron a sobres de aluminio y se almacenaron a 4 °C (Iqbal *et al*., 2017).

6.6.2. Método de conservación en palillos de dientes

Este método es similar al descrito con anterioridad, la diferencia radica en la preparación de los palillos de dientes antes de distribuirlos sobre los medios de cultivos (PDA y CZA), el cual consistió en: 1) realizar cortes de 1 cm^2 a cada palillo de dientes, 2) sumergirlos en caldo de PDA al 2 %, 3) mezclarlos durante 1 min a 60 rpm, 4) esterilizarlos por 15 min a 121 °C y 15 psi, 5) filtrar los palillos del PDA para luego disponerlos sobre los medios de cultivo (PDA y CZA) **(Figura 7b)** (Iqbal *et al*., 2017), 6) continuar con lo descrito en el punto **6.6.1.**

6.6.3. Método de conservación en glicerol al 20 %

Para esta conservación se preparó glicerol al 20 % con APE, se esterilizó durante 15 min a 121 °C y 15 psi. En un criotubo de ensayo de 5 mL se adicionaron 2.5 mL del glicerol al 20 % frio y se

depositaron discos de 6 mm con siete días de crecimiento micelial del hongo a preservar, posteriormente, se etiquetaron, se sellaron con papel Parafilm® y se almacenaron a 4 °C (Gutiérrez *et al*., 2009; Paul *et al*., 2015; Iqbal *et al*., 2017).

6.6.4. Método de conservación en caldo nutritivo con glicerol al 25 %

Inicialmente, se preparó glicerol al 25 % con APE y se agregó caldo nutritivo al 0.8 % (MCDLAB BD Caldo nutritivo Cat. N°. 7341, lote N°. 734119B001. MCDLAB S.A. de C.V., Oaxaca, México), se homogenizó por 1 min a 60 rpm, se esterilizó a 121 °C y 15 psi por 15 min; al finalizar la esterilización se esperó a que la temperatura se disminuyera a 45 °C para adicionar cuprimicina agrícola al 0.25 %. Finalmente, se distribuyeron 2.5 mL de este medio en criotubos de 5 mL y se adicionaron discos con micelio del hongo como se indica en el apartado **6.6.3.** Modificado de Gutiérrez *et al*. (2009); Paul *et al*. (2015); Iqbal *et al*. (2017).

6.6.5. Método de conservación con suspensión de conidios

Para los aislados de *Fusarium* spp. se preparó glicerol al 20 % y para los de *Aspergillus* spp. glicerol al 20 % + Tween® 80 al 0.1 %, ambas soluciones estériles, se empleó para recuperar los conidios de cada hongo a conservar. La recuperación de conidios se realizó adicionando de 1 mL de la solución en la caja Petri con PDA y crecimiento de siete días del hongo, se raspó el micelio **(Figura 4a)** evitando traer agar, se tomaron los conidios con una micropipeta, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se sellaron con papel Parafilm®, se etiquetaron y se almacenaron a 4 °C y -20 °C.

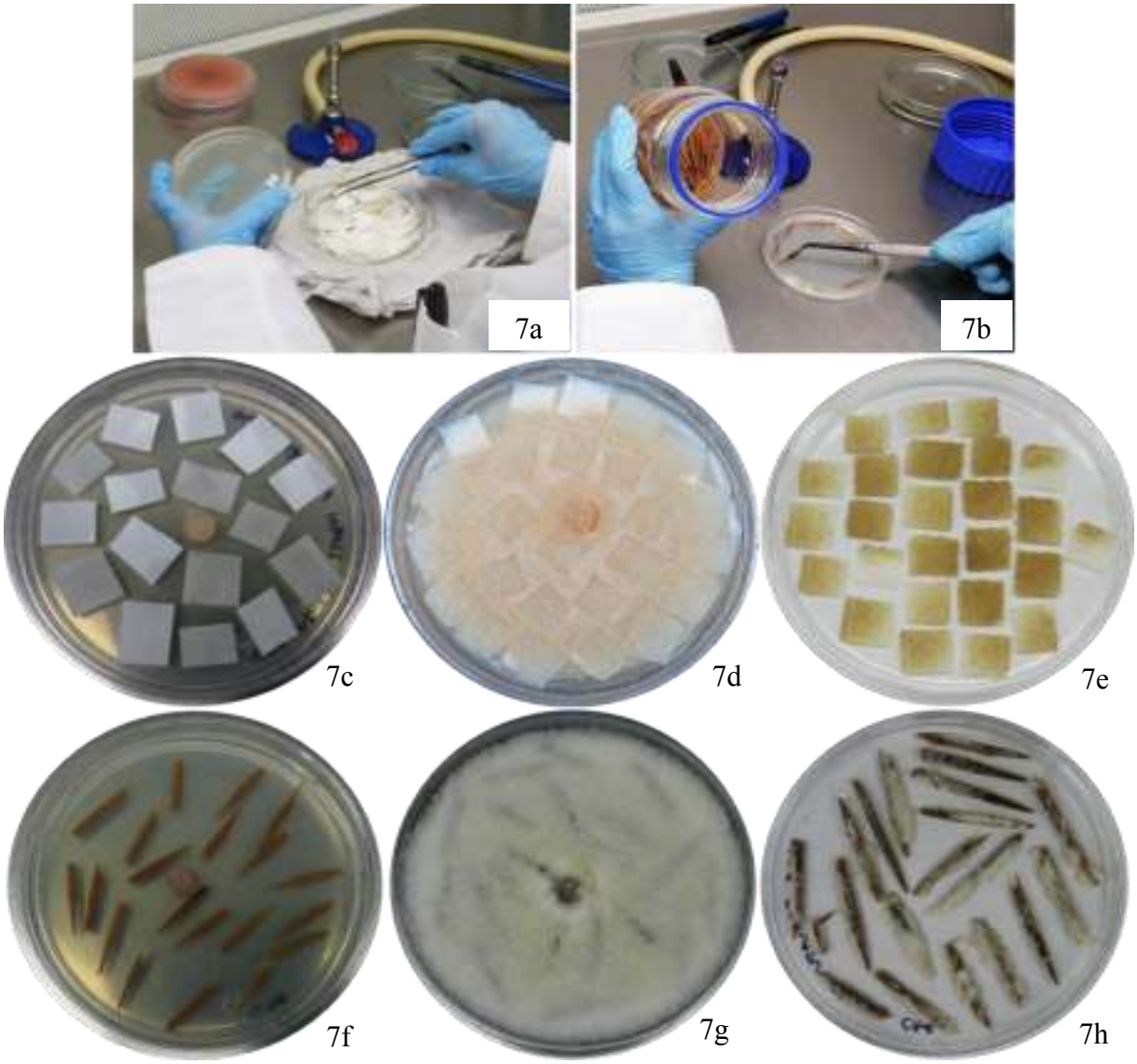


Figura 7. Conservación de aislados en papel filtro (centro) y palillos de dientes (abajo). **(7a)** Disposición de papel filtro sobre medio de cultivo; **(7b)** Disposición de palillos de dientes sobre medio de cultivo; **(7c, 7f)** Disco con micelio del hongo a preservar ubicado en el centro de la caja Petri; **(7d, 7g)** Colonización del hongo, listo para secar; **(7e, 7h)** Hongo seco sobre papel filtro **(7e)** y palillos de dientes **(7h)** colonizados (Fotografías: de la autora).

6.6.6. Reactivación de los aislados

Para la reactivación de los aislados preservados en papel filtro y palillos de dientes, se retiró del sobre de aluminio 1 papel o 1 palillo; de los conservados en glicerol se tomó 1 disco, y de la suspensión de conidios, el tubo Eppendorf se mezcló en vórtex por 30 segundos y con un asa

bacteriológica se realizó una siembra por estría. Cada inóculo se sembró de manera individual en caja Petri con PDA fresco y se incubó a 27 $\pm$ 2 °C por cuatro días en oscuridad total y cuatro días en luz constante.

6.6.7. Viabilidad de los aislados

En lo concerniente a la viabilidad, esta se llevó a cabo tomando los aislados previamente reactivados en PDA con siete días de crecimiento, sobre la colonia se agregó APE para recuperar con un asa bacteriológica **(Figura 4a)** 10 mL de suspensión de conidios, posterior a esto se realizaron diluciones seriadas como se describen en el punto **6.2.1.**

Al finalizar las diluciones, se realizó el conteo de estructuras empleando una cámara de Neubauer en el microscopio compuesto a 40 X para determinar el número de conidios presentes por mL de la muestra. Para lo anterior, se tomó el tubo con la dilución a cuantificar, se mezcló por inversión 10 veces y en vórtex por 30 segundos, con una micropipeta se tomaron 10 µL que se depositaron en la retícula del campo de la cámara, se cubrió con un cubreobjetos y se esperó mínimo 1 minuto para ver las estructuras al microscopio.

El conteo se realizó por duplicado en ambos campos de la sección C de la cámara de Neubauer teniendo en cuenta la siguiente condición, sí por cuadrante se presentaban entre 10 y 100 conidios se cuantificaban los cinco cuadrantes de la sección C **(Fórmula 1**) sí, por el contrario, se encontraban menos de 10 estructuras se contabilizaban los 25 cuadrantes del campo (**Fórmula 2**). Al finalizar el conteo de la muestra, se empleó la siguiente fórmula para determinar el número de conidios presentes por mL.

Fórmula 1: Se utilizó cuando se contaron sólo los cinco cuadrantes de los campos observados.

$$\frac{conidios}{mL} = (\bar{x}\,\text{conidios}) \times 25 \times (10000) \times (\text{D})$$

Fórmula 2: Se utilizó cuando se contaron todos los cuadrantes de los campos observados.

$$\frac{conidios}{mL} = (\bar{x}\,\text{conidios}) \times (10000) \times (\text{D})$$

Donde:

($\bar{x}$ conidios): Promedio de esporas contadas en cada cuadrante.
25: Número de cuadrantes del área.
10000: Factor de dilución de la cámara de Neubauer.
D: Inverso de la dilución retenida.

Posteriormente, la viabilidad se obtuvo con la dilución 10^{-6} y 10^{-7}, se tomó la dilución 10^{-6}, se mezcló por inversión 10 veces y en vórtex por 10 segundos, con la micropipeta se tomaron 100 µL, se depositaron en el centro de la caja Petri con medio de cultivo PDA fresco y se distribuyeron sobre toda la caja con la espátula de Drigalski; lo anterior se realizó para ambas diluciones por duplicado.

Posteriormente, se incubó de manera invertida la caja de Petri a 27 $\pm$ 2 °C durante 48 h con luz constante. Transcurrido este tiempo se cuantificó el número de colonias presentes en el medio de cultivo para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) presentes por mL de la muestra (**Fórmula 3**). Para el cálculo del Porcentaje de Diferencia Relativa (RPD) en la viabilidad se empleó la **Fórmula 4**.

Fórmula 3: Para determinar UFC.

$$UFC/mL = \frac{\sum colonias\ por\ placa/2}{V\ (mL)} \times 100$$

Donde:

$\sum$ colonias por placa/2: Promedio de las colonias contadas en las cajas Petri donde se sembraron por extensión 100 µL de la muestra.
V: Volumen de la muestra agregado a la caja Petri representado en mL.

Fórmula 4: Para determinar % RPD.

$$\%\ RPD = \frac{C1 - C2}{(\frac{C1 - C2}{2})} \times 100$$

Donde:

C1: Concentración media de la primera muestra.
C2: Concentración media de la segunda muestra.

6.7. Identificación molecular

6.7.1. Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN genómico empleando la metodología CTAB (2 % Bromuro de cetiltrimetilamonio, 100 mM HCl-Tris con pH 8.0, 20 mM de EDTA y 1.4 M de NaCl; según Doyle (1991), la cual es la más empleada para la extracción de DNA fúngico. La solución amortiguadora se preparó siguiendo el protocolo de Cold Spring Harbor (2006).

La extracción se realizó a partir de cultivos monoconidiales con siete días de crecimiento en medio PDA, se recuperó el micelio de cada colonia con un bisturí estéril, este se depositó en un tubo Eppendorf estéril de 2 mL que contenía 600 µL de la solución CTAB. La muestra se maceró con pistilo estéril y se homogenizó en un vórtex (MXS DLAB) por 10 segundos, se ubicó en baño seco termostático (Termoblock modelo SMED - HB1205) por 10 minutos a 65 °C, se centrifugó (Centrifuge 5415 R) por 3 minutos a 10,000 rpm. Posteriormente, se tomaron 500 µL de la suspensión y se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf, al que se le adicionó 120 µL de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se homogenizó nuevamente en el vórtex por 30 segundos, se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf al que se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión de cuatro a cinco veces y se almacenó durante 10 minutos a -20 °C; transcurridos los 10 minutos, se centrifugó la muestra a 13,000 rpm durante 10 minutos para sedimentar el ADN, se decantó el sobrenadante, se agregaron 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm (Cornejo *et al*., 2015).

Finalmente, se decantó una vez más y el tubo Eppendorf se colocó de manera invertida e inclinada sobre un papel absorbente dentro de la campana de flujo laminar, de manera que el etanol se evaporara en su totalidad. El ADN se re-suspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C para el uso posterior (Cornejo *et al*., 2015). Posteriormente, la cantidad y calidad del ADN se estimó en un NanoDrop™ (OneC UV-Vis Spectrophotometer), en la Unidad Tecnológica Fitosanitaria Integral (UTEFI). El ADN se utilizó como templado para la amplificación por PCR de punto final.

6.7.2. Amplificación por PCR punto final

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL, los cuales contenían 1 µL del ADN extraído, 2.5 µL de la solución amortiguadora 10X, 0.75 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0.75 µL de dNTP (10 mM), 0.62 µL de cada uno de los oligos (sentido y antisentido) a 20 mM y 0.066 µL de la Taq DNA polimerasa (Invitrogen REF. 10342-020) a 5 U/µL. La reacción se efectuó en un termociclador C1000 Touch© de Bio-Rad, se programó a 95 °C durante 5 min para la desnaturalización inicial; seguido de 35 ciclos a 95 °C por 40 s, el alineamiento se realizó a diferentes temperaturas para cada juego de oligonucleótidos (**Tabla 6)** por 40 s y extensión a 72 °C de 40 s a 1.5 minutos (dependiendo del tamaño del producto de amplificación esperado); una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa (1 % p/v en 30 mL de TAE a 1x + 1 µL de bromuro de etidio) en la cámara de electroforesis durante 25 minutos a 80 v. El producto de la amplificación se observó en un fotodocumentador (Bio-Rad Universal Hood II). Los productos de PCR se enviaron a purificación y secuenciación a la empresa ©Macrogen (Corea del Sur), la secuenciación se realizó en ambas direcciones para todas las muestras.

Tabla 6. Oligonucleótidos y temperatura de alineamiento empleados para la amplificación.

Hongo aislado	Nombre primer	Región que amplifica	Temperatura de alineamiento	Referencia
Fusarium spp.	EF1-728f EF1-986r	Factor de elongación	54°C	O'Donnell *et al*., 1998
	RPB2-5f2 RPB2-7cr	Segunda subunidad RNA polimerasa II	56°C	Liu *et al*., 1999
Aspergillus spp.	ITS-5f ITS-4r	Espaciador transcrito interno (Región ITS)	55°C	White *et al*., 1990
	Bt-2af Bt-2br	Gen β-tubulina (BenA)	52°C	Glass and Donaldson, 1995
	RPB2-5f2 RPB2-7cr	Segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2)	55°C	Liu *et al*., 1999
	CMD-5f CMD-6r	Gen calmodulina (CaM)	55°C	Hong *et al*., 2005

6.7.3. Secuenciación y análisis filogenético

Las secuencias se editaron en BioEdit versión 7.2.5. (Tom Hall, 1999), se compararon con secuencias depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) a través del algoritmo BLAST-N, se alinearon con MUSCLE embebido en MEGA X y el mismo software se empleó para la concatenación (Tamura *et al*., 2021).

Para evaluar las particiones de los alineamientos concatenados se utilizó el software PartitionFinder versión 1.1.1. (Lanfear *et al*. 2016) y la filogenia con RAxML versión 7.2.8. empleando el método de máxima verosimilitud y el modelo GTRGAMMAI (Stamatakis, 2006). Finalmente, la prueba de robustez se llevó a cabo mediante Bootstrap con 1000 réplicas y los filogramas se editaron con el software FigTree versión 1.4.0. (Rambaut and Drummond, 2008).

6.8. Cuantificación de micotoxinas

Se inocularon semillas comerciales de maíz con los aislados para enviar a cuantificar la micotoxina asociada, de acuerdo a la literatura, a las especies identificadas de *Aspergillus* y/o *Fusarium.* Esta actividad se desarrolló en dos fases que a continuación se describen.

6.8.1. Estandarización metodología para inoculación de semillas de maíz (Fase 1)

6.8.1.1. Desinfección de semillas comerciales de maíz

Se pesaron 25 g de semillas de maíz híbrido Hipopótamo de Asgrow®, a las que se le realizaron dos heridas en la zona del embrión con una aguja de disección **(Figura 8a)**. Las semillas se desinfestaron con tratamiento hidrotérmico (Leyva-Madrigal *et al*., 2015), el cual consistió en agregar a un vaso precipitado 5 gotas de Tween® 20 por cada 100 mL de APE, la solución se vertió al envase de plástico donde se encontraban las semillas de maíz hasta cubrir la totalidad de granos, se agitó por 5 minutos entre 100 y 250 rpm **(Figura 8b)**, con la finalidad de eliminar los productos agroquímicos que impregnan a las semillas comerciales. Transcurridos los 5 minutos de agitación se eliminó el Tween® 20, las semillas se sumergieron en NaClO al 0.75 % y se incubaron a 52 °C en baño maría (BW-B de Lab. Companion) durante 20 minutos **(Figura 8c)**; posteriormente, se decantó la solución de NaClO, se realizó un triple lavado de las semillas con APE en la campana de flujo laminar (Leyva-Madrigal *et al*., 2015).

Al finalizar, se eliminó el exceso de agua, las semillas se colocaron sobre papel filtro dentro de una caja plástica para almacenarlas a – 20 °C por 24 h (Mezzalama *et al*., 2015) para inhibir la germinación de las semillas. Las semillas se dispersaron sobre un nuevo papel filtro dentro del gabinete de seguridad **(Figura 8d)**, se expusieron a flujo de aire lento durante 16 h para eliminar el exceso de humedad en los granos; los granos se colocaron en un envase plástico y se inocularon con el respectivo aislado.

Figura 8. Preparación de semillas de maíz para inoculación. **(8a)** Heridas realizadas a los granos; **(8b)** Lavado de semillas con Tween® 20; **(8c)** Desinfección con NaClO 0,75 % en baño maría; **(8d)** Secado de semillas en gabinete de bioseguridad (Fotografías: de la autora).

6.8.1.2. Inoculación de semillas comerciales de maíz

La estandarización de esta prueba se realizó sólo con dos aislados (*Fusarium* SQSFv_16 y *Aspergillus* SQSA_3), para definir el tiempo adecuado de incubación para la esporulación de *Aspergillus* y la acumulación de micotoxinas para el total de aislados, eligiendo a *Aspergillus* de lento crecimiento y un *Fusarium* con crecimiento promedio.

Finalizado el proceso descrito en el punto **6.8.1.1.**, se inocularon los 25 g de semillas considerando tres tratamientos; 1) total de semillas sin herida, 2) el 10 % del total de las semillas con herida **(Figura 8a)**, 3) todas las semillas con herida **(Figura 8b)**, cada uno con su respectivo testigo, de

esta manera se obtuvieron nueve tratamientos **(Tabla 7)** con una distribución al azar. En necesario aclarar que, se consideró realizar la lesión al 10 % del peso total de semillas tomando como criterio lo establecido en las especificaciones de calidad para el grano de maíz blanco y amarillo según la NMX-FF-034/1-SCFI-2020.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos empleados para evaluar condiciones de inoculación.

	Tratamiento	**Inoculación de 1.0x10^4 con/mL**
1	0 % de semillas con heridas	
2	10 % de semillas con heridas	Sin inoculación (testigo)
3	100 % de semillas con heridas	
1	0 % de semillas con heridas	
2	10 % de semillas con heridas	*Fusarium* SQSFv_16
3	100 % de semillas con heridas	
1	0 % de semillas con heridas	
2	10 % de semillas con heridas	*Aspergillus* SQSA_3
3	100 % de semillas con heridas	

Para cada tratamiento, se tomaron los envases plásticos que contenían las semillas y se inocularon con 5 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1 x 10^4 con/mL de cada hongo a evaluar, la cual se preparó previamente con la recuperación de conidios obtenidos de la reactivación de los aislados crecidos siete días en medio PDA **(Figura 9a; apartados 6.6.6. y 6.6.7).**

Al inocularse las semillas, cada envase se agitó manualmente **(Figura 9b)**, se esperaron 10 minutos para agitarlos nuevamente, esto se realizó tres veces. Después, se depositaron las semillas en un nuevo envase plástico rodeado con algodón humedeció con 15 mL de glicerol al 25 %**(Figura 9b),** dicho envase se colocó dentro de un recipiente con capacidad de 1L **(Figura 9c)**. Finalmente, se tapó y se selló el recipiente de 1L para incubarlo a 27 $\pm$ 2 °C por 13 días en oscuridad. El crecimiento de los hongos se revisó cada cuatro días modificado de Gasperini *et al*. (2019); Lagogianni & Tsitsigiannis (2019); Stracquadanio *et al*. (2021).

Figura 9. Inoculación de semillas comerciales de maíz. **(9a)** Crecimiento en PDA de *Fusarium* SQSFv_16 para recuperación de conidios; **(9b)** Agitación de semillas inoculadas; **(9c)** Recipiente con cámara húmeda para conservar la inoculación (Fotografías: de la autora).

Al finalizar el periodo de incubación (13 días) se observó el desarrollo de los hongos, se realizó un corte longitudinal al 25 % de las semillas inoculadas por tratamiento para revisar si estas presentaban daños internos. Los daños a las semillas se evaluaron con el software ImageJ versión, 1.8.0.112.

6.8.2. Inoculación semillas de maíz para cuantificación de micotoxinas (Fase 2)

Para esta fase se emplearon 60 g de semilla de maíz híbrido Hipopótamo de Asgrow® por aislado a inocular (siete en total; **Tabla 8**). Se les realizó la herida al 10 % de estas para continuar con los procedimientos descritos en los apartados **6.8.1.1. y 6.8.1.2.** Finalmente, se incubaron a 27 $\pm$ 2 °C en oscuridad total por 13 y 6 días para los aislados de *Fusarium* y *Aspergillus*, respectivamente.

Tabla 8. Aislados para inoculación y cuantificación de micotoxinas.

Género	ID	Micotoxina a cuantificar
Aislados de *Fusarium*	SQSFn_M SQGF_2 SQSFv_16	Fumonisinas y Vomitoxinas
Aislados de *Aspergillus*	SQSA_3 SQSAm_4 SQSA_8 SQSAn_9	Ocratoxinas Aflatoxinas y Ocratoxinas Fumonisinas y Ocratoxinas

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras de semillas inoculadas con los respectivos aislados se enviaron para la cuantificación de micotoxinas al Laboratorio AGQ Labs (especializado con acreditaciones en: acreditación y alcance EMA, IAS y reconocimiento SENASICA), ubicado en Jalisco, México. Previamente, las muestras **(Figuras 10a y 10b)** se empaquetaron en bolsas de papel, cubiertas por doble bolsa Ziploc® **(Figura 10c),** procedimiento de envío establecido por el laboratorio.

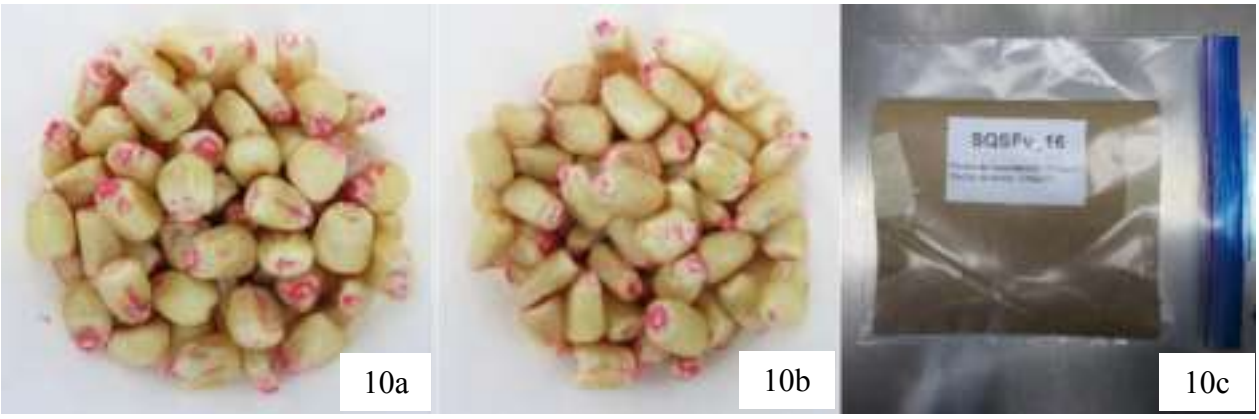


Figura 10. Envío de muestras a cuantificar. **(10a)** Semillas de maíz inoculadas con *Fusarium* SQSFn_M; **(10b)** Semillas de maíz inoculadas con *Aspergillus* SQSAm_4; **(10c)** Paquete con semillas inoculadas para envío a AGQ Labs (Fotografía: de la autora).

6.9. Pruebas de eficacia de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil®

6.9.1. Pruebas de antibiosis y micoparasitismo

Para las pruebas de antibiosis, se seleccionaron dos aislados, *Aspergillus* SQSA_8 y *Fusarium* SQSFv_16, de acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de micotoxinas. Estas pruebas se efectuaron con los microorganismos benéficos encapsulados en los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® **(Tabla 9)**. Estas pruebas se llevaron a cabo empleando los métodos descritos por (Gonzalez, 2016; Stracquadanio *et al*., 2021; Gasperini *et al*., 2019) las cuales consistieron en:

1) **Técnica en espiral:** se ubicó para cada bacteria (*Azotobacter* sp., *Azospirillum brasilense* Q28, *Pseudomonas fluorescens* Q35 y *Bacillus subtillis* Q11), una alícuota de 2 µL con una concentración de 2.1 x 10^9 UFC/mL a una distancia de 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 cm del disco con micelio del hongo (*Fusarium* SQSFv_16 y *Aspergillu*s SQSA_8), el cual se encontraba en el centro de la caja Petri. En la **Figura 11a** se presenta el ejemplo de la formación en espiral con *B. subtilis* cepa Q11.
2) **Técnica del consorcio microbiano:** de cada colonia bacteriana se tomó una asada y con esta se trazó por punto cardinal de la caja Petri una línea recta de 3 cm, se ubicó por línea una bacteria diferente **(Figura 11b)** de las que componen a Biosoup® **(Tabla 9)**.
3) **Técnica de confrontación dual:** se sembró un disco con micelio del hongo productor de micotoxina (*Fusarium* SQSFv_16 y *Aspergillu*s SQSA_8) a una distancia de 6 cm de *Trichoderma viride* Q07 **(Figura 11c).**

NOTA: para la realización de estas pruebas se reactivaron previamente los hongos *T. viride*, *Fusarium* SQSFv_16 y *Aspergillu*s SQSA_8 en PDA, los cuales crecieron durante siete días, cuatro en oscuridad y tres en luz, a una temperatura de 27 $\pm$ 2 °C; mientras que, se utilizó el medio de cultivo Agar de Soya Tripticaseina (STCA: BD Bioxon Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) para reactivar las bacterias a 30 $\pm$ 2 °C durante 72 h para *Azotobacter* sp., 48 h para *A. brasilense* Q28 y *P. fluorescens* Q35, y 24 h *B. subtillis* Q11.

Tabla 9. Microorganismos benéficos que componen los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil®.

Biofertilizante	Microorganismo benéfico
Biosoup®	*Bacillus subtillis* cepa Q11
	Azospirillum brasilense cepa Q28
	Azotobacter sp.
	Pseudomonas fluorescens cepa Q35
Tribiosoil®	*Trichoderma viride* cepa Q07
	Bacillus subtillis cepa Q11

Las siembras realizadas con los microorganismos se incubaron a 27 $\pm$ 2 °C durante siete días con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Se establecieron 12 tratamientos (**Tabla 10**) con tres repeticiones cada uno, distribuidos completamente al azar. Se registró el crecimiento de los hongos fitopatógenos y benéficos cada 24 h. El porcentaje de inhibición de crecimiento radial se determinó empleando la **Formula 5** (Ezziyyani *et al*., 2007), que a continuación se describe:

Fórmula 5: para determinar % PICR

$$\% \text{ PICR} = \frac{\text{R1} - \text{R2}}{\text{R1}} \times 100$$

Donde:

% PICR: porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

R1: crecimiento radial (mm) del aislado CON microorganismo benéfico.

R2: crecimiento radial (mm) del aislado SIN microorganismo benéfico.

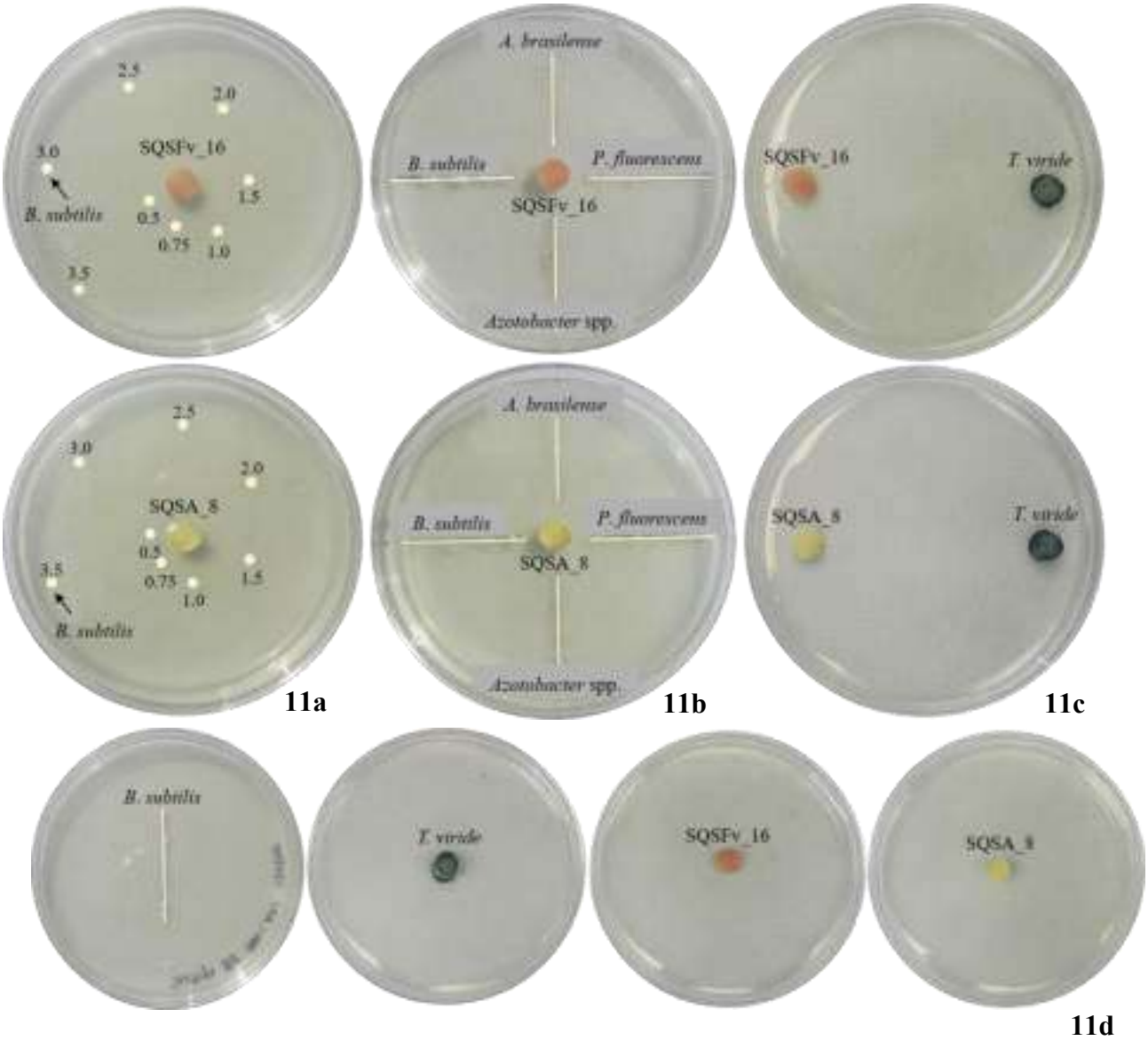


Figura 11. Prueba de antibiosis (arriba: *Fusarium* SQSFv_16, centro: *Aspergillus* SQSA_8, abajo: testigos). **(11a)** Técnica en espiral; **(11b)** Evaluación consorcio microbiano **(11c)** Confrontación dual; **(11d)** Testigos de izquierda a derecha: *Bacillus subtilis* Q11*, Trichoderma viride* Q07*, Fusarium* SQSFv_16 y *Aspergillus* SQSA_8 (Fotografías: de la autora).

Tabla 10. Tratamientos a evaluar en la prueba de antibiosis.

Tratamiento	Descripción
1	*Aspergillus* SQSA_8 vs. Consorcio microbiano
2	*Aspergillus* SQSA_8 vs. *Bacillus subtillis* Q11
3	*Aspergillus* SQSA_8 vs. *Azospirillum brasilense* Q28
4	*Aspergillus* SQSA_8 vs. *Azotobacter* sp.
5	*Aspergillus* SQSA_8 vs. *Pseudomonas fluorescens* Q35
6	*Fusarium* SQSFv_16 vs. Consorcio microbiano
7	*Fusarium* SQSFv_16 vs. *Bacillus subtillis* Q11
8	*Fusarium* SQSFv_16 vs. *Azospirillum brasilense* Q28
9	*Fusarium* SQSFv_16 vs. *Azotobacter* sp.
10	*Fusarium* SQSFv_16 vs. *Pseudomonas fluorescens* Q35
	Fusarium SQSFv_16
	Aspergillus SQSA_8
Testigos	*Bacillus subtillis* Q11
	Azospirillum brasilense Q28
	Azotobacter sp.
	Pseudomonas fluorescens Q35
11	*Aspergillus* SQSA_8 vs. *Trichoderma viride* Q07
12	*Fusarium* SQSFv_16 vs *Trichoderma viride* Q07
	Fusarium SQSFv_16
Testigos	*Aspergillus* SQSA_8
	Trichoderma viride Q07

6.9.2. Capacidad antagónica del biofertilizante Tribiosoil®

Para esta prueba sólo se evaluó el efecto de Tribiosoil® sobre la reducción de micotoxinas en semillas de maíz. Inicialmente, se realizaron heridas en la zona del embrión al 10 % de 60 g de semillas de maíz híbrido Hipopótamo de Asgrow®, después se desinfectaron siguiendo lo descrito en el punto **6.8.1.1.,** transcurridas las 16 h de secado de las semillas en el gabinete de bioseguridad, se impregnaron los granos de maíz con la concentración de 4.1 x 10^8 UFC de *T. viride* y 5.2 x 10^8

UFC de *B. subtilis*; posteriormente, se ubicaron en el gabinete de bioseguridad por 16 h. Al día siguiente se inocularon con dos aislados, el primero *Fusarium* SQSFv_16 y el segundo *Aspergillus* SQSA_8 a una concentración de $1.0x10^4$ con/mL cada uno como se indica en el apartado **6.8.1.2.**

De esta manera, se establecieron dos tratamientos con sus respectivos testigos **(Tabla 11)**, como variable de respuesta se consideró la concentración (µg/kg) de micotoxinas, la variable dependiente el hongo productor de micotoxinas (*Fusarium* SQSFv_16 y el segundo *Aspergillus* SQSA_8) y la variable independiente el biofertilizante Tribiosoil®, este ensayo se realizó por duplicado con un diseño completo al azar (Martínez, 2012), en donde una repetición se envió a cuantificar al Laboratorio AGQ Labs en Jalisco, México y la repetición dos se resguardó en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de SINQUÍMICA S.A. de C.V.

Tabla 11. Tratamientos a evaluar en la capacidad antagónica del biofertilizante Tribiosoil®.

Tratamiento	Descripción	Micotoxina a cuantificar
1	*Aspergillus* SQSA_8 vs. Tribiosoil®	Aflatoxinas
Testigo	*Aspergillus* SQSA_8	
2	*Fusarium* SQSFv_16 vs. Tribiosoil®	Fumonisinas y Vomitoxinas
Testigo	*Fusarium* SQSFv_16	

6.10. Estimación de costos

Siguiendo lo recomendado por Mosquera *et al*. (2014), se estimaron los costos asociados a mano de obra, insumos y maquinaria agrícola. En lo que corresponde a la mano de obra y maquinaria agrícola, los costos se estimaron de acuerdo con las tarifas pagadas por el agricultor y el rendimiento de la aplicación, así como el precio de compra, la vida útil y el costo de mantenimiento de la maquinaria agrícola empleada para la labor; por otra parte se estimó el costo de los biofertilizantes teniendo en cuenta, los insumos utilizados, las dosis empleadas, frecuencia de aplicación y su valor comercial; lo anterior, permitió estimar el costo por hectárea de la aplicación de los biofertilizantes. Para obtener dicha información se realizaron encuestas (**Anexo 9**) al productor de maíz, mismo que permitió realizar los muestreos en campo.

Por otra parte, para evaluar el efecto de aplicación de los bioproductos sobre el desarrollo vegetativo del cultivo y estimar el rendimiento de cosecha se tomaron mediciones de altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas totales, número de mazorcas y peso fresco de mazorca.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todas las pruebas experimentales se llevaron a cabo en condiciones *In vitro* bajo un diseño completamente al azar durante su evaluación y tiempo de incubación. Para observar la normalidad de datos se empleó la prueba de Shapiro-Wilk bajo el supuesto H0: no hay diferencias significativas entre el modelo propuesto y la curva normal ($p > 0.05$), H1: si hay diferencias significativas entre el modelo propuesto y la curva normal ($p < 0.05$). La homocedasticidad se evaluó a través de la prueba Levene, la regla de decisión fue H0: no hay diferencias significativas en las variaciones del error para diferentes valores ($p > 0.05$) = homocedasticidad, H1: si hay diferencias significativas en las variaciones del error para diferentes valores ($p < 0.05$) = heterocedasticidad.

De los resultados se realizaron pruebas paramétricas con los métodos estadísticos “t student” para las variables vegetativas, para evaluar la fluorescencia y daño en semillas de maíz se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey ($\alpha < 0.05$) para la comparación de medias; por otra parte, los datos de prueba de eficacia (antibiosis y micoparasitismo) se analizaron con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con una confiabilidad al 95 %. La comparación de medianas se llevó a cabo con la prueba U de Mann Whitney.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento de hongos productores de micotoxinas

8.1.1. Descripción de lote muestreado

Resultado de la información obtenida por las entrevistas al productor (**Anexo 8**) se sabe con relación al uso del suelo, que se ha sembrado durante los últimos cuatro años maíz híbrido Pioneer 3258 y para el ciclo agrícola otoño-invierno del 2021 a 2022 se sembró maíz híbrido Brevant B3788 y B3787 **(Tabla 1)**; el riego es de tipo rodado en sentido este a oeste, para este ciclo se otorgó por parte del módulo de riego cuatro momentos de riego, en uno de asiento y tres de auxilio.

En lo que corresponde a la situación fitosanitaria, los principales problemas son gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y pudrición del tallo ocasionado por *Fusarium* spp. pertenecientes al complejo *fujikuroi.* En la **Figura 12** se presentan los síntomas encontrados en el muestreo realizado en junio de 2022, en donde se observó una zona con acame (pudrición del tallo) hacia la parte noroeste del lote.

Figura 12. Síntomas de la pudrición del tallo en el lote muestreado. **(12a)** Zona de acame producida; **(12b)** Planta de maíz con tallo doblado a nivel del suelo, en el primer entrenudo; **(12c)** Tejido vascular y entrenudos afectados por *Fusarium verticillioides* (Fotografías: de la autora).

Leyva-Madrigal *et al*. (2015) y Taba (2004) describen la pudrición del tallo como una enfermedad que afecta el tejido vascular de las plantas que, al realizar un corte longitudinal al tallo de la planta

de maíz se aprecia en los entrenudos una coloración café **(Figura 12c)**, se obstruye el paso de nutrimentos y agua a través de los haces vasculares para posteriormente quebrantar el tallo de la planta al nivel del suelo **(Figura 12b)** y dependiendo de cantidad de inóculo, así como de las condiciones ambientales puede ocasionar zonas de acame **(Figura 12a)** en los lotes afectados.

8.1.2. Aislados obtenidos

Del muestreo realizado en enero de 2022 se encontró que el 27.94 % de los aislados correspondieron a *Fusarium* spp. y el 72.06 % a *Aspergillus* spp. Al observar con detalle las UFC/g de suelo cuantificadas por punto muestreado **(Tabla 1)** se aprecia en la **Figura 13** que, el punto M6 presentó una carga biológica del 37.76 % de *Aspergillus* spp., seguido por el punto M5 (20.41 %). En lo que corresponde a las UFC/g de suelo de *Fusarium* spp. **(Figura 13)**, el punto M2 presentó mayor presencia con 78.95 % del total de UFC/g de suelo en comparación con las demás zonas de muestreos **(Figura 13)**. Para el muestreo realizado en junio de 2022 la presencia de estos microorganismos incrementó en un 20.93 % dentro del lote.

Del procesamiento de muestras para el aislamiento, se obtuvieron un total de 34 aislados, 32 de suelo, uno de grano y uno de hoja, de estos se seleccionaron los que predominaron en todo el lote para continuar con las pruebas posteriores que permitieron seleccionar los aislados potenciales como productores de micotoxinas; por lo anterior, se seleccionaron con base a las características morfológicas, cuatro aislados de *Fusarium* y 11 de *Aspergillus*, para pruebas posteriores. De esta manera, debido al número de *Aspergillus* aislados se realizaron dos pruebas rápidas de detección de micotoxinas, las cuales se encuentran descritas en el apartado **6.5.**

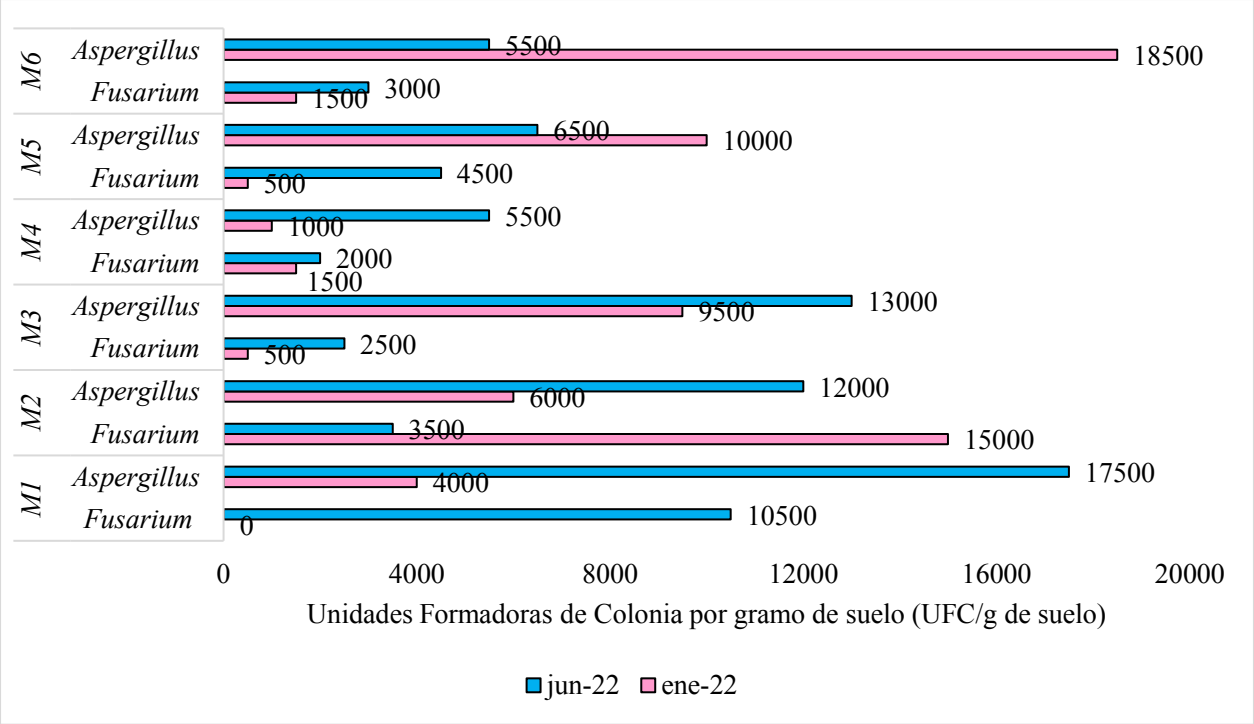


Figura 13. Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC/g de suelo) presentes por punto muestreado dentro del lote. Muestreos realizados en enero y junio de 2022.

8.1.3. Pruebas para detección rápida de micotoxinas

Según lo reportado por Lin & Dianese (1976); Takahashi (1993); Gupta & Gopal (2002); Ouattara-Sourabie *et al*. (2011) y Suzuki & Iwahashi (2016), las pruebas de detección rápida (prueba de fluorescencia y vapor de amonio) son de utilidad para estimar cuáles hongos son productores de micotoxinas de tipo aflatoxinas y ocratoxinas. De esta manera, se realizó una prueba grupal entre los *Aspergillus* aislados (**Tabla 2**) con la finalidad de comparar entre estos cuáles emitían fluorescencia bajo luz UV a 365 nm **(Figura 14)** y cambios en el color de la colonia una vez expuestos a amonio al 25 % **(Figura 15).**

De la prueba de fluorescencia se seleccionaron siete aislados (tres del grupo 1, uno del grupo 2 y tres del grupo 3; **Figura 14**). Especialmente un aislado (SQSA_8) del grupo 2 presentó mayor fluorescencia en las siembras con PDA, pues con los medios de agar de coco empleados no se apreciaba la intensidad de la fluorescencia, especialmente al revisar la parte reversa de la caja Petri **(Figura 14)**, por lo que, lo observado empleando este tipo de medio de cultivo difiere con lo

mencionado por Suzuki & Iwahashi (2016) en lo que respecta a visualizar de mejor manera la intensidad de fluorescencia al suplementar el medio de cultivo con carbón activado.

Con lo obtenido en esta primera fase se confirmó que de los once aislados obtenidos de *Aspergillus*, siete emitieron fluorescencia bajo la luz UV a 365 nm, esta longitud de onda permitió exhibir dentro del perfil espectral de excitación la sustancia activa de fluorescencia de las aflatoxinas en su forma hemiacetal (Hruska *et al*., 2014; Tarín *et al*., 2004), tal como lo han demostrado Lin & Dianese (1976); Takahashi (1993); Gupta & Gopal (2002); Ouattara-Sourabie *et al*. (2011) y Suzuki & Iwahashi (2016) en sus trabajos.

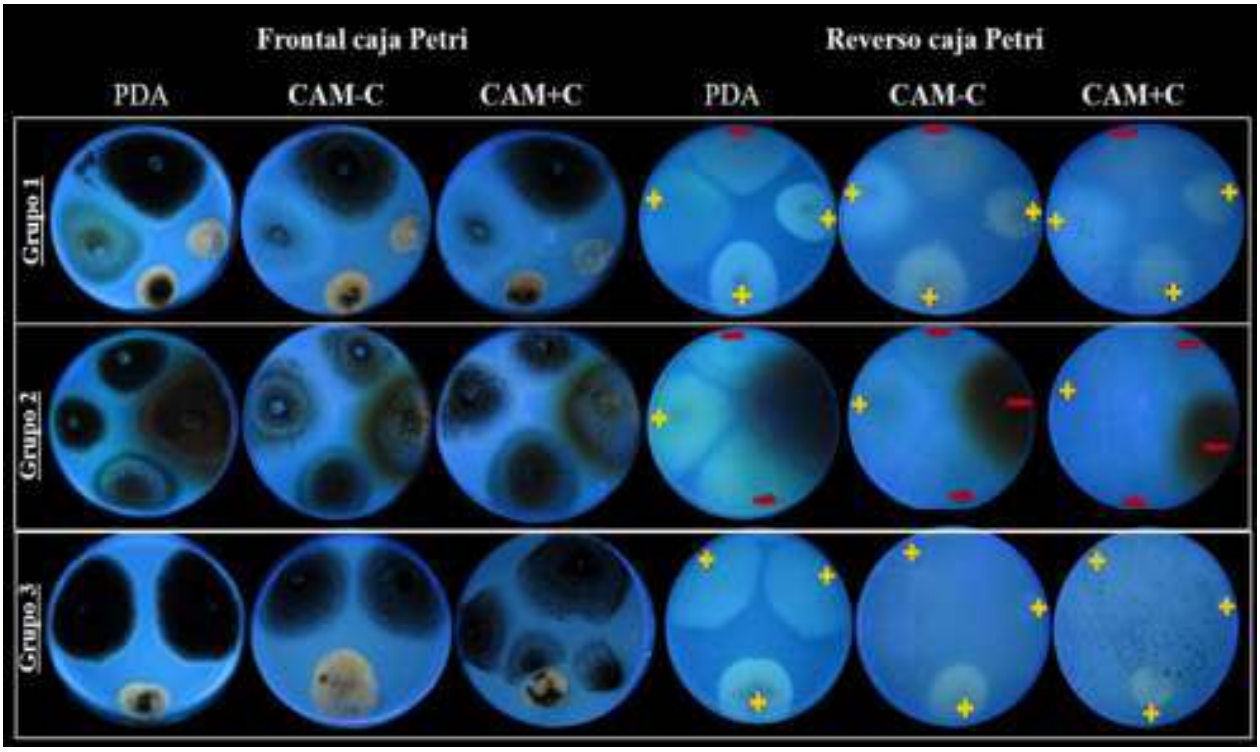


Figura 14. Prueba grupal de fluorescencia para aislados obtenidos de *Aspergillus* spp. sembrados en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), CAM-C (agar de coco sin carbón activado) y CAM+C (agar de coco con carbón activado) (Fotografías: de la autora).

En la segunda prueba grupal (vapor de amonio), se presentaron cambios en la intensidad de la pigmentación de la colonia al estar expuestos 20 minutos a los vapores de amonio, tal como lo expusieron Fani *et al*. (2014); Shekhar *et al*. (2017). Se presenta en la **Figura 15**, los tres asilados del grupo 1 positivos para fluorescencia **(Figura 14),** que presentaron cambios en la intensidad de

pigmentación tanto en la evaluación visual de la parte frontal y reversa de la caja Petri **(Figura 15)**. En cuanto al seleccionado del grupo 2 no presentó un cambio notorio en la parte frontal, pero sí al reverso, como se observa en la parte central de la **Figura 15** la intensidad al reverso de la colonia se torna de un color naranja característico de *Aspergillus* productores de aflatoxinas (Saito & Machida, 1999). Para el grupo tres solamente se apreció el cambio de pigmentación en uno de los tres aislados positivos en la prueba de fluorescencia **(Figura 15)**.

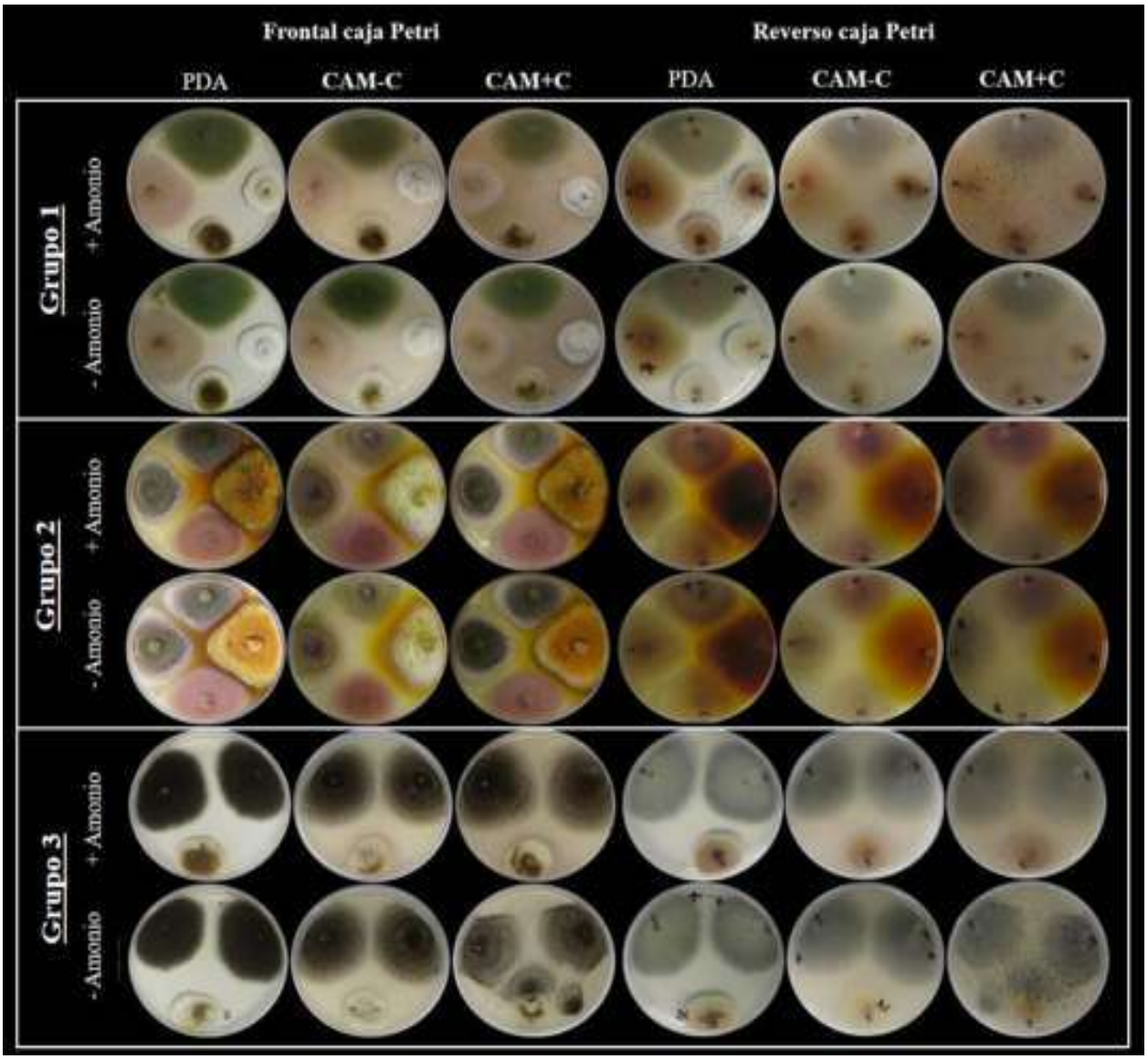


Figura 15. Prueba grupal de amonio para aislados obtenidos de *Aspergillus* spp. sembrados en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), CAM-C (agar de coco sin carbón activado) y CAM+C (agar de coco con carbón activado) (Fotografías: de la autora).

La técnica de vapores de amonio, corroboró lo observado en la prueba de fluorescencia, aunque en algunos que presentaron fluorescencia no se incrementó la intensidad en la pigmentación, lo anterior puede deberse a la coloración oscura de la colonia, **(Figura 15)**. pero al visualizar la parte inferior permitió seleccionar aquellos con algún cambio visual de intensidad en la pigmentación; por lo que, se concluyó que esta prueba de vapor de amonio es de utilidad para hongos con colonias de color claro, de manera que se aprecia con facilidad los cambios en su pigmentación, pues estos cambios actúan como colorantes indicadores de pH una vez que son expuestos al vapor de amonio (Abbas *et al*., 2004). Con lo obtenido anteriormente, se seleccionaron siete aislados de *Aspergillus* como posibles productores de micotoxinas.

Por otra parte, como se presentó mejor visualización en la intensidad de fluorescencia de los aislados de *Aspergillus* sembrados en PDA, se realizó una evaluación visual de manera individual, esta vez empleando solamente medio PDA suplementado con carbón activado y β-ciclodextrina **(Tabla 5).**

Como consecuencia, al compararlos entre sí y empleando como control una cepa de *Fusarium* sp. perteneciente al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de SINQUÍMICA S.A. de C.V. se logró apreciar que los aislados SQSAm_4 y SQSA_8 emitieron mayor fluorescencia tanto al reverso como en la parte frontal de la caja Petri en los tres medios de cultivos empleados, siendo el SQSA_8 el que emitió mayor intensidad; mientras que, para los aislados SQSAn_9 y SQSAn_10 su fluorescencia se intensificó en los medios PDA+β-Cd y PDA+CA **(Tabla 5; Figura 16).**

Por otra parte, para los aislados SQSA_2, SQSA_3 y SQSA_11 no se observó fluorescencia en los medios de cultivos utilizados **(Figura 16),** pero sí un cambio en la intensidad de pigmentación de la colonia en la parte reversa de la caja de Petri y en menor magnitud en la parte frontal **(Figura 18)**, por lo que, podrían ser productores de micotoxinas considerando los resultados positivos en las pruebas de vapor de amonio.

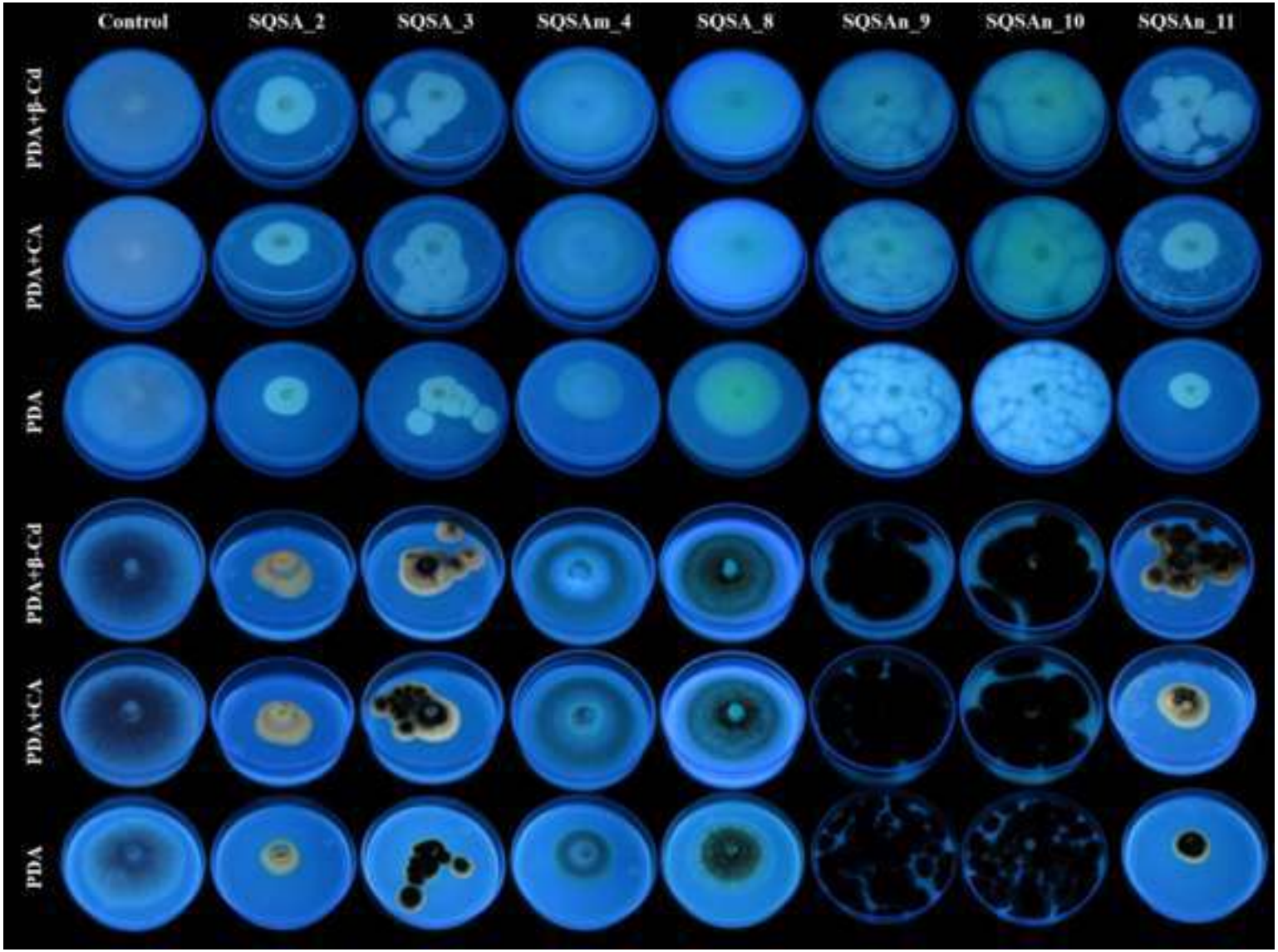


Figura 16. Prueba individual de fluorescencia a los cuatro días de oscuridad en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar + β-ciclodextrina (PDA+β-Cd; Papa Dextrosa Agar + Carbón Activado (PDA+CA) y Papa Dextrosa Agar (PDA) (Fotografías: de la autora).

Por otra parte Suzuki & Iwahashi (2016); Degola *et al*. (2012) mencionan que, bajo luz UV de 365 nm se puede observar una fluorescencia azul para la presencia de aflatoxinas de tipo B y verde para las de tipo G, en este trabajo se corroboró esa premisa, pues el aislado SQSA_8 emitió fluorescencia azul después de 50 h y verde a las 168 h; nótese en la **Figura 17** que para el día cuatro (96 h de incubación) se apreció la transición entre la emisión de fluorescencia azul a verde, por consiguiente, el aislado de *Aspergillus* SQSA_8 es productor de aflatoxinas de tipo B y de tipo G durante su desarrollo.

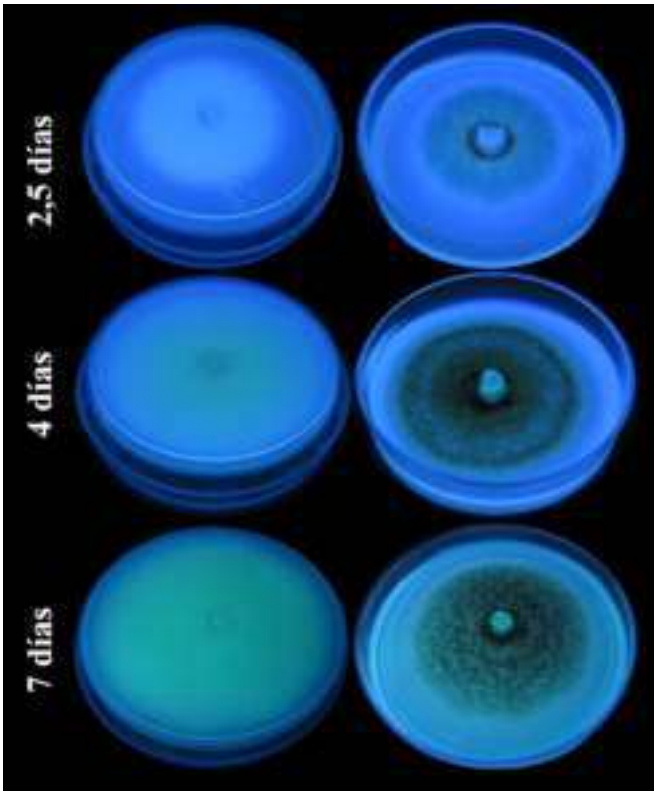


Figura 17. Cambios en la fluorescencia para el aislado *Aspergillus* sp. SQSA_8 (Fotografías: de la autora).

En lo que respecta a la prueba de vapor de amonio, los asilados SQSAn_9 y SQSAn_10 no presentaron cambios en la intensidad de pigmentación en el reverso de la colonia, pero sí un leve cambio de tonalidad en la observación frontal, situación contraria se presentó para los *Aspergillus* identificados como SQSA_2, SQSA_3 y SQSA_11 **(Figura 18)**, mientras que, para el SQSA_8 el cambio en la pigmentación se observó en el reverso más no en la parte frontal de la colonia, caso

contrario con el *Aspergillus* SQSAm_4, pues la pigmentación se intensificó notablemente en la revisión frontal pasando de un color crema a un rosa intenso **(Figura 18)**.

De lo anterior se puede concluir que entre los aislados, el SQSAm_4 presentó un nivel mayor de toxicidad **(Tabla 4)** con respecto a los demás según lo clasificado por Fani *et al*. (2014); Shekhar *et al.* (2017), pues por su cambio de tonalidad a rosado se consideró moderadamente tóxico que puede producir entre 21 a 500 µg/kg de micotoxinas, mientras que los aislados SQSA_2, SQSA_3, SQSA_11 **y** SQSA_8 por su cambio a un tono crema se clasificaron como menos tóxicos o no tóxicos que pueden producir menos de 20 µg/kg. Los *Aspergillus* SQSAn_9 y SQSAn_10 no se asociaron a un nivel de toxicidad (Fani *et al*., 2014; Shekhar *et al*., 2017) debido que no presentaron las características necesarias para incluirlos en esta clasificación.

Las pruebas de detección rápida resultaron de utilidad para seleccionar del total de aislados obtenidos de *Aspergillus* para el cumplimiento con los objetivos de este trabajo, pues estas pruebas permitieron identificar los aislados potenciales como productores de micotoxinas, en este caso aflatoxinas y ocratoxinas.

En lo que respecta a las toxinas producidas por *Fusarium* spp., no se encontró una metodología para realizar un escrutinio similar, por lo que, se decidió trabajar con todos los aislados obtenidos de *Fusarium* (cuatro aislados) y agruparlos según las características morfológicas. En total se seleccionaron 11 aislados, cuatro para *Fusarium* y siete para *Aspergillus* (**Tabla 12),** con los que se continuó este proyecto.

Tabla 12. Total de aislados seleccionados con su respectiva codificación.

Microorganismo	Código
Fusarium	SQGF_2
	SQSFv_3
	SQSFv_16
	SQSFn_M
Aspergillus	SQSA_2
	SQSA_3
	SQSAm_4
	SQSA_8
	SQSAn_9
	SQSAn_10
	SQSA_11

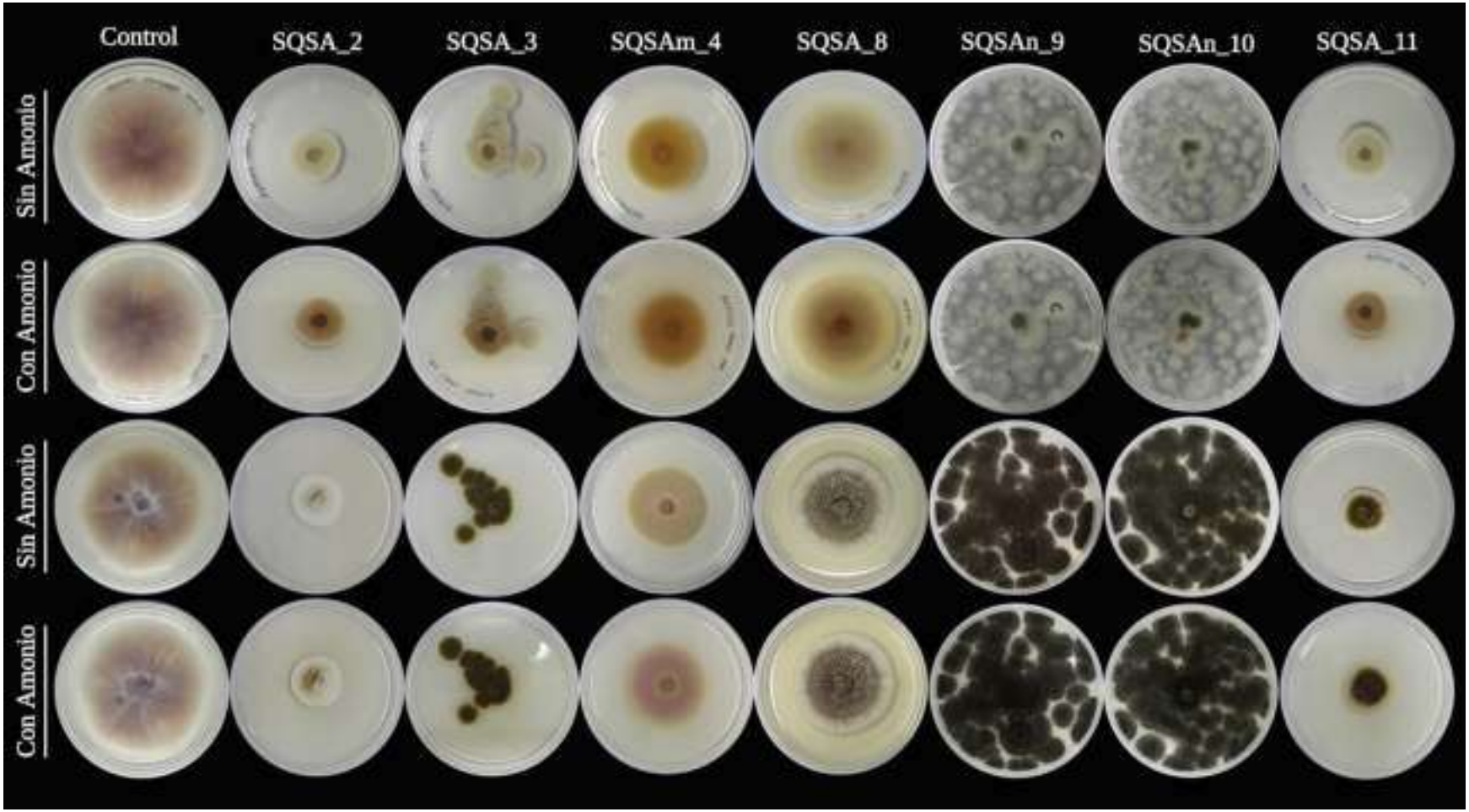
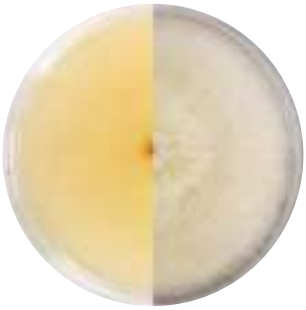
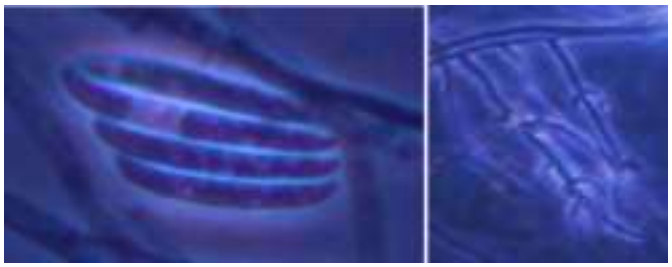


Figura 18. Prueba individual de vapor de amonio al 25 % en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (Fotografías: de la autora).

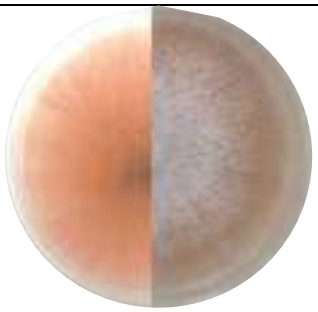
8.1.4. Descripción de aislados seleccionados

Realizada la purificación mediante la técnica de monoconidiales empleada por Crous *et al*. (2009, 2021) y Leslie & Summerell (2006), los aislados se sembraron en medio PDA para describir la colonia y observar las estructuras en un microscopio a 40 X **(Tabla 13)**. De esta manera, se observaron las características propias que describen a los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* como, micelio hialino, tallo aseptado sin ramificaciones y con terminación en vesícula globosa (Crous *et al*., 2009). En cuanto a *Fusarium* se observaron microconidios en cadena y macroconidos con tres a cuatro septos (Leslie y Summerell, 2006; Crous *et al*., 2021).

Tabla 13. Colonia y estructuras de los aislados seleccionados. (Fotografías: de la autora).

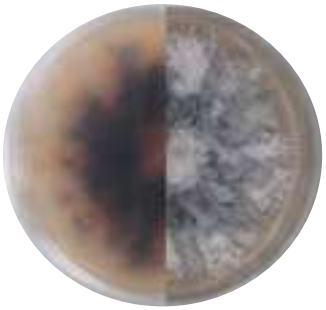
Aislado	Colonia en PDA	Estructuras
Fusarium SQGF_2		 Macroconidios con 3 a 4 septos Septo apical roma y septo basal apenas o casi dentada Conidióforo
Fusarium SQSFv_3		Microconidios de forma clavado u ovoide con base truncada

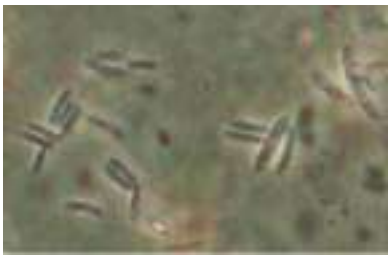
Fusarium
SQSFv_16



Macroconidios formando falsa cabeza en cadena

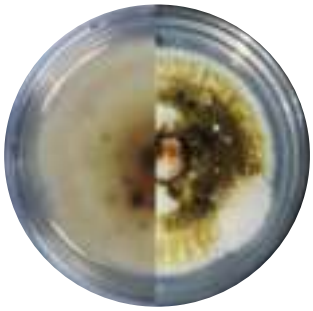
Fusarium
SQSFn_M

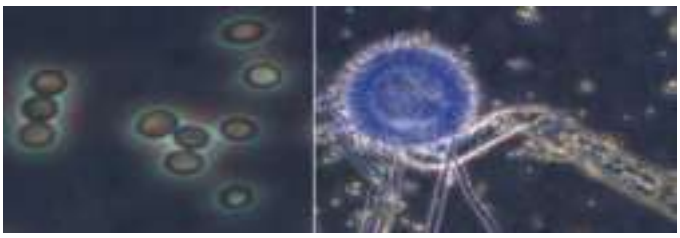




Macroconidios

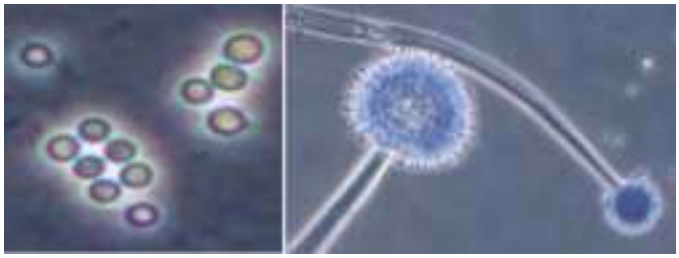
Aspergillus
SQSA_2





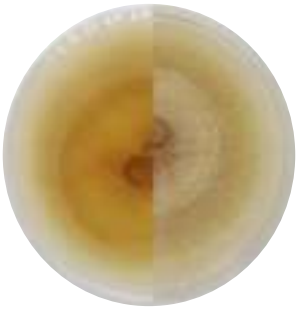
Conidios Conidióforo

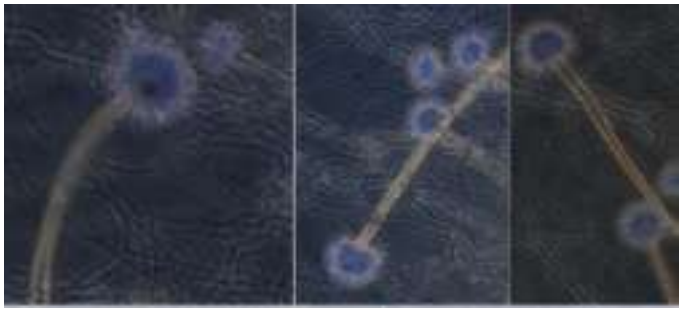
Aspergillus
SQSA_3



Conidios Conidióforos

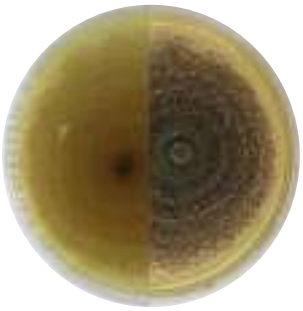
Aspergillus
SQSAm_4

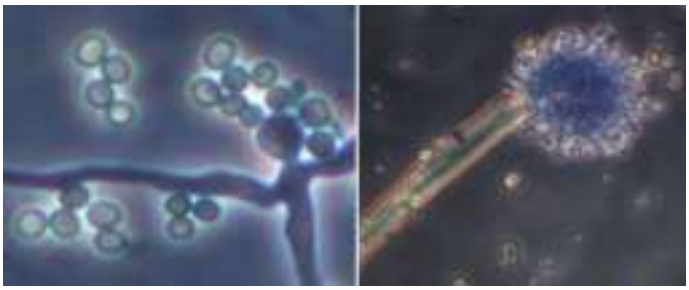




Conidióforos

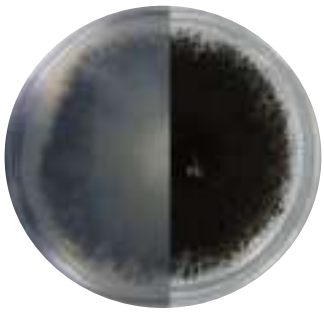
Aspergillus
SQSA_8

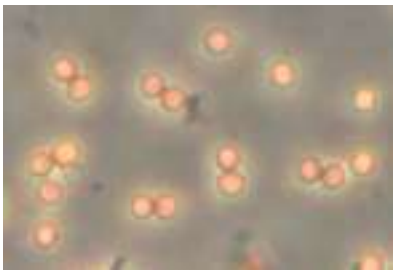




Conidios Conidióforo

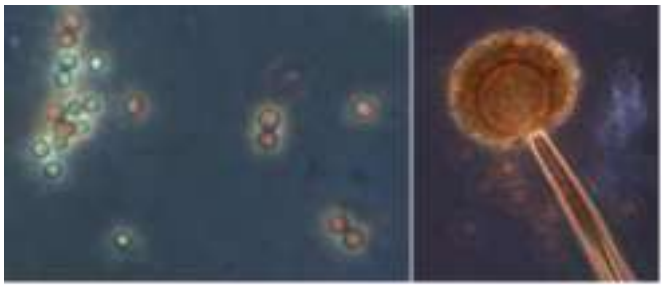
Aspergillus
SQSAn_9



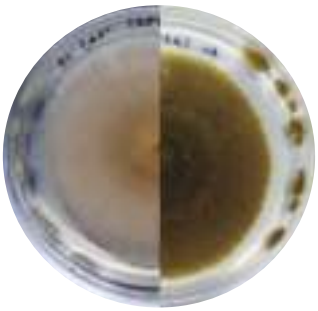
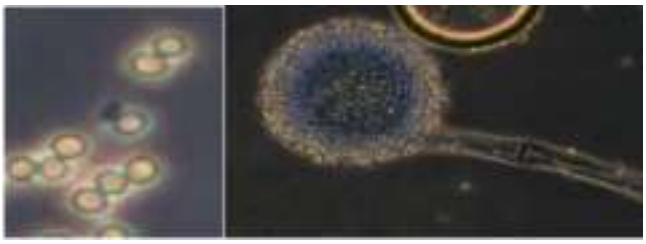


Conidios

Aspergillus
SQSAn_10



Conidios Conidióforo

Aspergillus SQSA_11			
		Conidios	Conidióforo

Como se mencionó con anterioridad, se identificaron géneros de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas los cuales están asociados a ser causantes de enfermedades de interés económico en el cultivo de maíz como *Fusarium* spp. causantes de la pudrición del tallo y de la mazorca, así mismo como *Aspergillus* spp., asociados a la pudrición de la mazorca (Castro del Ángel *et al*., 2020; Deras Flores, 2012; Salazar-González *et al*., 2020).

8.2. Identificación molecular

Los resultados de la cuantificación y calidad del ADN se presentan en la **Tabla 14**, con estos se llevó a cabo la identificación molecular de los aislados seleccionados como posibles productores de micotoxinas con la finalidad de conocer las especies obtenidas y con base en la revisión de la literatura concluir qué tipo de micotoxina producían, lo anterior se realizó para tener certeza al momento del envío a cuantificar.

Tabla 14. Lecturas de la cuantificación y calidad del DNA extraído.

Muestra de aislado	ng/µL	Relación	
		260/280	260/230
SQGF_2	381.2	2.04	1.68
SQSFv_3	241.4	2.05	1.22
SQSFv_16	180.9	2.06	1.58
SQSFn_M	226.3	2.09	2.14
SQSAw_2	1,791.0	2.09	2.30
SQSAw_3	220.9	2.08	2.29
SQSAm_4	663.2	2.05	2.24
SQSA_8	770.1	2.05	2.14
SQSAn_9	519.3	2.13	2.25
SQSAn_10	324.8	2.08	2.02
SQSAw_11	100.8	2.12	2.02

8.2.1. *Fusarium* spp.

El análisis filogenético multigen con base en las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2) y el factor de elongación (EF1) confirmó que el aislado SQGF_2 pertenece al género *Fusarium* dentro del complejo *incarnatum-equiseti* pero no se agrupa con ninguna de las secuencias de referencia de las especies descritas en este complejo, por lo que posiblemente podría ser una nueva especie **(Figura 19)**. Las especies de *Fusarium* pertenecientes a este complejo se caracterizan por ser endófitos, patógenos y micotoxigénicos (Venkatesh & Keller, 2019). En la **Tabla 15** se presenta un resumen de las micotoxinas reportadas por las especies pertenecientes a este complejo.

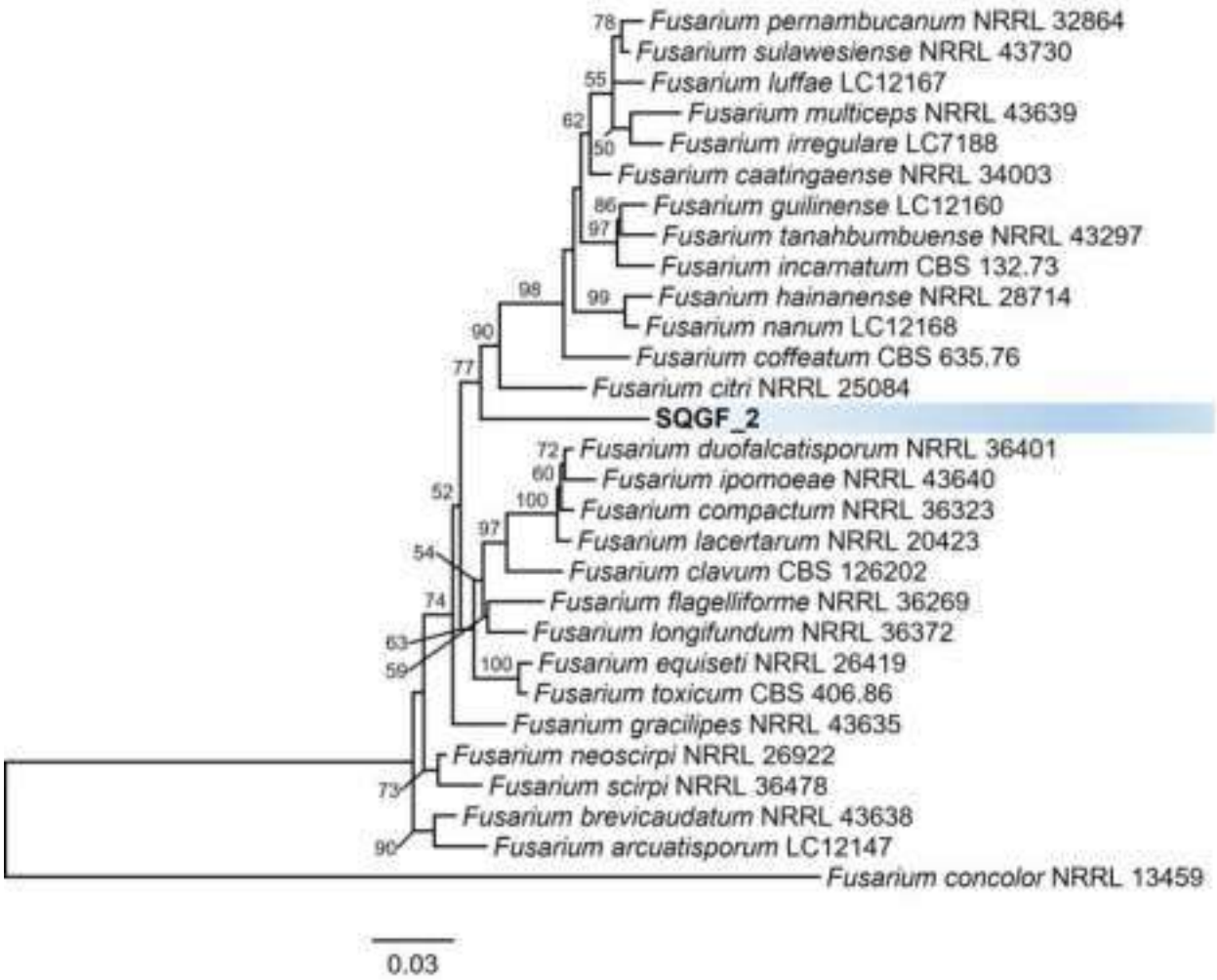


Figura 19. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados de factor de elongación (EF1) y la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2) regiones génicas de especies del complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*. La secuencia correspondiente de *Fusarium concolor* NRRL 13459 se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican valores Bootstrap > 50%. Los aislamientos caracterizados en este estudio se indican resaltados en color con formato en negrita.

En lo que respecta a los aislados SQSFv_3 y SQSFv_16, estos pertenecen al complejo *fujikuroi,* específicamente a la especie *F. verticillioides* **(**Bootrstrap 91%; **Figura 20)**. Este microorganismo afecta a varios cultivos agrícolas; en maíz *F. verticillioides* es el agente causal de la pudrición del tallo, raíz y mazorca (Leyva-Madrigal *et al*., 2015; Taba, 2004), también productor de micotoxinas (Mezzalama *et al*., 2015; Taba, 2004; Venkatesh & Keller, 2019).

Así mismo, el aislado SQSFn_M también pertenece al complejo *fujikuroi*. Este se agrupó con la secuencia de referencia de *F. nygamai,* con alto soporte bootstrap (100 %). Este hongo también produce micotoxinas (Venkatesh & Keller, 2019), participa en procesos co-infectivos con *F. verticillioides* y afecta a plántulas de maíz según Leyva-Madrigal *et al*. (2015). En la **Tabla 15** se presentan las micotoxinas reportadas para *F. verticillioides* y *F. nygamai.*

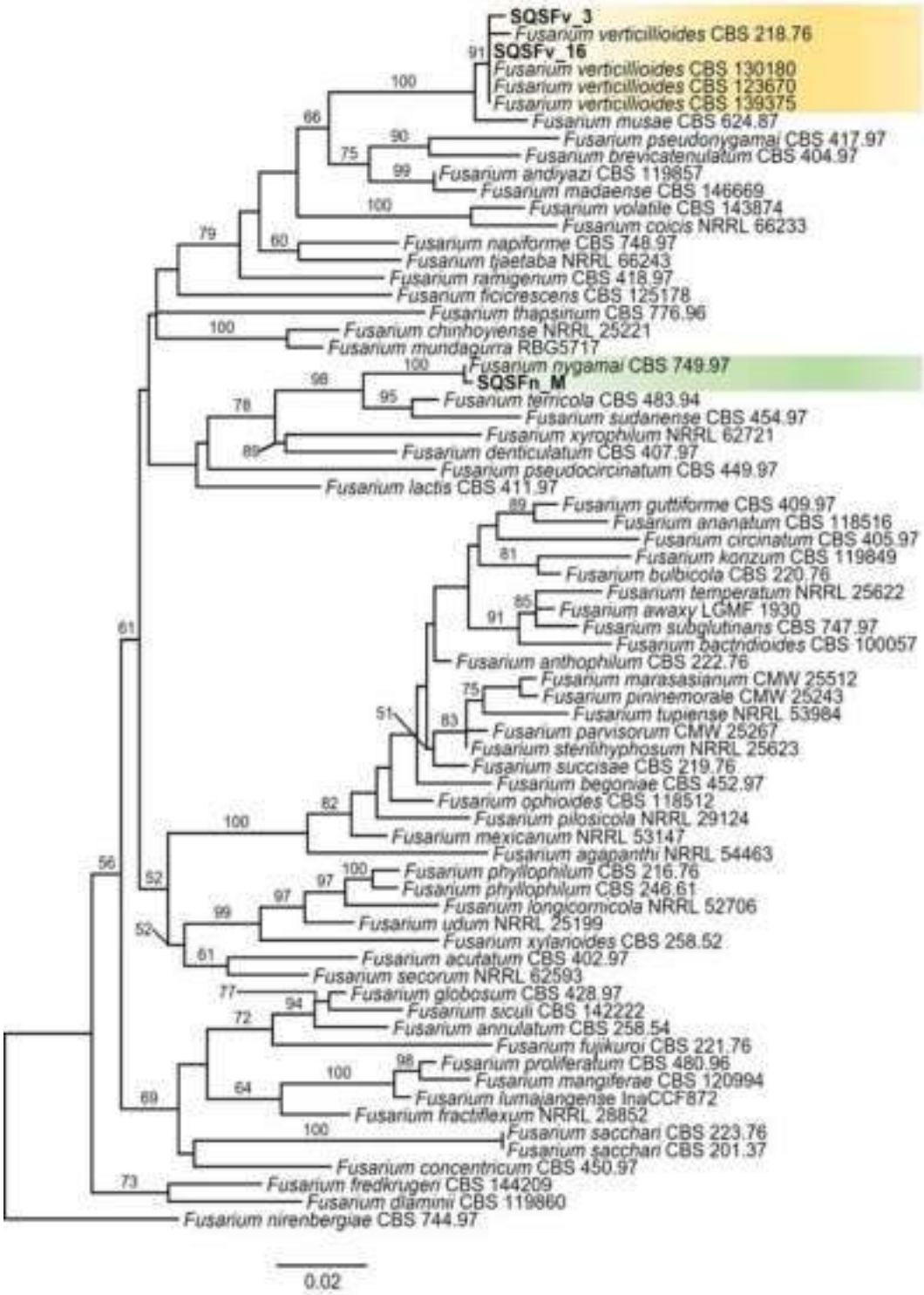


Figura 20. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados de factor de elongación (EF1) y la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2) regiones génicas de especies del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*. La secuencia correspondiente de *Fusarium nirenbergiae* CBS 744.97 se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican valores Bootstrap > 50%. Los aislamientos caracterizados en este estudio se indican resaltados en color con formato en negrita.

Tabla 15. Características y efecto en la salud al consumir productos contaminados por micotoxinas producidas por *Fusarium* spp. (Venkatesh & Keller, 2019).

Complejo	Especie	Micotoxina que produce	Efecto
Incarnatum-equiseti	*Fusarium equiseti*	Beauvericina (BEA)	- Actividad antimicrobiana - Actividad insecticida - Genotoxicidad - Citotoxicidad
		Zearalenona (ZEA)	- Estrógeno no esteroideo - Inmunotoxicidad - Hepatocarcinoma - Nefropatía - Toxicidad hematológica
		Moniliformina (MON)	- Fitotoxicidad - Citotoxicidad
		Nivalenol (NIV)	- Toxicidad hematológica - Citotoxicidad - Inmunotoxicidad
		Fusarenon-X (FusX)	- Genotoxicidad - Citotoxicidad
		Ácido fusárico (FA)	- Actividad antibacteriana - Neurotoxicidad - Fitotoxicidad
		Equisetin (EQST)	- Actividad antibacteriana - Actividad antiviral - Actividad fungicida - Fitotoxicidad - Citotoxicidad
	Fusarium equiseti *Fusarium compactum*	Diacetoxyscirpenol (DAS)	- Toxicidad hematológica - Teratogenicidad
	Fusarium equiseti *Fusarium compactum* *Fusarium scirpi*	Enniatinas (ENs)	- Actividad antimicrobiana - Actividad insecticida - Fitotoxicidad - Citotoxicidad
Fujikuroi	*Fusarium verticillioides*	Beauvericina (BEA)	- Actividad antimicrobiana - Actividad insecticida - Genotoxicidad - Citotoxicidad
		Moniliformina (MON)	- Fitotoxicidad - Citotoxicidad
		Fusaproliferina (FUS)	- Fitotoxicidad - Actividad insecticida - Citotoxicidad - Teratogenicidad
		Fumonisinas (FUM)	- Carcinogenicidad

			- Neurotoxicidad - Hepatotoxicidad
		Ácido fusárico (FA)	- Actividad antibacteriana - Neurotoxicidad - Fitotoxicidad
		Fasarina C (FusC)	- Inhibe la producción de estrógeno - Carcinogenicidad
	Fusarium nygamai	Beauvericina (BEA)	- Actividad antimicrobiana - Actividad insecticida - Genotoxicidad - Citotoxicidad
		Moniliformina (MON)	- Fitotoxicidad - Citotoxicidad
		Fumonisinas (FUM)	- Carcinogenicidad - Neurotoxicidad - Hepatotoxicidad

8.2.2. *Aspergillus* spp.

La concatenación del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM) para los aislados de *Aspergillus* permitieron determinar que, los aislados SQSA_2, SQSA_3 y SQSA_11 pertenecen a la sección *Cremei* con una cercanía a la especie *wentii* **(Figura 21)**. Este aislado no se logró definir a nivel de especie dado a que no se encontraron suficientes secuencias de referencias para el marcador RPB2 depositadas en el GenBank.

De esta manera, por su cercanía a la especie *wentii* se podría referir a estos aislados como hongos endófitos, patógenos de semillas (Chalam *et al*., 2020; Singh *et al*., 2018) y productores de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y citrinina pero esto ha sido desmentido debido a identificaciones incorrectas del microorganismo, también existen dudas con respecto a la producción de ocratoxinas y BNP: ácido β-nitropropionico (Frisvad *et al*., 2006, 2007). Sin embargo, Hubka *et al*. (2016); Susca *et al*. (2020) reportan a *A. wentii* como productor de micotoxinas de tipo BNP, emodina con efecto sobre la salud animal (Hubka *et al*., 2016) y ácido penicílico, el cual es fitotóxico, hepatotóxico, citotóxico, cardiotóxico y carcinogénico (Frisvad, 2018).

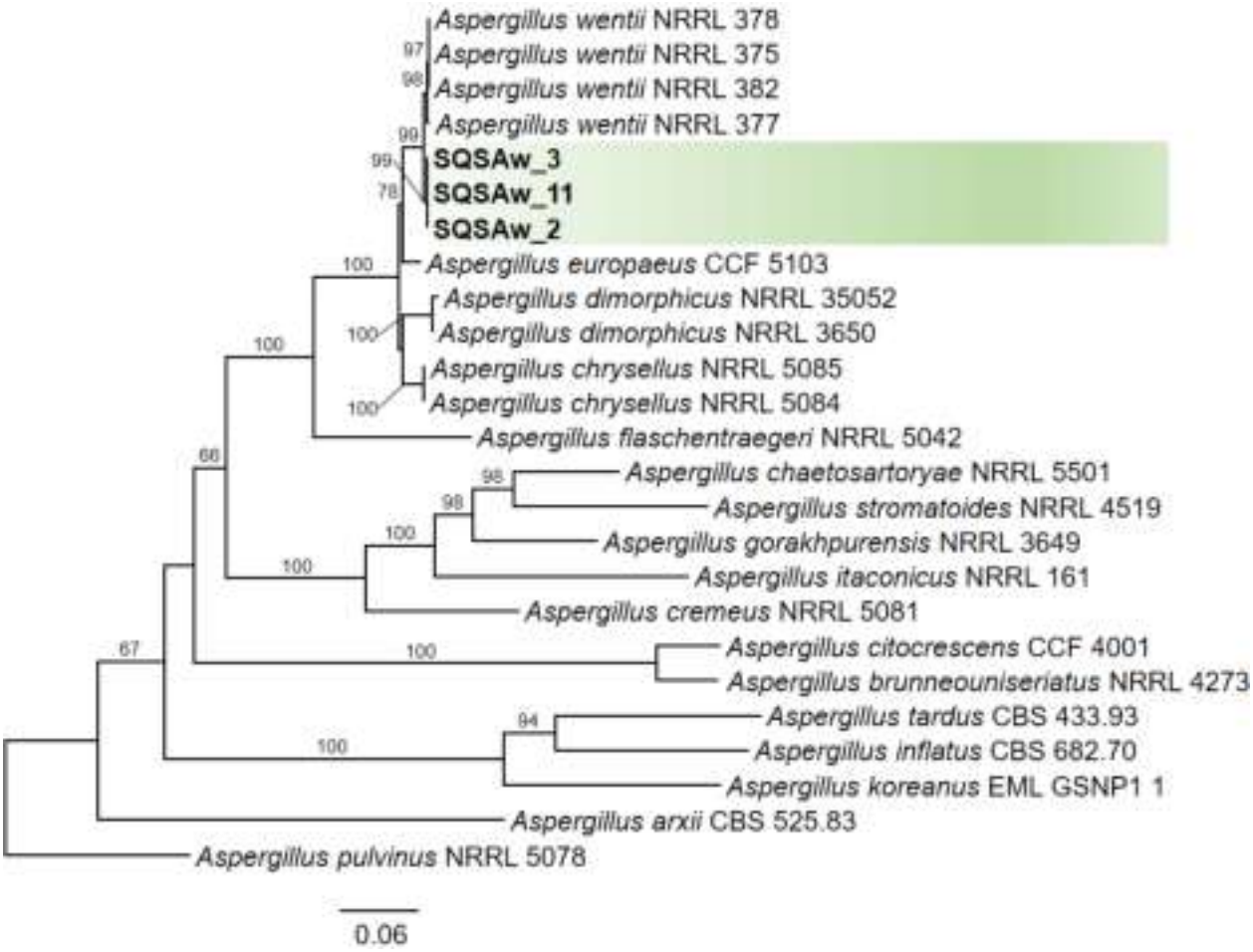


Figura 21. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM), regiones de la sección *Cremei* de *Aspergillus* spp. La secuencia correspondiente de *Aspergillus pulvinus* NRRL 5078 se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican valores Bootstrap > 50%. Los aislamientos caracterizados en este estudio se indican resaltados en color con formato en negrita.

Por otra parte, el análisis multilocus del aislado SQSAm_4 determinó que pertenece al género *Aspergillus* dentro de la sección *Circumdati* y se agrupó con la secuencia de referencia de *A. muricatus* con un soporte bootstrap del 60 % **(Figura 22)**. Este hongo, en su forma teleomorfa *Neopetromyces muricatus*, se reporta como productor de ocratoxina A, ácido penicílico y xantomegnina (Frisvad, 2018; Frisvad *et al*., 2006, 2007; Pitt *et al*., 2012).

Gacem *et al*. (2019); Kuntawee & Akarapisan (2015) describen a las ocratoxinas A como nefrotóxicas que no influyen directamente como mutagénicos porque no presentan la habilidad de

formar un enlace covalente al ADN, sin embargo, el estrés oxidativo provocado por este tipo de micotoxinas ocasiona genotoxicidad y citotoxicidad induciendo a problemas carcinogénicos. De igual manera, los aislados SQSAn_9 y SQSAn_10 son productores de ocratoxinas A y fumonisinas, el análisis filogenético permitió identificarlos como *Aspergillus niger* **(Figura 23).**

En cuanto al ácido penicílico, esta toxina actúa con un efecto aditivo con sinergismo promisorio en interacciones con otras micotoxinas en biosíntesis simultánea (Frisvad, 2018), ahora, Frisvad & Samson (2004) sugieren que las xantomegninas pueden ocasionar problemas de salud en animales domésticos a nivel de riñones e hígado.

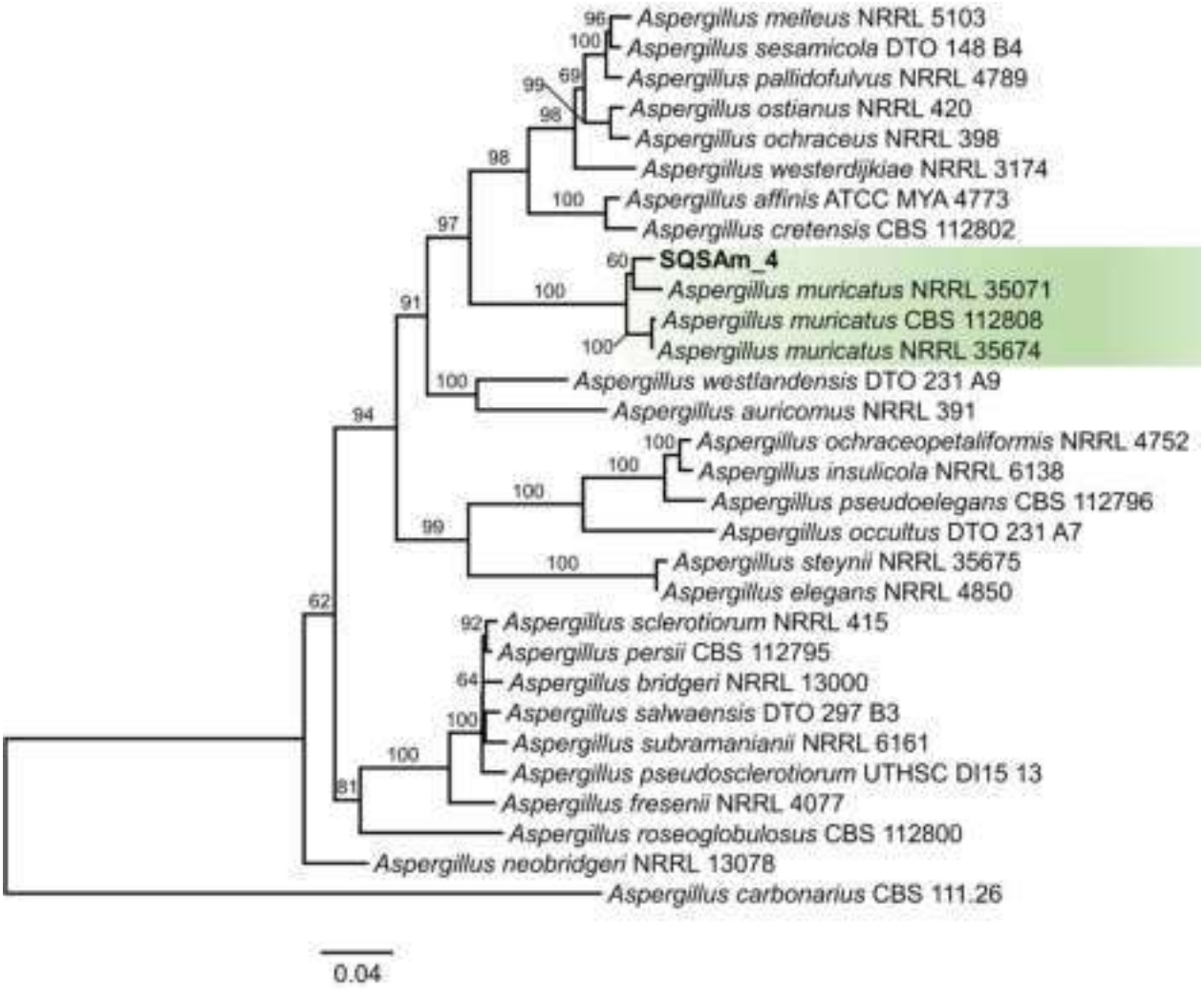


Figura 22. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM), regiones de la sección *Circumdati* de *Aspergillus* spp. La secuencia correspondiente de *Aspergillus carbonarius* CBS 111.26 se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican valores Bootstrap > 50%. Los aislamientos caracterizados en este estudio se indican resaltados en color con formato en negrita.

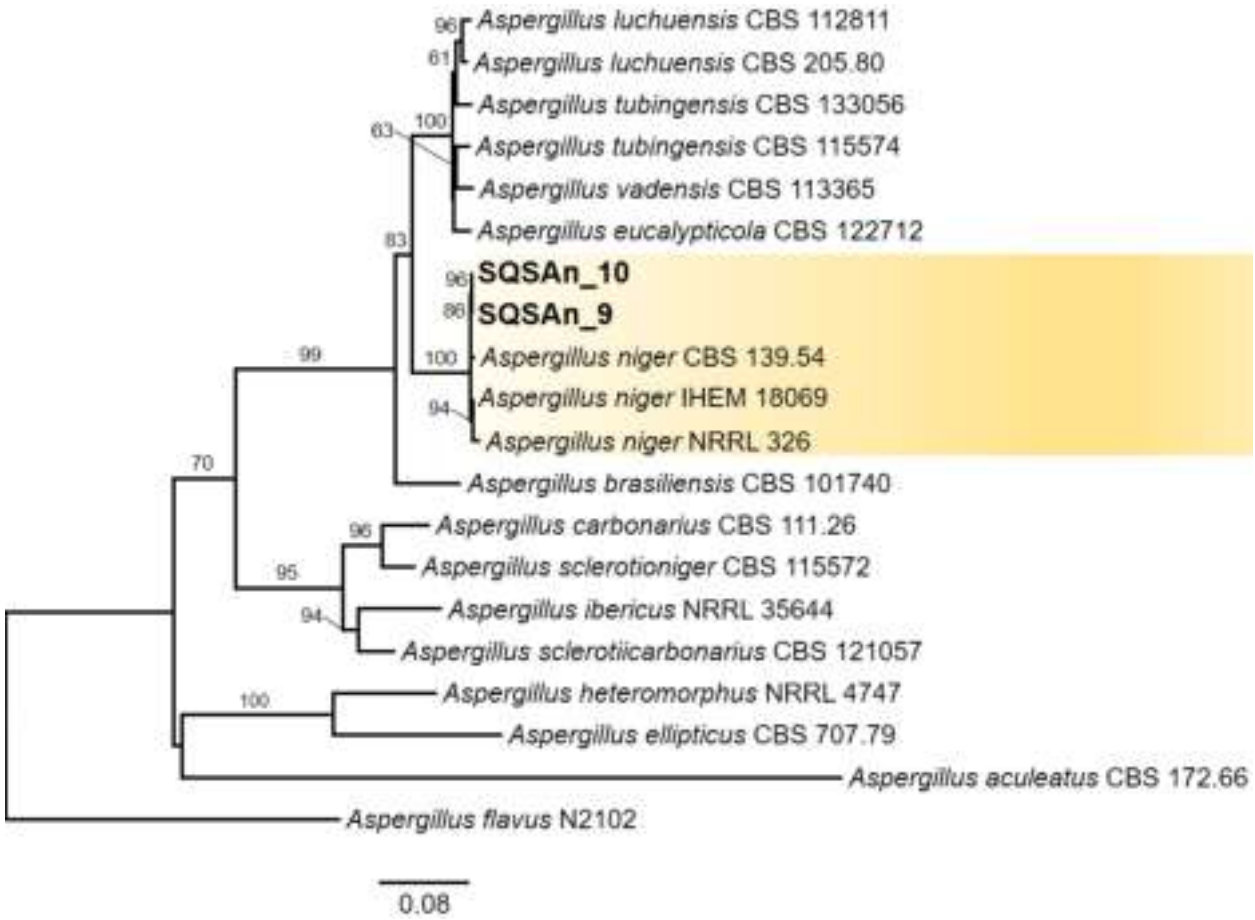


Figura23. Árbol de máxima verosimilitud y modelo GTRGAMMAI basado en el conjunto de datos concatenados del espaciador transcrito interno (ITS) y las secuencias parciales de los genes que codifican para la segunda subunidad RNA polimerasa II (RPB2), la β-tubulina (BenA) y calmodulina (CaM), regiones de la sección *Nigri* de *Aspergillus* spp. La secuencia correspondiente de *Aspergillus flavus* N2102 se utilizó como grupo externo. Los números en las ramas indican valores Bootstrap > 50%. Los aislamientos caracterizados en este estudio se indican resaltados en color con formato en negrita.

En relación al aislado *Aspergillus* SQSA_8 no se logró analizar filogenéticamente debido a la secuencia interrumpida en el filograma obtenido, a pesar de realizar varias veces la purificación del hongo, extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación no se identificó la especie de este aislado; sin embargo, con los pocos fragmentos de la secuencia se considera que posiblemente sea un *A. flavus* y según las pruebas de detección rápida de micotoxinas indican que es productor de aflatoxinas, las cuales son consideradas carcinógénicas y mutagénicas debido a las aberraciones cromosomales ocasionadas durante la división celular así como el rompimiento de las cromátidas en el ADN (Gacem *et al.*, 2019a).

8.3. Cuantificación de micotoxinas

De la inoculación de semillas de maíz con los aislados seleccionados se obtuvieron tres resultados: 1) intensidad de fluorescencia en granos de maíz **(Figuras 24 y 25)**, 2) cuantificación de micotoxinas producidas **(Figura 26)** y, 3) porcentaje de daño en semillas inoculadas con el aislado de *F. verticillioides* SQSFv_16 **(Figuras 28 y 27)**.

En primer lugar, se observó la epifluorescencia bajo una exposición de 381.0 m/s y 88.2 m/s para el canal verde y el canal claro, respectivamente. En ambos campos se empleó una ganancia de 2.6 X **(Figura 24)**. De esta manera, el aislado SQSA_8 presentó mayor intensidad de fluorescencia con un promedio de 20 unidades arbitrarias mientras que, los demás aislados presentaron en promedio 18 unidades, similares al control empleado como referencia que no emitía fluorescencia **(Figura 25).** Lo anterior, permitió corroborar lo analizado cualitativamente en la prueba de detección rápida con respecto a las premisas sobre el aislado SQSA_8.

En segunda instancia, el laboratorio AGQ realizó los análisis de cuantificación de aflatoxinas (AF) a través de cromatografía líquida-espectrometría de masas y pruebas serológicas para determinar la cantidad de fumonisinas (FUM) y deoxinivalenol (DON), lo anterior bajo los protocolos del procedimiento normalizado de trabajo (PNT) concernientes al laboratorio prestador del servicio. Los resultados muestran que de los aislados de *Fusarium* enviados a cuantificar **(Tabla 8)** ninguno produjo deoxinivalenol, pero sí fumonisinas en cantidades de 1,060 µg/kg para el aislado SQSFn_M y 3,430 µg/kg para SQSFV_16. El aislado SQSGF_2 no mostró producción de toxinas de tipo FUM y DON **(Figura 26).**

Para los *Aspergillus* **(Tabla 8),** el aislado SQSAn_9 es productor de fumonisinas (1,270 µg/kg) pero no de ocratoxinas A, mientras que el aislado SQSAm_4 produjo 86.3 µg/kg de ocratoxinas A corroborando el nivel de toxicidad mencionado por Fani *et al*. (2014); Shekhar *et al.* (2017); el SQSA_3 no alcanzó el límite establecido por el laboratorio para la detección de este tipo de toxina. Finalmente, el SQSA_8 no es productor de ocratoxinas A pero si de aflatoxinas de tipo B1 (3,828 µg/kg) y B2 (356 µg/kg), confirmándose con estos resultados lo deductivo en las pruebas de fluorescencia **(Figura 26).**

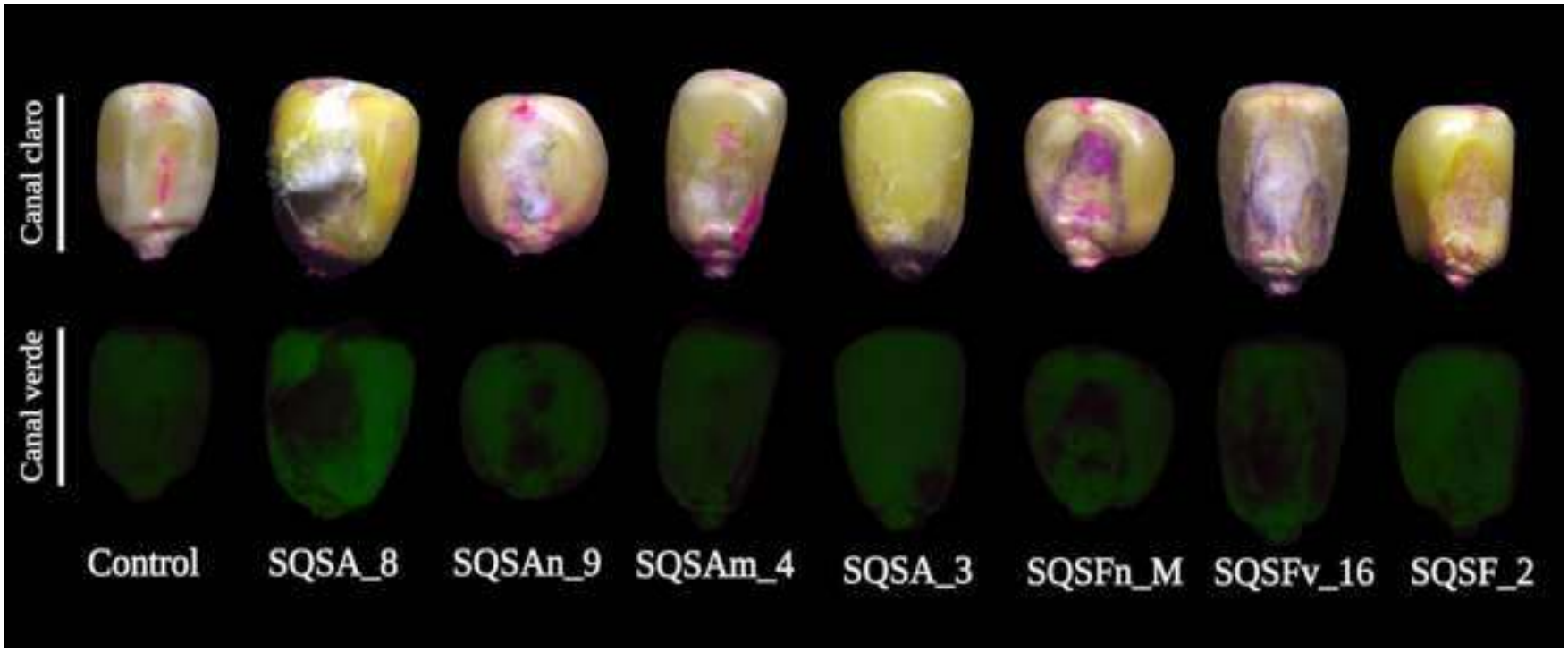


Figura 24. Intensidad de fluorescencia en granos de maíz (*Zea mays*) inoculados con aislados seleccionados para cuantificación de micotoxinas (Fotografías: de la autora).

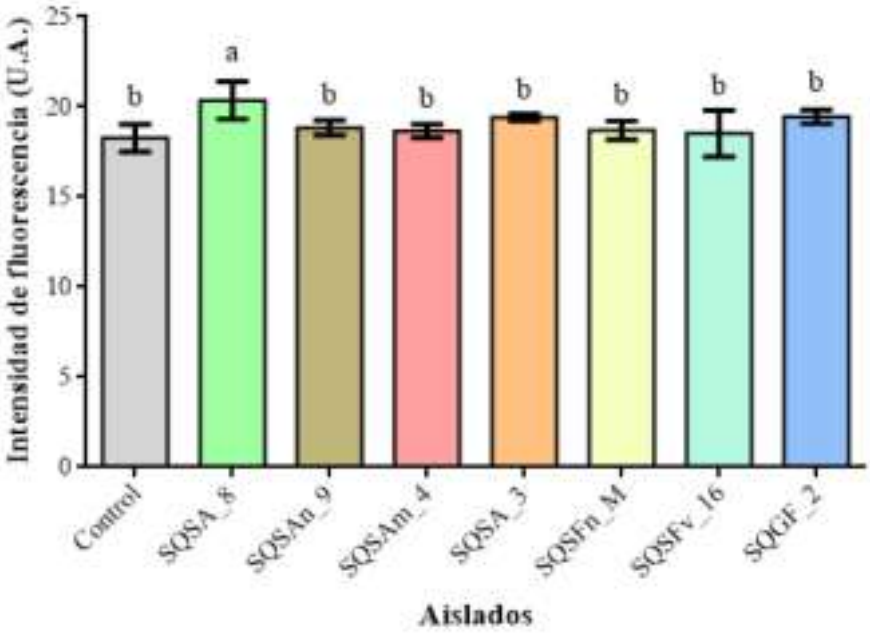


Figura 25. Intensidad de fluorescencia en granos de maíz (*Zea mays*) inoculados con aislados seleccionados para cuantificación de micotoxinas, n= 20, Tukey ($P < 0.05$).

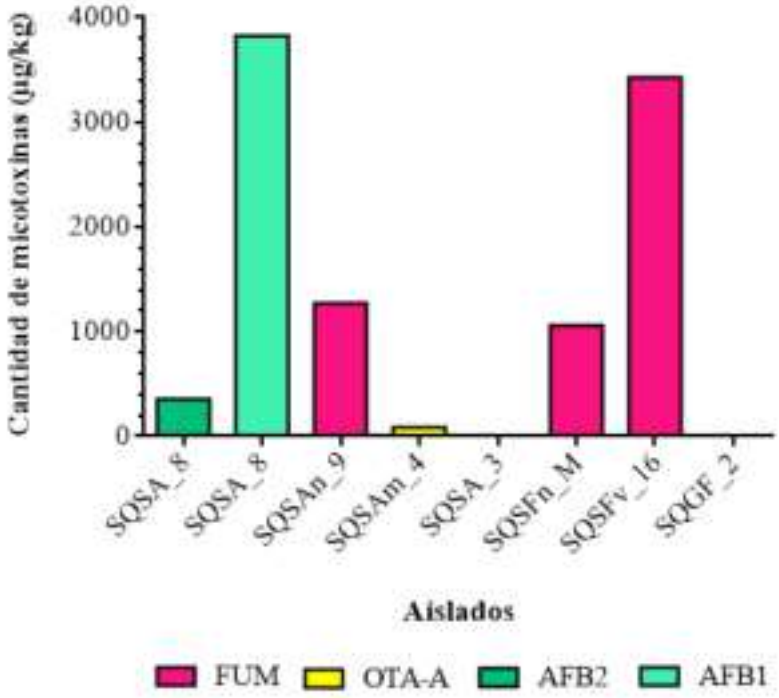


Figura 26. Cantidad de micotoxinas producidas por los aislados evaluados.

Finalmente, de la estandarización de la metodología para el envío a cuantificar las micotoxinas se apreciaron síntomas en las semillas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* SQSFv_16 **(Figura 28)**, por lo que se evaluó el nivel de daño en estas. El porcentaje de daño en las semillas y la presencia de heridas es directamente proporcional, es decir, a mayor número de semillas heridas, mayor es el porcentaje de daño. En la **Figura 27** se observa que el 100 % de semillas lesionadas obtuvo un porcentaje de daño del 35.5 %, mientras que, en los granos sin lesión el daño ocasionado fue del 22 % presentándose diferencias estadísticamente significativas entre estos dos tratamientos y sin diferencias entre el 10 % y el 100 % de semillas con lesión; en cuanto al testigo se presentan diferencias altamente significativas entre este y los diferentes tratamientos evaluados. Estos resultados demostraron la capacidad patogénica de *F. verticillioides* en maíz con lo que se corrobora lo mencionado por Leyva-Madrigal *et al*. (2015); Pascual *et al*. (2016); Taba (2004) por lo que se concluye que, el aislado SQSFv_16 obtenido en este trabajo es fitopatógeno a maíz.

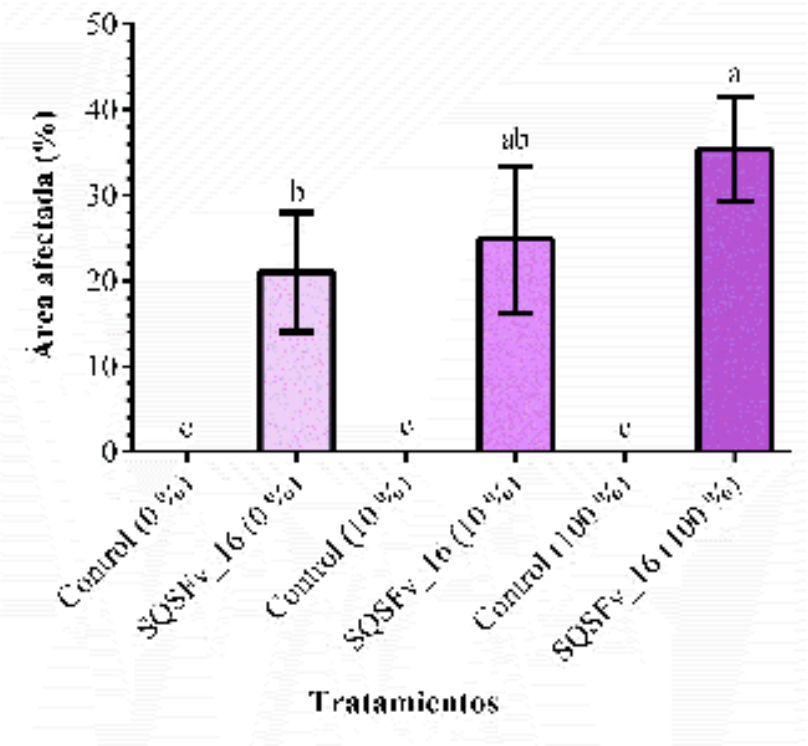


Figura 27. Daños en semillas ocasionados por *Fusarium verticillioides* SQSFv_16. (**Izquierda:** 25 g de semillas sin herida; **Centro:** 25 g de semilla con el 10 % de herida en la zona del embrión; **Derecha:** 25 g de semilla con el 100 % de herida en la zona del embrión), n= 50, Tukey ($P < 0.05$).

Figura 28. Daños en semillas ocasionados por *Fusarium verticillioides* SQSFv_16. (**Izquierda:** 25 g de semillas sin herida; **Centro:** 25 g de semilla con el 10 % de herida en la zona del embrión; **Derecha:** 25 g de semilla con el 100 % de herida en la zona del embrión) (Fotografías: de la autora).

8.4. Pruebas de eficacia de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil®

8.4.1. Pruebas de antibiosis (para Biosoup®) y micoparasitismo (para Tribiosoil®)

Derivado de la cuantificación de micotoxinas se seleccionó el aislado con mayor producción de estas, tanto para el género *Fusarium* como para *Aspergillus*. Se seleccionó a *F. verticillioides* SQSFv_16 con una producción de 3,430 µg/kg de fumonisinas y a *Aspergillus* sp. SQSA_8 productor de aflatoxinas con un total de 4,184 µg/kg. Con estos aislados se realizaron las pruebas de eficacia con los microorganismos benéficos que componen los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil®.

Antibiosis

A) Técnica en espiral

En la **Figura 29** se presenta el desarrollo de *F. verticillioides* SQSFv_16 y el efecto en su crecimiento al confrontarse con bacterias benéficas que componen a Biosoup®. La mayor inhibición se observó a las 144 h con *A. brasilense* Q28 con un 89.91 %, seguido de *B. subtilis* Q11 con un 88.36 %, *P. fluorescens* Q35 con 69.43 % y *Azotobacter* sp. con 29.04 %. En lo que respecta a la inhibición del hongo con relación a la distancia de siembra con la bacteria; en las cuatro primeras distancias al hongo, el porcentaje promedio de inhibición osciló desde el 12.00 % para *Azotobacter sp.* y un 71.50 % para *B. subtilis* Q11 **(Figura 30).**

La tendencia de control por las bacterias evaluadas se presentó de manera similar contra *Aspergillus* sp. SQSA_8 (**Figura 31**); en este caso *B. subtilis* Q11 mostró la mayor inhibición (95.79 %) a las 168 h, seguido de *A. brasilense* Q28 con 81.38 %, *Azotobacter* sp. un 56.29 % y *P. fluorescens* Q35 del 52.11 % (**Figura 32**). En cuanto a la inhibición del fitopatógeno con relación a la distancia de siembra con la bacteria, se observó un efecto inhibitorio homogéneo.

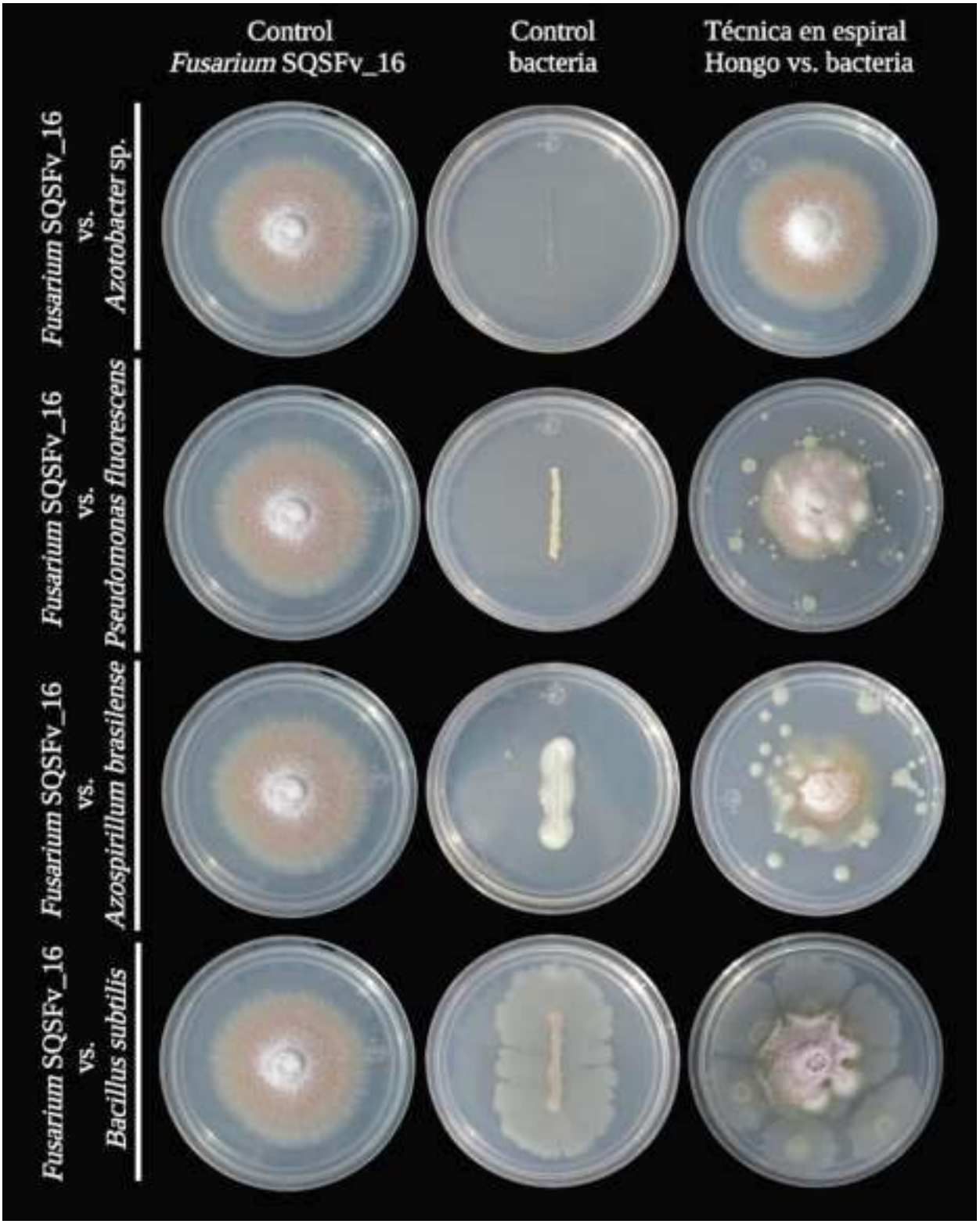


Figura 29. Prueba de antibiosis a las 96 h. Técnica en espiral *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 (Fotografías: de la autora).

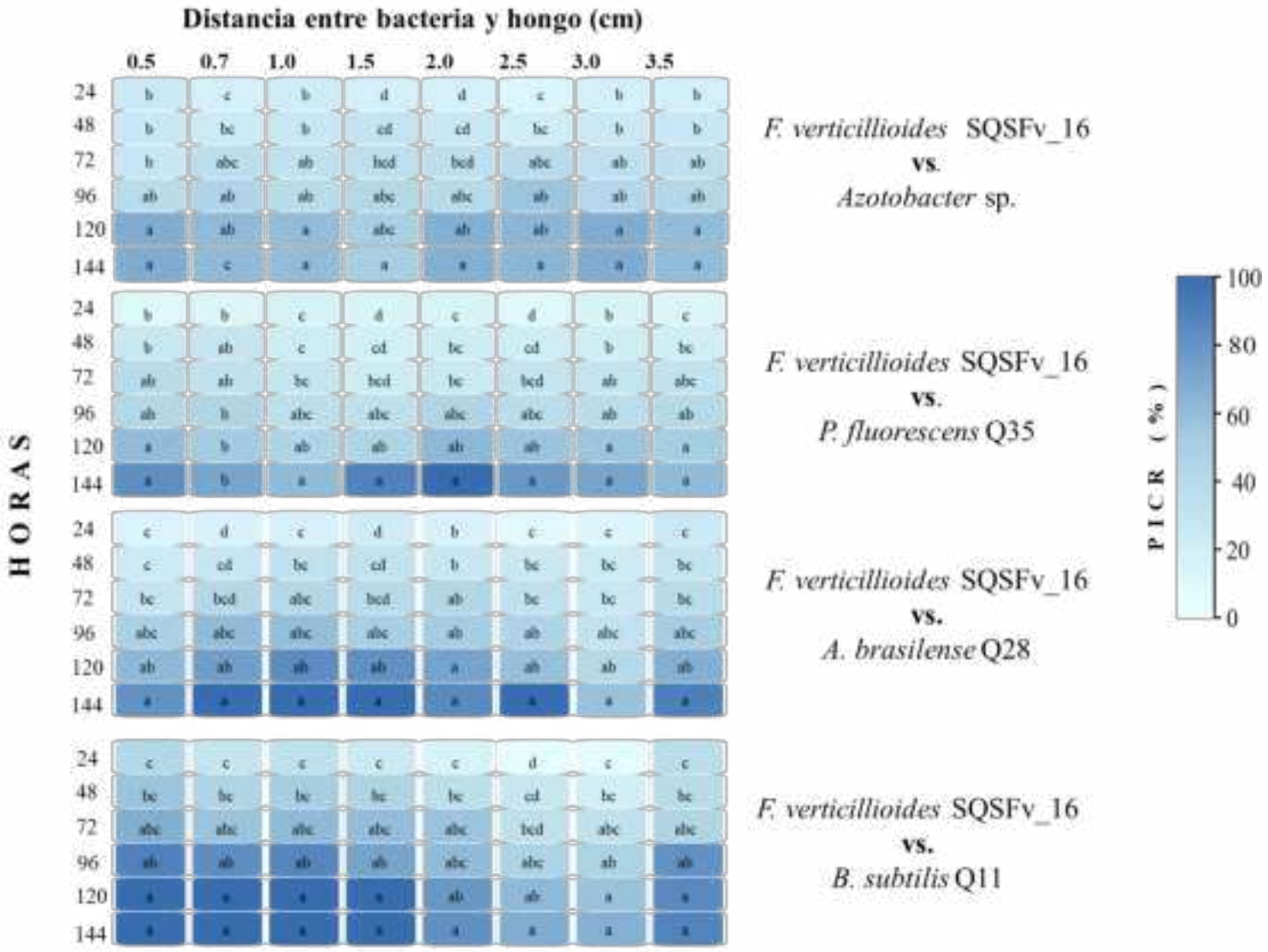


Figura 30. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (% PICR) de *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 en la prueba de antibiosis, técnica en espiral.

Figura 31. Prueba de antibiosis a las 96 h. Técnica en espiral *Aspergillus* sp. SQSA_8 (Fotografías: de la autora).

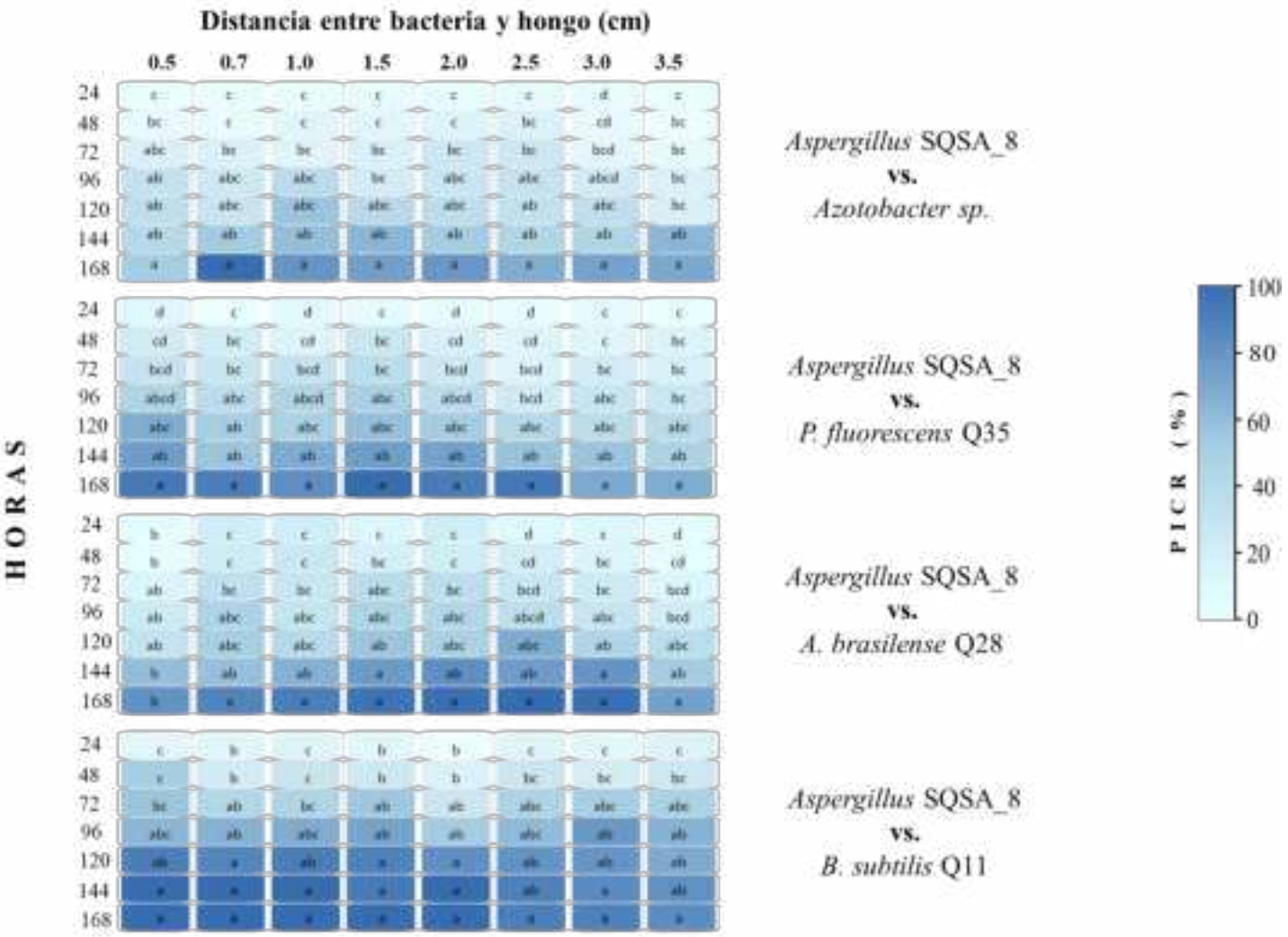


Figura 32. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (% PICR) de *Aspergillus* sp. SQSA_8 en la prueba de antibiosis, técnica en espiral.

Los resultados obtenidos por *Azotobacter* sp. en esta prueba demuestran su actividad antifúngica sobre los aislados *F. verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8, estos resultados son promisorios teniendo en cuenta que, la principal característica biológica de este microorganismo es la fijación de nitrógeno atmosférico. Su potencial como agente de biocontrol se observó sobre *Macrophomina phaseolina* en plantas de soya (Singh *et al*., 2018), hongo con origen del suelo al igual que los aislados obtenidos y evaluados en este trabajo. Deepa *et al*., (2022) evaluó el potencial de los metabolitos producidos por *Azotobacter* spp. sobre el desarrollo de *F. verticillioides* y Hanumanthu *et al*. (2022) evaluó la eficacia de *A. salinestris* sobre la infección ocasionada por *Fusarium* spp. en semillas de maíz, obteniendo una reducción del 23 %.

En cuanto a *P. fluorescens* Q35, trabajos realizados por Pour *et al*. (2019) presentaron porcentajes de inhibición superiores al 79.14 % sobre *F. solani* en papa. Sun *et al*. (2021) demostraron la reducción en un 26.67 % de la producción de deoxinivalenol producido por *F. graminearum* en trigo y Ullah *et al*. (2020) obtuvieron reducciones entre el 25 y 45 % de reducción en hongos fitopatógenos como *F. moniliforme, F. oxysporum, Pyricularia oryzae* y *M. phaseolina.* Por lo anterior, la cepa Q35 de *P. fluorescens* evaluada en este trabajo es un agente de biocontrol con capacidad de inhibir a las 144 h en un 69.43 % a *F. verticillioides* SQSFv_16 y con un 52.11 % a *Aspergillus* SQSA_8 a las 168 h.

Como se apreció en esta prueba de antibiosis *A. brasilense* Q28 y *B. subtilis* Q11 fueron las cepas que presentaron mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *F. verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8. Como era de esperarse *B. subtilis* Q11 se caracteriza por sus facultades como agente de biocontrol y en la biodegradación del micotoxinas, Shukla *et al*. (2018) reportaron una reducción de 45 % en la producción de ocratoxinas e inhibición del crecimiento de *A. ochraceus* y *A. carbonari* (Gacem *et al*., 2019b). En estudios realizados por Baard *et al*. (2023) comprobaron la eficacia de *B. subtilis* y *B. tequilensis* sobre *F. oxysporum, F. culmorum F. proliferatum* y *F. verticillioides* con inhibiciones en el crecimiento del hongo de 40.64, 54.06, 58.74 y 57.49 %, respectivamente.

B) Consorcio microbiano

Con esta prueba se apreció la interacción de las mismas cuatro bacterias empleadas en este trabajo para evaluar su efecto sobre el crecimiento de los aislados de *F. verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8 **(Figura 33)**. El consorcio presentó porcentajes de inhibición del 31.94 % sobre *F. verticillioides* SQSFv_16 y del 48.48 % para *Aspergillus* sp. SQSA_8.

Principalmente las bacterias promotoras de crecimiento son empleadas como biofertilizantes, pero estas también inducen tolerancia en las plantas frente a diferentes estreses uno de ellos es el ataque por fitopatógenos. Singh *et al*. (2018) y Madigan *et al*. (2015) expusieron que el uso en consorcio de *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp*., Azospirillum* spp. y *Bacillus* spp. actúan en la degradación de las moléculas con persistencia en el suelo de agroquímicos empleados en el manejo fitosanitario de cultivos. Además, trabajos realizados por Alsaady *et al*. (2020) comprobaron la efectividad de

las aplicaciones en consorcio de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., y *Streptomyces* spp. sobre *F. graminearum* agente causal de la pudrición de la corona en trigo con reducciones en el porcentaje de severidad del 29.21 % y de incidencia del 45.83 %. Caso contrario ocurrió en el estudio realizado por Widyantoro *et al*. (2020), donde concluyeron que *Azotobacter* y *Azospirillum* no presentaron efecto sobre el desarrollo del *F. oxysporum f. sp. cubense* (FOC). Por otra parte, Ahmad *et al*. (2008) obtuvieron un 31.50 % de inhibición sobre *Aspergillus* spp. con *Azotobacter* spp., y del 15.50 % con *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp.

Los resultados de esta prueba demostraron la capacidad antifúngica de *Azotobacter* sp., *P. fluorescens* Q35, *A. brasiliense* Q28 y *B. subtilis* Q11 en consorcio con un efecto inhibitorio sobre el aislado de *Aspergillus* sp. SQSA_8 del 35.46, 35.82, 43.24 y 79.10 %, respectivamente, con diferencias significativas **(Figura 33)** entre *B. subtilis* Q11 con respecto a las demás bacterias evaluadas. En cuanto al efecto sobre el crecimiento de *F. verticillioides* SQSFv_16 se presentó una inhibición del 20.50 % para *Azotobacter* sp., 31.98 % para *P. fluorescens* Q35, un 31.83 % para *A. brasiliense* Q28 y 43.45 % para *B. subtilis* Q11.

Al igual que en la antibiosis con la técnica en espiral *B. subtilis* Q11 fue el microbial con mayor porcentaje de inhibición sobre los aislados evaluados, por lo tanto, estos resultados concluyen que el uso de las cepas bacterianas evaluadas en este trabajo empleadas tanto en consorcio como en espiral son efectivas sobre el desarrollo de los aislados de *F. verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8, siendo *B. subtilis* Q11 la de mayor efectividad sobre estos. *Azotobacter* sp., y *A. brasiliense* Q28, consideradas como biofertilizantes, presentaron también potencial antifúngico para los patógenos evaluados.

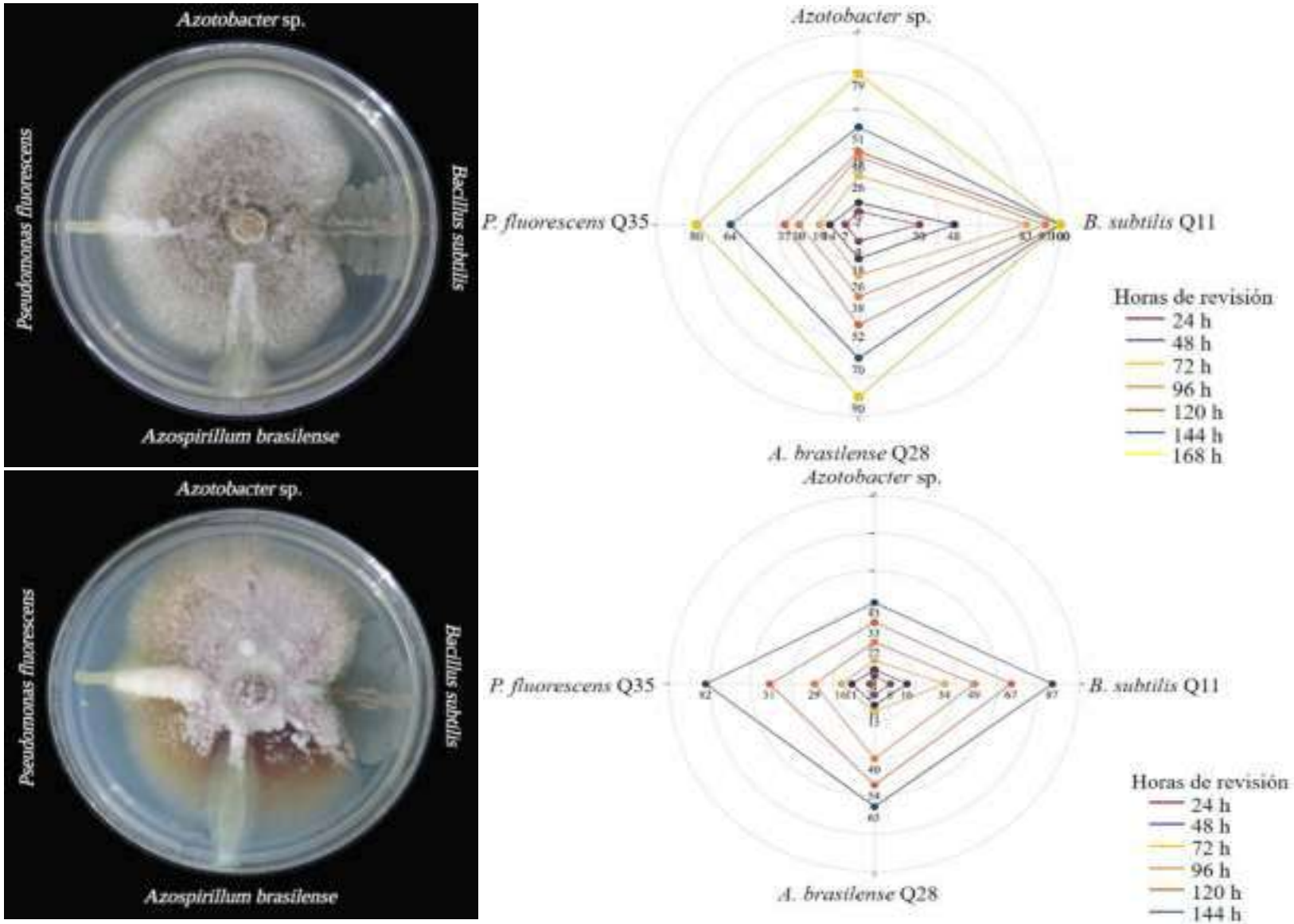


Figura 33. Prueba de antibiosis a las 168 h. Consorcio microbiano versus *Aspergillus* sp. SQSA_8 (arriba) y *Fusarium verticillioides* SQSFV_16 (abajo) (Fotografías: de la autora).

Micoparasitismo: técnica de confrontación dual

Al final del experimento, la confrontación dual entre *T. viride* Q07 versus *F. verticillioides* SQSFV_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8 **(Figura 34)** mostró resultados del 100 % de inhibición en el crecimiento de los fitopatógenos productores de micotoxinas a partir de las 72 h de incubación para *Aspergillus* sp. SQSA_8 y de las 120 h en *F. verticillioides* SQSFV_16 **(Figura 35)**.

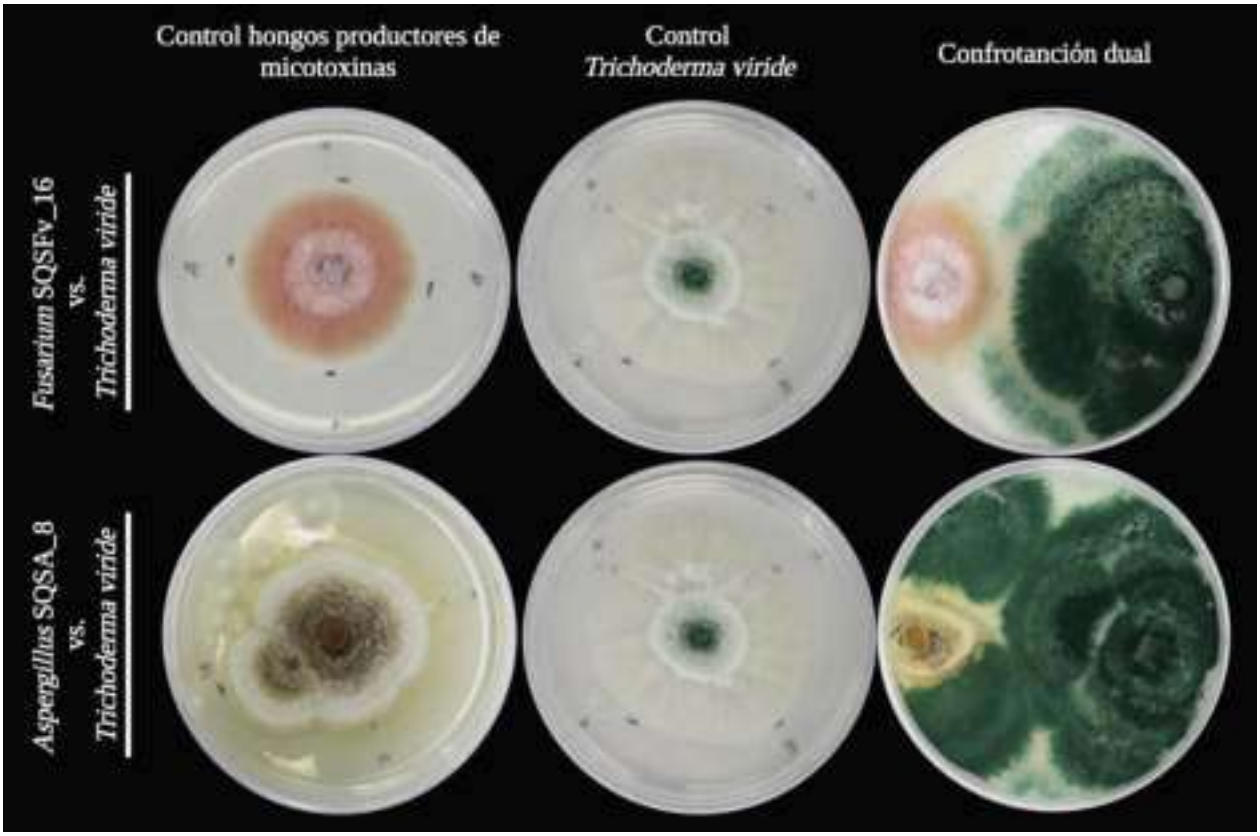


Figura 34. Micoparasitismo a las 96 h. Confrontación dual con *Trichoderma viride* Q07 versus *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 (arriba) y *Aspergillus* sp. SQSA_8 (abajo) (Fotografías: de la autora).

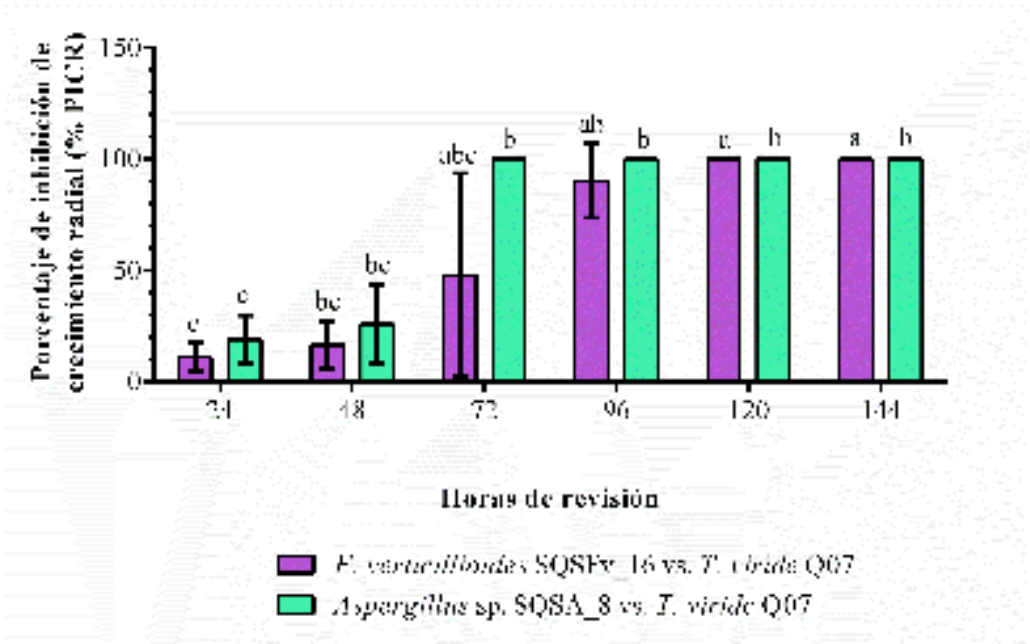


Figura 35. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (% PICR). Confrontación dual entre *Trichoderma viride* Q07 versus *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8.

Algunos de los mecanismos de acción reportados para *Trichoderma* spp. son el micoparasitismo, antibiosis y competencia por nutrientes y espacio. En pruebas realizadas por Yassin *et al*. (2021), demostraron la actividad antimicótica de *T. viride* con una inhibición en el crecimiento de *F. verticillioides* del 56.70 % y en *F. proliferatum* del 32.30 %. Resultados similares se presentaron en el trabajo realizado por Tom & Patel (2021) donde el efecto en el crecimiento de *F. verticillioides* ocasionado por *T. viride* fue entre el 51.48 y 64.07 %. Kumar *et al*. (2021) en confrontaciones duales entre *F. verticillioides* y *T. viride* obtuvieron una tasa de inhibición del 84.61 % con respecto al crecimiento del fitopatógeno. Para *Aspergillus* spp. Gwa *et al*. (2019) evaluaron el antagonismo de *T. harzianum* sobre *A. niger* con una inhibición del 45.96 %. Con lo anterior, se puede concluir que la cepa *T. viride* Q07 es efectiva para limitar el desarrollo de *F. verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8 con porcentajes del 100 % a partir de las 120 y 72 h de incubación, respectivamente.

Por otra parte, en la **Figura 36** se presenta la fluorescencia emitida por el aislado *Aspergillus* sp. SQSA_8 al confrontarse con los microbiales en cada técnica evaluada que, como se mencionó con anterioridad en los apartados de fluorescencia, las aflatoxinas de tipo B y G emiten fluorescencia azul y verde, respectivamente. Nótese en esta imagen la intensidad en la confrontación dual con *T.*

viride Q07 la línea verde característico de AFG, caso contrario con las pruebas de consorcio y espiral, en estas se aprecia la fluorescencia emitida por AFB, la intensidad de estas bajo la UV a 365 nm se atribuye al estrés al que se sometió el aislado SQSA_8 que, como bien se ha mencionado las micotoxinas se producen bajo condiciones de estrés como es este caso, el cual están compitiendo por espacio, nutrientes y sobrevivencia.

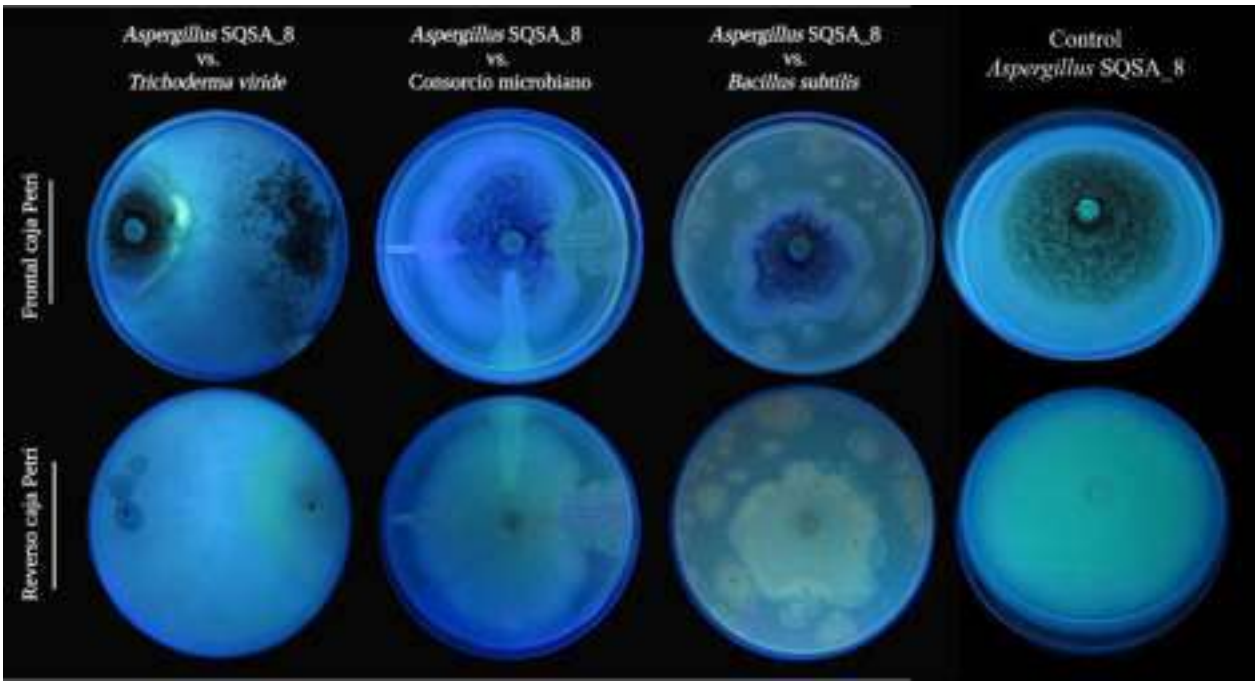


Figura 36. Prueba de antibiosis a las 168 h, observación de fluorescencia *Aspergillus* sp. SQSA_8 (Fotografías: de la autora).

8.4.2. Capacidad del biofertilizante Tribiosoil® para reducir la producción de micotoxinas

Tribiosoil® se compone por los microrganismos benéficos *B. subtilis* Q11 y *T. viride* Q07 mismos que presentaron mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de los hongos micotoxigénicos evaluados en este trabajo (*F. verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8), por lo que se seleccionó este biofertilizante para evaluar su capacidad en reducir la producción de micotoxinas de los aislados mencionados.

Del envío de muestras a cuantificar al laboratorio AGQ Labs. se obtuvo que, la aplicación de *T. viride* Q07 y *B. subtilis* Q11, microrganismos benéficos que componen el biofertilizante

Tribiosoil®, redujeron en un 96.8 % de las aflatoxinas totales producidas por *Aspergillus* SQSA_8 y del 100 % las fumonisinas producidas por *F. verticillioides* SQSFv_16 **(Figura 37)**, asilados obtenidos en un lote comercial de maíz en el ejido Francisco R. Serrano del municipio de Guasave.

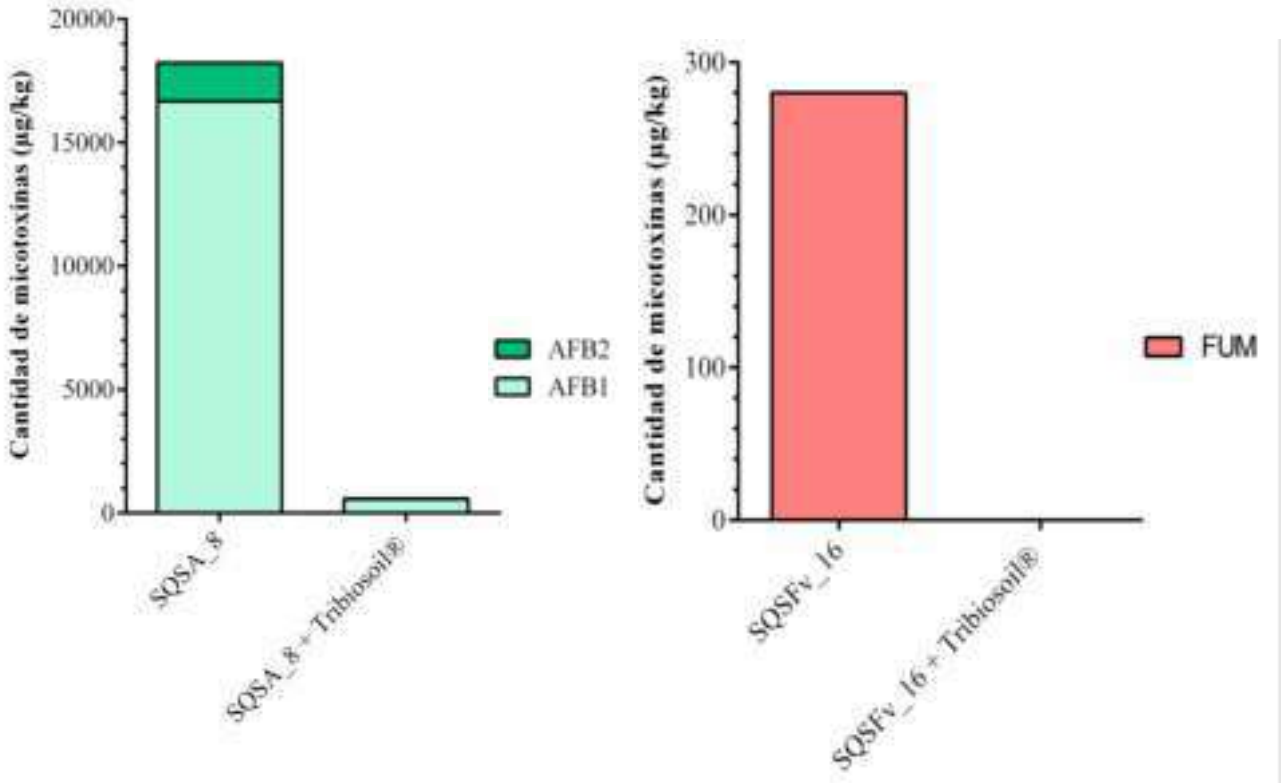


Figura 37. Efecto del biofertilizante Tribiosoil® en la reducción de aflatoxinas producidas por *Aspergillus* sp. SQSA_8 y fumonisinas producidas por *Fusarium verticillioides* SQSFv_16.

Lagogianni & Tsitsigiannis (2019)**,** demostraron por primera vez el uso de productos comerciales no químicos en la reducción de aflatoxinas, con los bioproductos evaluados Botector® y Mycostop® compuestos por *Aureobasidium pullulans* y *Streptomyces griseoviridis*, respectivamente, con una eficacia del 43.1% en la reducción de AFB1 producidas por *A. flavus* en semillas de maíz. Stracquadanio *et al*. (2021) evaluaron a *Trichoderma* spp. en la reducción de aflatoxinas producidas por *A. flavus* con reducciones del 41 % para AFB1 y del 52 % AFB2 a los 10 días de incubación.

Las cepas CE1 y 86 de *Bacillus* spp. fueron evaluadas por Cavaglieri *et al*. (2005), en la reducción de fumonisinas B1 producidas por *F. verticillioides,* obteniéndose un porcentaje de reducción del 50 % para *Bacillus* sp. CE1 y de un 29 % para la cepa 86 de *Bacillus* sp., también se ha demostrado

en granos de maíz el efecto de la micosubtilina producida por *B. subtilis* en la reducción de fumonisinas de tipo B1, B2 y B3 producidas por *F. graminearum* y *F. verticillioides* con una tasa de reducción en la producción de FUM que oscilaron entre 48.92 y 59.44 % (Yu *et al*., 2021)**.**

Este trabajo demostró la efectividad del biofertilizante Tribiosoil® sobre la producción de aflatoxinas y fumonisinas de los aislados evaluados a los seis días de incubación para *Aspergillus* sp. SQSA_8 y a los 13 días para *F. verticillioides* SQSFv_16. En la **Figura 38** se presenta la colonización de *T. viride* Q07 sobre las semillas inoculadas con los aislados evaluados en este estudio, también se observó el crecimiento de *B. subtillis* en medio STCA mientras que en las semillas que no se recubrieron con el biofertilizante el crecimiento de los hongos micotoxigénicos se presentó de manera normal. Por lo anterior, se puede concluir que el uso de Tribiosoil® reduce la producción de AFB1, AFB2 y FUM por lo que es una alternativa sustentable para el manejo de fitopatógenos con impacto en la reducción de micotoxinas.

Figura 38. Semillas de maíz inoculadas con los Hongos Productores de Micotoxinas (HPM) *Fusarium verticillioides* SQSFv_16 y *Aspergillus* sp. SQSA_8 recubiertas con Tribiosoil® (derecha) y semillas sin recubrimiento (izquierda).

8.5. Estimación de costos

La aplicación comercial de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® durante un ciclo agrícola de maíz presentan un costo de $552.00 MXN/ha para Biosoup® y de $2,260 MXN/ha para Tribiosoil® **(Figura 39)**, estos costos incluyen mano de obra y el valor comercial de los bioproductos para sus aplicaciones durante el ciclo agrícola, no se consideraron jornales adicionales o maquinaria agrícola puesto que son aplicaciones que pueden realizarse con el riego para el caso del Tribiosoil® y en la época de siembra para Biosoup®.

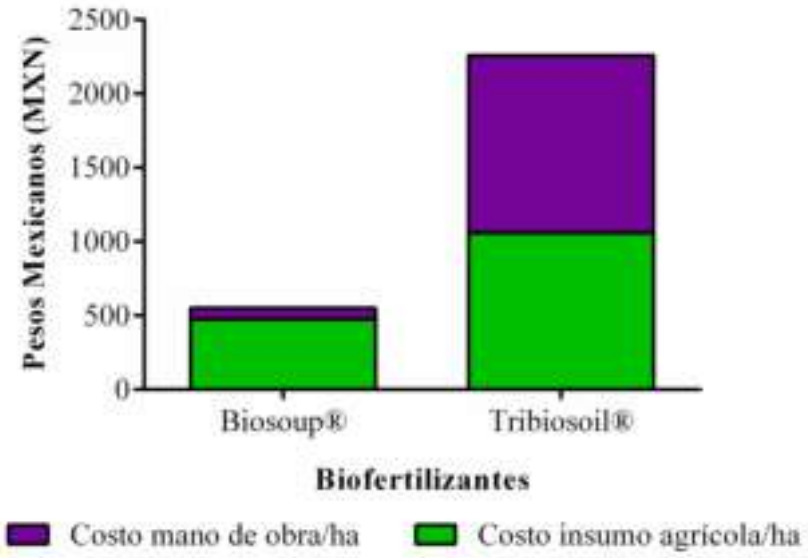


Figura 39. Costos de aplicación de los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® en el ciclo agrícola de un cultivo comercial de maíz (*Zea mays*).

Figura 40. Lote comercial de maíz (*Zea mays*) con tratamientos. (Fotografía: Dra. Rocío Velázquez).

Para determinar la relación costos/beneficio de las aplicaciones de los biofertilizantes se tomaron medidas vegetativas para evaluar el efecto de estos en el desarrollo y vigor de la planta que, como se aprecia en la **Figura 41**, para todas las variables evaluadas el manejo SinQuímica (aplicación de biofertilizantes) presentó mejor respuesta. De la misma manera, el suelo con manejo SinQuímica se encontró menos compacto, incrementando en un 23.6 % el contenido de materia orgánica en el lote y 0.6 unidades menos de pH, mejorando las propiedades físicas edáficas **(Figura 42).**

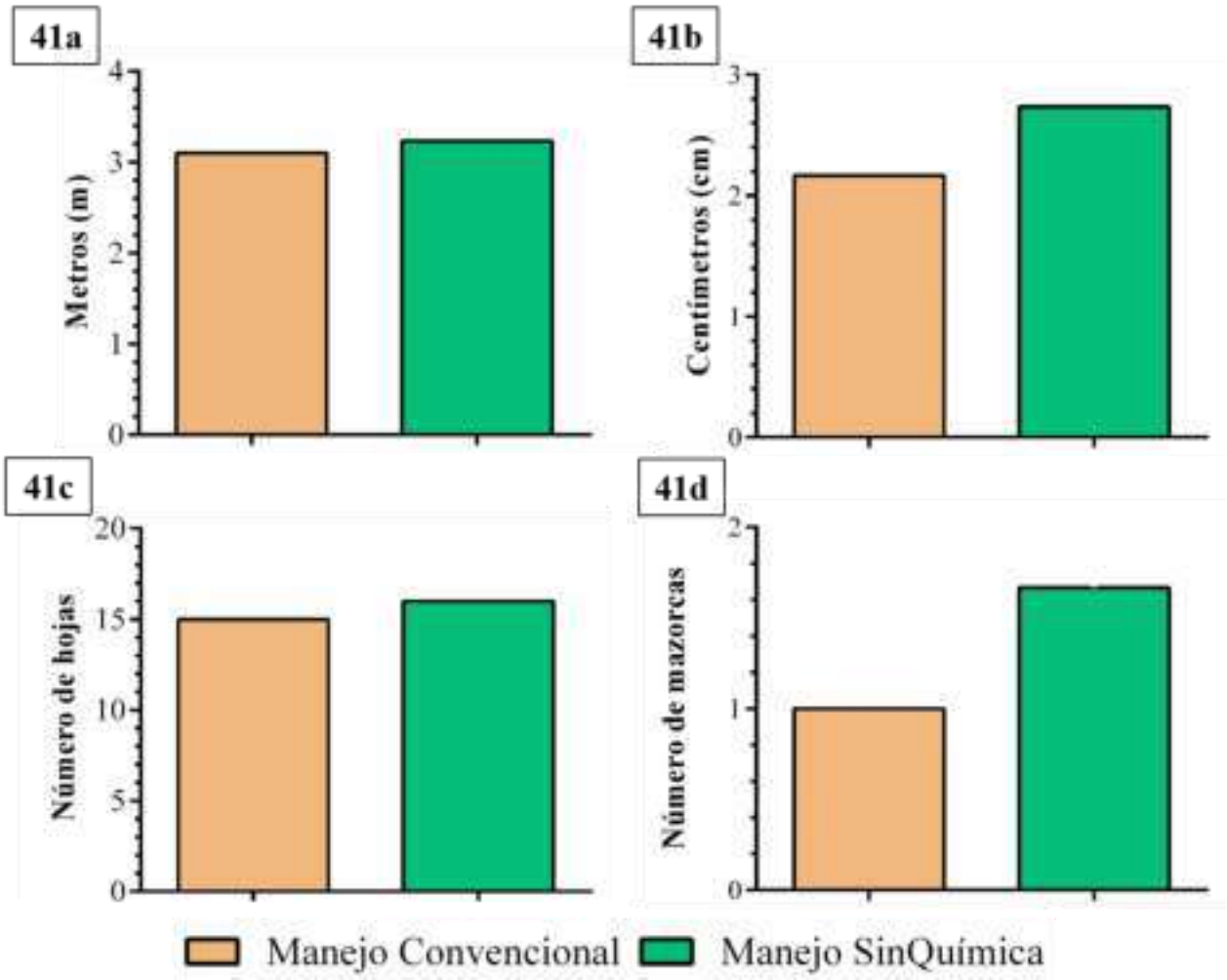


Figura 41. Medidas vegetativas en estado fenológico R3: grano lechoso. **(41a)** Altura de las plantas; **(41b)** Diámetro del tallo; **(41c)** Hojas totales; **(41d)** Mazorcas totales.

Figura 42. Apariencia interna del lote comercial evaluado. (**Izquierda:** manejo SinQuímica; **Derecha**: manejo convencional) (Fotografías: Dra. Rocío Velázquez).

En lo que respecta al peso fresco de la mazorca (estado R5: grano dentado), el lote con manejo SinQuímica obtuvo un 28.7 % de peso adicional comparado con el lote del manejo convencional, así mismo como mejor llenado de la mazorca y 18.6 cm de longitud que, a diferencia de las mazorcas producidas en el lote con manejo convencional se obtuvieron mazorcas de menor tamaño (16.0 cm) **(Figura43).** Este seguimiento finalizó con la cosecha del grano de maíz, para el lote con manejo convencional se cosecharon 12,400 kg/ha mientras que, para el lote con aplicaciones de los biofertilizantes producidos por SinQuímica se cosecharon 12,600 kg/ha. Por otra parte, de los muestreos realizados para cuantificar las UFC/g de suelo se obtuvo que las poblaciones de *Fusarium* spp. disminuyeron para el tercer muestreo teniendo en cuenta que las aplicaciones de los bioproductos se realizaron con anterioridad y para esta misma fecha las poblaciones de *Trichoderma* spp. incrementaron, demostrando la capacidad biológica de establecerse en el lote **(Figura 44).**

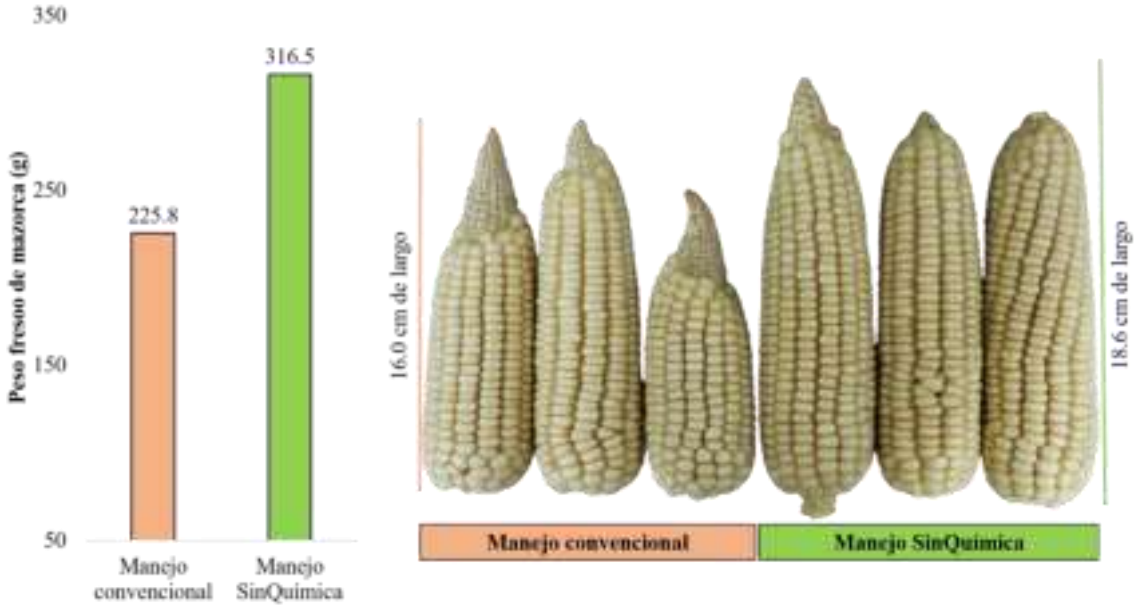


Figura 43. Peso fresco de mazorca de maíz (*Zea mays*). (Fotografías: de la autora).

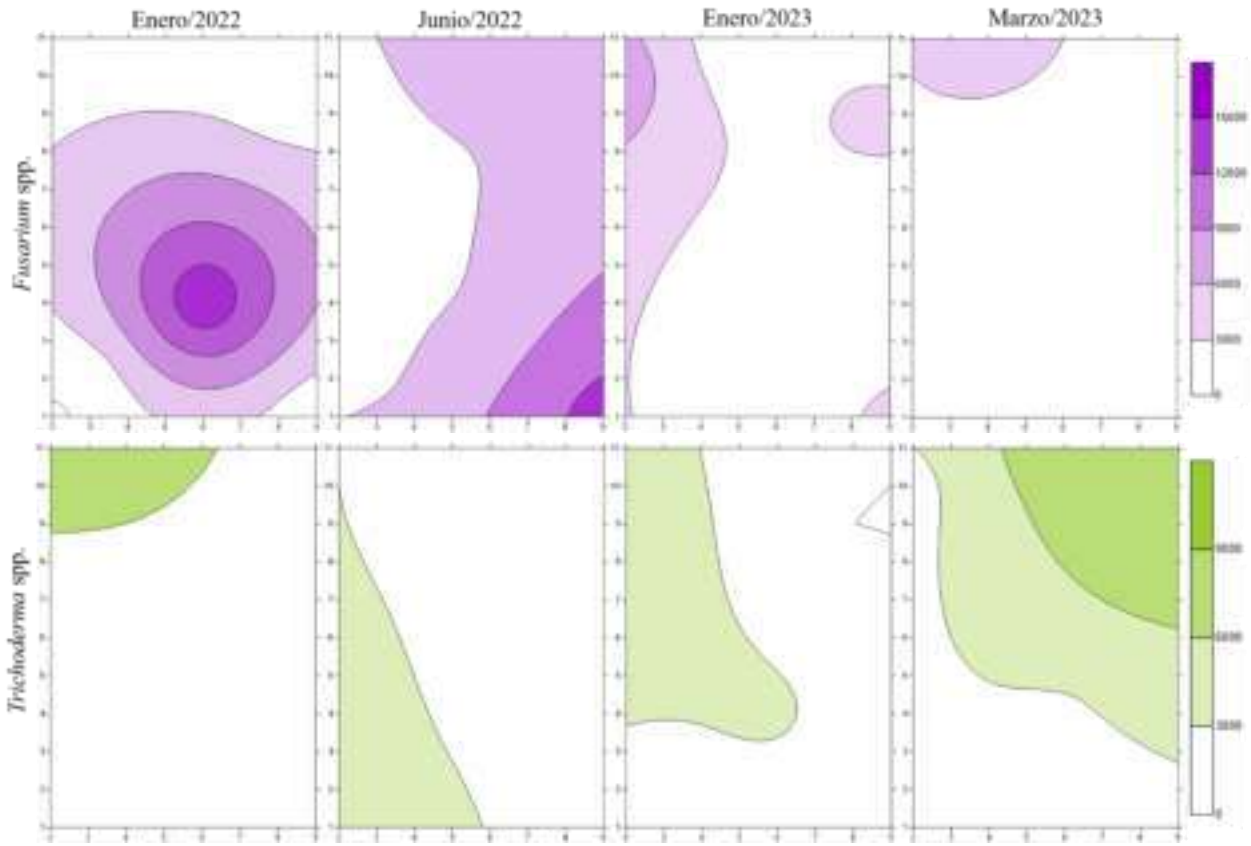


Figura 44. Presencia de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. en el lote comercial evaluado.

IX. CONCLUSIONES

Se acepta la hipótesis planteada al inicio de este trabajo "Las aplicaciones de Biosoup® y Tribiosoil®, productos desarrollados por SINQUÍMICA S.A. de C.V., pueden mejorar la fitosanidad del suelo disminuyendo la presencia de hongos fitopatógenos productores de micotoxinas asociados al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)", obteniéndose tres importantes anotaciones:

1) Los biofertilizantes Biosoup® y Tribiosoil® desarrollados por la empresa local SinQuímica son una alternativa para la inhibición de crecimiento de hongos micotoxigénicos y reducir la producción de aflatoxinas y fumonisinas.
2) La aplicación de Biosoup® y Tribiosoil® durante el ciclo agrícola en el cultivo de maíz incrementa la productividad, mejora la calidad del suelo y los microorganismos benéficos que componen estos biofertilizantes se establecen de manera natural dentro del lote.
3) Este trabajo permite abrir nuevas propuestas de investigación en diferentes temas como: inocuidad alimentaria orientados a políticas de salud pública, caracterización de los aislados obtenidos, determinar las condiciones ambientales que estimulan la producción de micotoxinas para los aislados micotoxigénicos obtenidos en este trabajo, divulgar con entidades locales esta problemática.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abbas HK, Shier WT, Horn BW and Weaver MA. 2004. Cultural methods for aflatoxin detection. Journal of Toxicology - Toxin Reviews, 23(2–3), 295–315. https://doi.org/10.1081/TXR-200027854

Ahmad F, Ahmad I and Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research, 163(2), 173–181. https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001

Alsaady MMH, Salim HA, Al-ani RA, Aboud HM, Talib J and Roubaie MAl. 2020. Effectiveness of bacterial strains (*Bacillus , Pseudomonas , Azotobacter , Azospirillum* and *Streptomyces*) against *Fusarium graminearum* causal agent of crown rot disease on wheat. Basic Research Journal of Agricultural Science and Review, 8(June), 1–10.

Baard V, Bakare OO, Daniel AI, Nkomo M, Gokul A, Keyster M and Klein A. 2023. Biocontrol Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against Four *Fusarium* Species. Pathogens, 12(2), 1–13. https://doi.org/10.3390/pathogens12020254

Alexandros Stamatakis, RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models, Bioinformatics 22, 2688–2690 2006.

Berlanga. 2007. Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos, Centro Nacional de Referencia de control biológico.

Bustidas O. 2008. Conteo celular con hematocimetro. Celeromics. Humana, L.d. conteo celular y evaluación de viabilidad. Standard Operating Procedures: 1-5.

Castro del ÁE ,Sánchez AA, Galindo CME y Vázquez BME. 2020. Control biológico de la pudrición de mazorca en genotipos de maíz con especies de *Trichoderma*. Revista Bio Ciencias, 7, 1–14. https://doi.org/10.15741/revbio.07.e965

Cavaglieri L, Orlando J, Rodríguez MI, Chulze S and Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. Research in Microbiology, 156(5–6), 748–754. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001

Chalam VC, Deepika DD, Abhishek GJ and Maurya K. 2020. Major seed-borne diseases of agricultural crops: International trade of agricultural products and role of quarantine. In Kumar R y Gupta A. (Eds.), Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management (pp. 1–871). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-

32-9046-4

Chourasia HK. 2016. Control of aflatoxin biosynthesis in peanut with geocarposphere bacteria: a biotechnological approach for sustainable development. Journal of Crop and Weed, 12(3), 1–4.

Cornejo RA, Serrato DA, Rendón AB y Rocha RMG. 2015. Herramientas moleculares aplicadas en la ecología: aspectos teóricos y prácticos (Issue January 2014).

Crous PW, Lombard L, Sandoval DM, Seifert KA, Schroers HJ, Chaverri P, Gené J, Guarro J, Hirooka Y, Bensch K, Kema GHJ, Lamprecht SC, Cai L, Rossman AY, Stadler M, Summerbell RC, Taylor JW, Ploch S, Visagie CM, y Thines M. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. Studies in Mycology, 98p. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116

Crous PW, Lombard L, Sandoval-Denis M, Seifert KA, Schroers HJ, Chaverri P, Gené J, Guarro J, Hirooka Y, Bensch K, Kema GHJ, Lamprecht SC, Cai L, Rossman AY, Stadler M, Summerbell RC, Taylor JW, Ploch S, Visagie CM, … Thines M. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, *98*. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116

Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ and Samson RA. 2009. Fungal biodiversity (P. W. Crous, G. J. M. Verkley, J. Z. Groenewald, & R. A. Samson (eds.)). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Da Silva JVB, De Oliveira CAF and Ramalho LNZ. 2022. An overview of mycotoxins, their pathogenic effects, foods where they are found and their diagnostic biomarkers. Food Science and Technology, 42, 1–9. https://doi.org/10.1590/fst.48520

Daou R, Joubrane K, Maroun RG, Khabbaz LR, Ismail A and El Khoury A. 2021. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. AIMS Agriculture and Food, *6*(1), 416–447. https://doi.org/10.3934/AGRFOOD.2021025

Degola F, Dall'Asta C and Restivo FM. 2012. Development of a simple and high-throughput method for detecting aflatoxins production in culture media. Letters in Applied Microbiology, 55(1), 82–89. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03264.x

Deras FH. 2012. Guía técnica. El cultivo de maíz. In Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - IICA (Vol. 1). http://repiica.iica.int/docs/b3469e/b3469e.pdf

Doyle J. 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W. (eds)

Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series, vol 57. Springer, Berlin,

Fani SR, Moradi M, Probst C, Zamanizadeh HR, Mirabolfathy M, Haidukowski M y Logrieco AF. 2014. 140:631-642.

Frisvad JC. 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 JC and Samson RA. 2004. Polyphasic taxonomy of Penicillium subgenus Penicillium: A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology, 2004(49), 1–173.

Frisvad JC, Thrane U and Samson RA. 2007. Mycotoxin producers. In J. Dijksterhuis & R. A. Samson (Eds.), Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food (pp. 135–159). cr.

Frisvad JC, Thrane U, Samson RA and Pitt JI. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In A. D. Hocking, J. I. Pitt, R. A. Samson, & U. Thrane (Eds.), Advances in Experimental Medicine and Biology: Advances in Food Mycology (Issue 571, pp. 3–32). Springer Science+Business Media, Inc. https://doi.org/10.1007/0-387-28391-9

Gacem MA, Gacem H, Telli A and Ould El Hadj KA. 2019. Mycotoxin-induced toxicities and diseases. In Nanomycotoxicology: Treating Mycotoxins in the Nano Way. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817998-7.00006-9

Gasperini AM, Rodriguez SA, Verheecke VC, Garcia CE, Medina A and Magan N. 2019. Resilience of Biocontrol for Aflatoxin Minimization Strategies: Climate Change Abiotic Factors May Affect Control in Non-GM and GM-Maize Cultivars. Frontiers in Microbiology, 10(November), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02525

Glass NL and Donaldson GC. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61(4), 1323–1330. https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995

Gonzalez CEJ, Liévano KS y Cubillos DD. 2020. Evaluación de la efectividad de antagonismo de *Trichoderma* sp. sobre diferentes hongos Fitopatógenos presentes en el cultivo de maíz (*Zea mays*). Ciencias Agropecuarias, *6*(1), 19–34. https://doi.org/10.36436/24223484.279

Guerra FL, Lopes W, Cazarolli JC, Lobato M, Masuero AB, Dal Molin DCC, Bento FM, Schrank A and Vainstein MH. 2019. Biodeterioration of mortar coating in historical buildings:

Microclimatic characterization, material, and fungal community. *Building* and Environment, 155, 195–209. https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.03.017

Gupta A and Gopal M. 2002. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates pathogenic to coconut insect pests. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(4), 325–331. https://doi.org/10.1023/A:1015231209695

Gutiérrez YAP, Bustamante SL y Buitrago G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). Revista Colombiana de Biotecnología, 11(2), 8–18. http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=54370578&lang=es&site=ehost-live

Gwa,VI, Nwankiti AO and Ekefan EJ. 2019. In vitro Study of Antagonistic Capability of *Trichoderma harzianum* against *Aspergillus niger* Isolated from Rotten White Yam (*Dioscorea rotundata*) Tubers. Journal of Advances in Biology & Biotechnology, 21(March), 1–10. https://doi.org/10.9734/jabb/2019/v21i130080

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98 Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18

Hanumanthu N, Gurikar C, Deepa N, Naik MK, Ajithkumar K, Amaresh YS, Achar PN and Sreenivasa, M. Y. 2022. Antifungal Potential of *Azotobacter salinestris* Strain Azt 31 against Phytopathogenic *Fusarium* spp. Associated with Cereals. Journal of Fungi, 8(5). https://doi.org/10.3390/jof8050473

Hindersah R, Kamaluddin NN, Samanta S, Banerjee S and Sarkar S. 2021. Role and perspective of *Azotobacter* in crops production. Sains Tanah, 17(2), 170–179. https://doi.org/10.20961/STJSSA.V17I2.45130

Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC and Samson RA. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia, 97(6), 1316–1329. https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1316

Hruska Z, Yao H, Kincaid R, Brown R, Cleveland T and Bhatnagar D. 2014. Fluorescence Excitation-Emission Features of Aflatoxin and Related Secondary Metabolites and Their Application for Rapid Detection of Mycotoxins. Food and Bioprocess Technology, *7*(4), 1195–1201. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1265-2

Hubka V, Nováková A, Samson RA, Houbraken J, Frisvad JC, Sklenář F, Varga J and Kolařík M. 2016. *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremei*). Plant Systematics and Evolution, *302*(6), 641–650. https://doi.org/10.1007/s00606-016-1293-7

Humber RA. 1997. Identification: Fungi p. 153-186. In Lacery L. (ed). Manual of techniques in insect pathology. Chapter VI

Iqbal S, Ashfaq M y Malik AH. 2017. Isolation , preservation and revival of *Trichoderma viride* in culture media. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5(3), 1640–1646.

Krska R, Richard JL, Schuhmacher R, Slate AB and Whitaker TB. 2012. Guide to Mycotoxins. In E. M. Binder & R. Krska (Eds.), Natural Toxin*s* (4th ed.). Romer Labs Division Holding GmbH. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-036139-0.50007-5

Kumar M, Chand R and Shah K. 2018. Mycotoxins and Pesticides: Toxicity and Applications in Food and Feed. In J. K. Patra, G. Das, & H.-S. Shin (Eds.), Microbial Biotechnology (Volume 2 A, pp. 207–252). Springer Nature Singapore. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-7140-9_11 207

Kumar R, Kumaar S and Chaudhary B. 2021. Effects of *Trichoderma* species on the growth of *Fusarium verticillioides.* Bangladesh Journal of Botany, 50(2), 423–425. https://doi.org/10.3329/BJB.V50I2.54101

Kuntawee S and Akarapisan A. 2015. Isolation and identification of *Aspergillus* species producing Ochratoxin A in *Arabica coffee* beans. International Journal of Agricultural Technology, 11(5), 1235–1242.

Lagogianni CS and Tsitsigiannis DI. 2019. Effective Biopesticides and Biostimulants to Reduce Aflatoxins in Maize Fields. Frontiers in Microbiology, 10(November), 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02645

Leite M, Freitas A, Silva AS, Barbosa J and Ramos F. 2021. Maize food chain and mycotoxins: A review on occurrence studies. Trends in Food Science and Technology, 115, 307–331. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.045

Leslie JF, Moretti A, Mesterházy Á, Ameye M, Audenaert K, Singh PK, Richard FF, Chulze, SN, Del Ponte EM, Chala A, Battilani P and Logrieco AF. 2021. Key global actions for mycotoxin management in wheat and other small grains. Toxins, 13(10), 1–48. https://doi.org/10.3390/toxins13100725

Leslie JF y Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual (Vol. 148). Blackwell.

Leyva MKY, Larralde Corona CP, Apodaca SMA, Quiroz FigueroaFR, Mexia BPA, Portillo VS, Ordaz OJ and Maldonado MIE. 2015. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. Journal of Phytopathology, *163*(6), 486–497. https://doi.org/10.1111/jph.12346

Lin M and Dianese J. 1976. A Coconut-Agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. In Phytopathology (Vol. 66, Issue 12, p. 1466). https://doi.org/10.1094/phyto-66-1466

Liu YJ, Whelen S and Hall BD. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerse II subunit. Molecular Biology and Evolution, *16*(12), 1799–1808. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092

López RLF and Becerra PLA. 2018. Efficiency of corn producers in Sinaloa: a methodological proposal. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, *9*(3), 651–664. http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/1222/1356%0Ahttps://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183392733

Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T and Calcott B. 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. Molecular biology and evolution. DOI: dx.doi.org/10.1093/molbev/msw260

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH and Stahl DA. 2015. Biología de los microorganismos (M. Martín-Romo (ed.); 14th ed., Vol. 148). PEARSON EDUCACIÓN S.A.

Magan N and Olsen M. 2004. Mycotoxins in Food: Detection and Control. In Mycotoxins in Food: Detection and Control. https://doi.org/10.1533/9781855739086

Martinez EL and Fernandez FJB. 2019. Economics of production, marketing and utilization. In S. O. Serna-Saldivar (Ed.), Corn chemistry and technology (Third, pp. 87–106). Woodhead Publishing, Elsevier.

Meriefeld Laboratory Galssware. 2010. Manual de instrucción para cámaras cuentaglóbulos (español). Cámara de recuento.

Mezzalama M, NOemi V y Juarez G. 2015. Enfermedades de importancia económica en cereales causadas por *Fusarium* spp. y trasmitidas por semilla 35p.

Mohammadi A, Shams GM, Nazarian FF, Kachuei R, Gholami SM and Razzaghi AM. 2016. *Giberella fujikuroi* species complex isolated from maize and wheat in Iran: Distribution, molecular identification and fumonisin B1 in vitro biosynthesis. Journal of the Science of Food and Agriculture, *96*(4), 1333–1340. https://doi.org/10.1002/jsfa.7227

Munkvold GP, Arias S, Taschl I and Gruber DC. 2019. Corn: Chemistry and Technology. In S. O. Serna-Saldivar (Ed.), Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management (Third Edit). Elsevier Inc. in cooperation with AACC International. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00004-8

Mosquera M, Ruí E, Fontanilla C, Beltrán JA, y Arias N. 2014. Manual para el registro de costos en plantaciones de palma de aceite de pequeños y medianos productores. Bogotá: Cenipalma-Fedepalma-SENA

Norma Mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2020. Productos Alimenticios para Uso Humano No Industrializados. Cereales. Maíz—Parte 1. Granos para Tortillas y Productos Nixtamalizados. Especificaciones y Métodos de Prueba. Secretaría de Economía (SE). https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNMX.xhtml?pidn=L2hiV0psQ0FqTUdtQkc2OS81dTJvUT09

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, 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.

O'Donnell K, Kistlerr HC, Cigelnik E and Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *95*(5), 2044–2049. https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044

Ostry V, Malir F, Toman J y 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

Ouattara SP Nikiema P and Traore A. 2011. Caractérisation de souches d'*Aspergillus* spp. isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest. International Journal of Biological and Chemical *Sciences*, *5*(3), 1232–1249. https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i3.72269

Padilla AM, Velázquez VM. y Camargo MD. 2008. Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, 37-42.

Pascual CB, Barcos AKS, Mandap JAL and Ocampo ETM. 2016. Fumonisin-Producing *Fusarium* species causing ear rot of corn in the Philippines. Philippine Journal of Crop Science (PJCS), 41(1), 12–21.

Patibanda AK and Ranganathswamy M. 2017. Microorganisms for Green Revolution: Vol. 2: Microbe.

Paul JS, Tiwari KL and Jadhav SK. 2015. Long term preservation of commercial important fungi in glycerol at 4°C. International Journal of Biological Chemistry, *9*(2), 79–85. https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.79.85

Pellan L, Durand N, Martinez V, Fontana A, Schorr GS and Strub C. 2020. Commercial biocontrol agents reveal contrasting comportments against two mycotoxigenic fungi in cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. Toxins, 12(3). https://doi.org/10.3390/toxins12030152

Pitt JI, Wild CP, Baan RA, Gelderblom WCA, Miller JD, Riley RT and WU F. 2012. Improving public health through mycotoxin control (J. I. Pitt, C. P. Wild, R. A. Baan, W. C. A. Gelderblom, J. D. Miller, R. T. Riley, & F. WU (eds.); Issue 158). International Agency for Research on Cancer.

Pour MM, Saberi-Riseh R, Mohammadinejad R and Hosseini A. 2019. Investigating the formulation of alginate- gelatin encapsulated *Pseudomonas fluorescens* (VUPF5 and T17-4 strains) for controlling *Fusarium solani* on potato. International Journal of Biological Macromolecules, 133, 603–613. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.071

Poveda J and Eugui D. 2022. Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. Biological Control, 176(September), 105100.

https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105100

Rambaut A and Drummond A. 2008. FigureTree: Tree figures drawing tool, version 1.2.2. University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Planeación agrícola nacional 2017-2030: Maíz grano blanco y amarillo mexicano. 28p.

Saito M and Machida S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience, *40*(2), 205–208. https://doi.org/10.1007/BF02464300

Salazar GC, Velásquez OD and Gómez LE. 2020. Detection of mycotoxins produced by *Fusarium* species in Colombia. Agronomia Colombiana, *38*(2), 208–215. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v38n2.77176

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, and Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, 78(1), 141–173. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004

Samsudin NIP, Rodriguez A, Medina A and Magan N. 2017. Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, FUM1 gene expression and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* on maize cobs of different ripening stages. International Journal of Food Microbiology, 246, 72–79. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.004

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. 2020. Panorama agroalimentario 2020. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

Shekhar M, Singh N, Dutta R, Kumar S and Mahajan V. 2017. Comparative study of qualitative and quantitative methods to determine toxicity level of *Aspergillus flavus* isolates in maize. PLoS ONE, 12(12), 1–10. https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189760

Shi L, Liang Z, Li J, Hao J, Xu Y, Huang K, Tian J, He X and Xu W. 2013. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(9), 1879–1885. https://doi.org/10.1002/jsfa.6507

Shukla S, Park JH, Chung SH and Kim M. 2018. Ochratoxin A reduction ability of biocontrol agent *Bacillus subtilis* isolated from Korean traditional fermented food Kimchi. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26162-5

Siahmoshteh F, Siciliano I, Banani H, Hamidi Esfahani Z, Razzaghi AM, Gullino ML and Spadaro,

D. 2017. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. International Journal of Food Microbiology, *254*, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.011

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Panorama agroalimentario 2020. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

Singh VK, Dwivedy AK, Singh A, Asawa S, Dwivedi A and Dubey NK. 2018. Fungal endophytes from seaweeds: An Overview. In J. K. Patra, G. Das, & H.-S. Shin (Eds.), Microbial Biotechnology: Vol. Volume 2. (pp. 483–498). Springer Nature.

Sivparsad BJ and Laing MD. 2016. Pre-harvest silk treatment with *Trichoderma harzianum* reduces aflatoxin contamination in sweetcorn. Journal of Plant Diseases and Protection, 123, 285–293. https://doi.org/10.1007/s41348-016-0037-9

Stracquadanio C, Luz C, La Spada F, Meca G and Cacciola SO. 2021. Inhibition of mycotoxigenic fungi in different vegetable matrices by extracts of *Trichoderma* species. Journal of Fungi, 7(6). https://doi.org/10.3390/jof7060445

Sun X, Xu Y, Chen L, Jin X and Ni H. 2021. The salt-tolerant phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* NF011 isolated from wheat rhizosphere soil in dry farmland with antagonism against *Fusarium graminearum*. Microbiological Research, 245(November 2020), 126673. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126673

Susca A, Villani A, Moretti A, Stea G and Logrieco A. 2020. Identification of toxigenic fungal species associated with maize ear rot: Calmodulin as single informative gene. International Journal of Food Microbiology, *319*, 108491. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108491

Suzuki T and Iwahashi Y. 2016. Addition of carbon to the culture medium improves the detection efficiency of aflatoxin synthetic fungi. Toxins, 8(11), 1–14. https://doi.org/10.3390/toxins8110338

Taba S. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo (Cuarta). http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=x4wC_JOmYL8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Enfermedades+de+maiz:+una+gu►a+para+su+identificaci►n+en+campo&ots=KkyFD3piN1&sig=WDbJtjNOonVKWVHIrHkJsKYJK_0

Takahashi T. 1993. Distribution and characteristics of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* in the soil in Kanagawa Prefecture, Central Japan. Mycopathologia, 121(2), 169–173.

https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221

Tamura K, Stecher G, and Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027

Tarín A, Rosell MG and Guardino X. 2004. Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins: Aflatoxins and ochratoxin A. Journal of Chromatography A, 1047(2), 235–240. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.094

Tom A and Patel S. 2021. Dynamic association of *Fusarium verticillioides* with maize and its biological control. The Pharma Innovation Journal, 10(7), 1010–1019.

Ullah H, Yasmin H, Mumtaz S, Jabeen Z, Naz R, Nosheen A and Hassan MN. 2020. Multitrait *Pseudomonas* spp. isolated from monocropped wheat (*Triticum aestivum*) suppress *Fusarium* root and crown rot. Phytopathology, 110(3), 582–592. https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-19-0383-R

Vanhoutte I, Audenaert K and Gelder LD. 2016. Biodegradation of mycotoxins: tales from known and unexplored worlds. Frontiers in Microbiology, 7(April), 1–20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00561

Venkatesh N and Keller NP. 2019. Mycotoxins in Conversation With Bacteria and Fungi. Frontiers in Microbiology, 10, 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00403

Verheecke C, Liboz T, Anson P, Zhu Y and Mathieu F. 2015. *Streptomyce–Aspergillus flavus* interactions: impact on aflatoxin B accumulation. Food Additives & Contaminants: Part A, 32(4), 572–576. https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1003336

Weidenbörner M. 2017. Mycotoxins in Plants and Plant Products : Cereals and Cereal Products. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46715-3

White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols (Issue 1). Academic Press, Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1

Widyantoro A, Hadiwiyono and Subagiya. 2020. Short communication: Biological control of *Fusarium* wilt on banana plants using biofertilizers. *Biodiversitas*, *21*(5), 2119–2123. https://doi.org/10.13057/biodiv/d210540

Yassin MT, Mostafa AAF, Al-Askar AA, Sayed SRM and Rady AM. 2021. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* strains against some fusarial pathogens causing stalk rot disease of maize, in vitro. Journal of King Saud University - Science,

33(3), 101363. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101363

Yu C, Liu X, Zhang X, Zhang M, Gu Y, Ali Q, Sherif Ramzy Mohamed M, Xu J, Shi J, Gao X, Wu H and Gu Q. 2021. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. Toxins, 13(11), 1–15. https://doi.org/10.3390/toxins13110791

ANEXOS

Preparación medios de cultivos

Anexo 1. Agar coco natural (CAM)

Se utilizan 100 g de pulpa de coco (*Cocos nucifera*), la pulpa se ralla, se adiciona a un matraz el cual contiene 500 mL de agua destilada o purificada y se agita por 5 minutos a 60 rpm, después se obtiene el extracto líquido de coco tamizando la pulpa a través de una manta para filtrar, este extracto se transfiere a un nuevo matraz, se agregan 2.2 % de agar bacteriológico y se agita nuevamente por 1 minuto a 60 rpm; posteriormente, se ajusta al pH entre 6.9 – 7.0 antes de esterilizar a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos. Este medio de cultivo se debe preparar con el coco fresco y se recomienda usarlo el mismo día (Gupta & Gopal, 2002; Lin & Dianese, 1976; Takahashi, 1993).

Anexo 2. Agar coco natural suplementado con carbón activado (CAM+CA)

Este medio de cultivo se realiza como se describe en el **Anexo 1** solo que antes de esterilizar se adicionan 0,3 mg/mL de carbón activado (Suzuki & Iwahashi, 2016) y se agita por 5 minutos a 60 rpm para luego ingresarlo a la autoclave.

Anexo 3. Papa dextrosa agar (PDA)

Se adicionan en un matraz 39 g/L de agua destilada o purificada, se agita por 1 minutos a 60 rpm y se esteriliza por 15 minutos121 °C y 15 psi.

Anexo 4. Papa dextrosa agar suplementado con carbón activado (PDA+CA)

Se prepara el PDA (**Anexo 3**) y antes de esterilizar se adicionan 0.3 mg/mL de carbón activado (Suzuki & Iwahashi, 2016), luego se agita por 5 minutos a 60 rpm para homogenizar y disolver el carbón activado en el medio PDA, después de este paso se esteriliza.

Anexo 5. Papa dextrosa agar suplementado con β-ciclodextrina (PDA+β-Cd)

Se prepara el PDA (**Anexo 3**) y una vez esterilizado, se espera a que la temperatura de este descienda hasta 45 °C para adicionar 3 mg de β-ciclodextrina por cada mL del medio preparado y se agita por 5 minutos a 60 rpm para homogenizar y disolver la β-ciclodextrina en el medio PDA, después de este paso se puede vaciar el medio de cultivo.

Anexo 6. Papa dextrosa agar suplementado con carbón activado y β-ciclodextrina (PDA+CA+β-Cd)

Inicialmente se realiza lo indicado en el **Anexo 4** y al finalizar este procedimiento se siguen los pasos mencionados en el **Anexo 5.**

Anexo 7. Czapeck agar (CZA)

Reactivo	**g/L**
1. Sacarosa	30 g/L
2. Agar	15 g/L
3. $NaNO_3$ (Nitrato de sodio)	2 g/L
4. KH_2PO_4 (Fosfato de potasio dibásico)	1 g/L
5. $MgSO_4.7H_2O$ (Sulfato de magnesio heptahidratado)	0.5 g/L
6. KCL (Cloruro de potasio)	0.5 g/L
7. $FeSO_4.7H_2O$ (Sulfato ferroso heptahidratado)	0.01 g/L
Solución de elementos traza (SET)	**200 µL**
SET:	**g/100mL**
1. $C_6H_8O_7.H_2O$ (Ácido cítrico monohidratado)	5
2. $ZnSO_4.7H_2O$ (Sulfato de zinc heptahidratado)	5
3. $CuSO_4.5H_2O$ (Sulfato cúprico pentahidratado)	0.25
4. $MnSO_4.H_2O$ (Sulfato de manganeso monohidratado)	0.05
5. H_3BO_3 (Ácido bórico)	0.05
6. $Na_2MoO_4.2H_2O$ (Molibdato de sodio dihidratado)	0.05

Adicionar los reactivos en el orden en el que se presentan, disolver y homogenizar cada vez que se adiciona un reactivo al matraz, después se esteriliza el medio de cultivo a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos. Por otra parte, la solución de elementos traza (SET) se prepara por separado y los 200 µL se adicionan al medio empleando un sistema de filtración con membranas de 0.25 µm, lo anterior se realiza una vez el medio de cultivo salga de la autoclave y que su temperatura haya descendido a 45 °C. El pH del medio debe estar entre 6 y 6.5 (Pellan *et al*., 2020).

Características del filtro de jeringa empleado para la adición el SET de elementos trazas: Filtrationsvorsatz 25 mm, syringae filter holder. Order No. 16517-E. Lote No. 16517. Sartorius Stedim Biotech GmbH 37030 Göttingen, Germany. Importado por Sartorius de México, S.A. de C.V.

Cuestionarios empleados en entrevistas con el agricultor.

Anexo 8. Cuestionario para conocer características principales y manejo del cultivo de maíz.

UAdeO	**Maestría en Fitopatologia y Medio Ambiente**		SinQuimica
VISITA AL PRODUCTOR			
Cultivo (ha):		Ubicación:	
Nombre productor:		Teléfono:	
Coordenadas			
Altitud	m.s.n.m.		
Disponibilidad de datos climatológicos			
¿Cuál es el distrito de riego?			
Cantidad de agua disponible			
Tiempo en la actividad económica: cultivos, rotación de cultivos			
Variedades sembradas (ha)			
¿Análisis de suelo?			
Fertilización			
¿Aplicación de bioproductos?			
Productos químicos			
Principales enfermedades			
Variedad a sembrar en próximo ciclo			
Fecha de siembra			
Distancia de siembra			
# de semillas/metro lineal			
Preparación del suelo			
Rendimiento promedio			

Anexo 9. Cuestionario para estimar costos de aplicación.

UAdeO	**Maestría en Fitopatologia y Medio Ambiente**		SinQuimica
FORMATO COSTOS			
Información general		**Información biofertilizantes**	
Nombre de la labor		Precio de Biosoup (unidad de medida de la presentación comercial)	
Hectáreas totales donde se realiza la aplicación		Precio de Tribiosoil (unidad de medida de la presentación comercial)	
Fecha de aplicación		Dosis de los biofertilizantes requeridad por hectárea	
Estado vegetativo al momento de la aplicación		Número de veces que compró los biofertilizantes en el año	
# de plantas/ha		Número de veces a aplicar durante el ciclo agrícola (fechas o etapas vegetativas del cultivo)	
Híbrido sembrado		**Mano de obra**	
Frecuencia de aplicación		¿pago por día o por actividad realizada?	
# de personas requeridas para realizar la aplicación		¿cuánto se paga?	
Información maquinaria		Si se paga por actividad realizada, pagan por hectárea aplicada o cuál es el criterio para el pago?	
Tipo de maquinaria (características: caballaje, marca, potencia, caudal, cilindraje)		el pago incluye prestaciones, ¿cuánto?	
¿es comprada o alquilada?		Número de operarios requeridos para realizar la aplicación	
¿cuánto lo costó o en cuánto la alquila?		Número de días o tiempo dedicado para realizar la aplicación	
Frecuencia de uso de la mquinaria en el mes de acuerdo al numero de dias dedicados a la aplicación		Número de veces en el ciclo agrícola en que se realiza la aplicación	
Valor de salvamento*		Rendimiento de la mano de obra en la aplicación, en cuánto tiempo aplican el aréa total evaluada?	
Vida útil en años		Cantidad requerida de operarios para relaizar la aplicación	
Costo operativo maquinaria		**Comentarios**	
Precio del combustible			
Cantidad requerida de combustible para el funcionamiento de la maquinaria en el mes			
Tiempo requerido de la maquinaria que emplea para la aplicación			
Frecuencia (uso de la maquinaria) en el mes de acuerdo con el número de días o semanas dedicados a la aplicación			

***Valor de salvamento:** es el valor que se le asigna a un bien al final de su vida útil. **RESPONDER SÓLO SÍ LA MAQUINARIA ES COMPRADA**