



00361  
28  
71

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"MICROBIOTA EN GRANOS DE SORGO":  
INCIDENCIA NATURAL DE  
ALTERNARIOS.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado académico de:

**MAESTRIA EN CIENCIAS**

**( B I O L O G I A )**

**P r e s e n t a:**

**María Cristina Julia Pérez Reyes**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. GENEVEVA GARCIA AGUIRRE**

**MEXICO. D. F.**

**1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Genoveva García Aguirre, por su acertada dirección brindada en la elaboración de esta tesis. Asimismo, quiero manifestarle que su entusiasmo y dedicación influyeron en mi formación académica.

A la M. en C. Rebeca Martínez Flores, por su incondicional apoyo, amistad y valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

Al Instituto de Biología, UNAM por las facilidades que me otorgó para la realización de este trabajo.

Al jurado dictaminador por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de esta tesis:

Dr. Teófilo Herrera Suárez  
Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa  
Dr. Ernesto Moreno Martínez  
Dra. Genoveva García Aguirre  
M. en C. Rebeca Martínez Flores  
Dr. Jorge Ramírez González  
Dra. Patricia Esther Lappe Oliveras

A la Compañía Nacional de Subsistencias Populares y Agricultura en Evolución, por haber proporcionado las muestras de grano de sorgo para la realización de este estudio.

**A mi esposo Ramón, hijas Cris y Mariana,  
por su paciencia, cariño y comprensión.**

**A mis padres, con todo cariño por brindarme  
siempre su apoyo y confianza.**

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
Producción de sorgo	2
Producción nacional de sorgo	3
Utilización del sorgo	4
Hongos de campo y almacén	5
Hongos que dañan al grano de sorgo	6
Enfermedades del sorgo	7
Micotoxinas producidas por hongos que atacan al grano de sorgo y sus implicaciones en la sanidad vegetal, animal y humana	8
<b>OBJETIVOS</b>	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
Grano	16
Contenido de humedad	16
Pruebas de germinación	16
Determinación de la micobiota	17
Determinación de las micotoxinas	17
Análisis químico	17
Método de Eppley (1968) para la extracción de aflatoxinas y zearalenona	18
a) Extracción	18
b) Columna de cromatografía	18
c) Concentración	19
d) Cromatografía de capa fina	19
Placas preliminares para aflatoxinas y zearalenona	19
e) Pruebas confirmatorias	20
Método de Seitz <i>et al.</i> (1976c) para la extracción de alternariol y monometil-éter de alternariol	21

a) Extracción	21
b) Concentración	21
c) Cromatografía de capa fina	21
Placas preliminares para alternariol y monometil-éter de alternariol	21
Placas cuantitativas	22
d) Pruebas confirmatorias	23
Determinación de la concentración de micotoxinas	23
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	24
I Análisis de la micobiota del grano de sorgo	24
II Análisis de las micotoxinas	29
III Análisis de las micotoxinas en relación con la micobiota aislada	33
<b>CONCLUSIONES</b>	36
<b>LITERATURA CITADA</b>	38

## RESUMEN

Veintiún muestras de sorgo procedentes del Bajío fueron analizadas para conocer la micobiota del grano y determinar la presencia de micotoxinas en forma natural. El moho predominante fue *Alternaria alternata*, con 871 aislamientos; asimismo, fueron abundantes algunos hongos de los géneros *Phoma*, *Epicoccum*, *Helminthosporium* y *Fusarium*, también fueron aislados otros géneros en menor proporción. Algunas especies de los géneros aislados pueden inducir, en sorgo, enfermedades del follaje e invadir el grano tanto en el campo como durante su almacenamiento, reduciendo su rendimiento, calidad y valor económico. Además, son capaces de producir micotoxinas, potencialmente peligrosas para la salud de los animales domésticos.

Las micotoxinas mejor conocidas en el grano de sorgo son las aflatoxinas y la zearalenona; éstas fueron determinadas en un trabajo previo con una incidencia y concentración muy bajas. Sin embargo, debido a la confusión existente entre las micotoxinas mencionadas con las sintetizadas por el género *Alternaria* y dada la alta incidencia de este género en sorgo, nos condujeron a buscar las últimas en diversas muestras de grano de sorgo.

Los resultados del análisis por cromatografía de capa fina para la detección de micotoxinas de especies de *Alternaria* indicaron que diez muestras (47.62%) estaban contaminadas con alternariol, con niveles de 1.444 - 55.920 mg/kg, y 12 muestras (57.14%) con monometil-éter de alternariol, en niveles de 0.134 - 2.144 mg/kg. De estas muestras detectadas como positivas diez resultaron contaminadas con ambas toxinas.

## INTRODUCCIÓN

### **Producción de sorgo**

Las plantas constituyen el 93% de la dieta mundial y los cereales contribuyen con las dos terceras partes de los alimentos primarios. El cultivo de los ocho principales cereales (trigo, maíz, arroz, cebada, sorgo, avena, mijo y centeno) ocupan 56% de la tierra arable del mundo y son la fuente principal de calorías y proteínas para la mayor parte de la población (Stubbs, 1986). En 1997, el sorgo (*Sorghum bicolor*) ocupó, entre los cultivos de cereales considerados mundialmente como más importantes, el quinto lugar después del trigo (*Triticum aestivum*, *Triticum turgidum*), arroz (*Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*), maíz (*Zea mays*) y cebada (*Hordeum vulgare*). Aproximadamente el 90% de la superficie sembrada con sorgo se encuentra localizada principalmente en Asia y África (FAO, 1997). De este último continente se piensa que es originario el sorgo, de donde posteriormente fue llevado a Estados Unidos de América, México, Argentina, Australia, etc. países donde actualmente se cultiva (Doggett, 1988).

Nigeria y Sudán son los principales países productores de sorgo en África, sin embargo, el cultivo está muy extendido en todo el continente. En Asia, la producción está concentrada en dos países China e India, los cuales producen el 94% del total de la producción regional. En la región norte de América Latina, América Central y el Caribe la producción está dominada por México con un 90% de la producción regional total. En América del Sur se concentra en Argentina (60%) y en las zonas áridas del Brasil, el norte de Colombia y Venezuela. Casi un tercio de la producción mundial de sorgo corresponde a los países desarrollados. En Estados Unidos se cultiva en las llanuras de las regiones centrales y meridionales principalmente en Kansas, Texas y Nebraska donde la lluvia es escasa y variable. En Europa, sólo se cultiva el sorgo en algunas zonas de Francia, Italia y España. Por lo que respecta a Oceanía, Australia es el único productor de cierta importancia (FAO, 1997).

El sorgo es una planta herbácea de la familia de las gramíneas, de la cual, de acuerdo a sus características, se han seleccionado diferentes variedades que han sido agrupadas en cuatro tipos principales: 1) los sorgos azucarados, variedades con alto contenido de carbohidratos, de tallo largo, jugoso y dulce, por lo que es utilizado en la elaboración de jarabes. 2) los sorgos de escoba, variedades que se caracterizan por presentar raquis muy cortos y ramificaciones largas, por lo que se utilizan para la elaboración de escobas. 3) los sorgos herbáceos, variedades con tallos suaves y semillas pequeñas, que se utilizan como forraje, y 4) los sorgos para grano, que presentan semillas grandes y tallos dulces con un alto valor nutricional, con un elevado porcentaje de proteínas y carbohidratos, lo que les permite competir con otros cereales como el maíz y el trigo. En México y otros países este tipo de sorgo se emplea como materia prima en la elaboración de alimento balanceado para animales; mientras que en África y Asia se cultiva para el consumo humano.

#### **Producción nacional de sorgo**

Dos quintas partes de la población económicamente activa de nuestro país laboran en actividades agropecuarias. La agricultura en México es sumamente diversa, ya que comprende cultivos tanto de regiones tropicales como de zonas templadas y frías, cuya producción depende, en su mayor parte de la intensidad y regularidad de las lluvias. Los seis productos principales dentro de la economía nacional son: el maíz y el frijol, por ser la base de la alimentación popular; el trigo y la caña de azúcar por ser alimentos de consumo generalizado, el café en cambio, por ser el principal producto de exportación y el sorgo por el gran desarrollo de la avicultura y porcicultura de los años recientes.

En México, la producción nacional anual de grano de sorgo en el año de 1995 fue de más de 4 millones de toneladas (SAGAR,1995), siendo los principales estados productores durante el ciclo primavera-verano, en orden de importancia: Guanajuato, Michoacán, Tamaulipas, Jalisco y Sinaloa, y en el ciclo otoño-invierno: Tamaulipas, Nayarit, Michoacán, Veracruz y Nuevo León. A pesar de que México es un país productor de grano de sorgo, es considerado a nivel mundial como uno de los principales países.

importadores de grano de sorgo, junto con Japón e Israel. En 1993 importó 3.7 millones de toneladas (SAGAR, 1987-1993). La producción anual de sorgo forrajero durante el año agrícola de 1995 fue de 1.8 millones de toneladas, siendo los estados productores más importantes: Baja California Norte, Coahuila, Chihuahua, Sinaloa, Jalisco y Sonora; mientras que la producción de sorgo escobero durante el mismo año agrícola, fue de 39,820 toneladas, siendo Coahuila el principal estado productor (23,623 toneladas).

#### **Utilización del sorgo**

La economía mundial del sorgo consta de dos sectores distintos, un sector tradicional, de subsistencia, sustentado en los pequeños agricultores cuya producción se consume en su mayor parte como alimento, principalmente en África y Asia, y un sector de grandes explotaciones modernas, mecanizadas y que utilizan grandes cantidades de insumos, cuya producción se utiliza básicamente como pienso; principalmente en los países desarrollados y en algunos países en desarrollo de América Latina, como México y Argentina. En el período 1992-94, se destinaron a la alimentación humana aproximadamente 27 millones de toneladas anuales de sorgo, de las cuales casi en su totalidad fueron utilizadas en países como África y Asia, que padecen una situación de mayor inseguridad alimentaria. El sorgo se consume en formas diversas, que varían de una región a otra. En general, se consume como grano entero o como harina, con la que se preparan platos tradicionales. Existen cuatro alimentos elaborados a base de sorgo que se consumen principalmente en Asia y África: el pan plano, preparado con masa fermentada o sin fermentar; las gachas consistentes o delgadas, fermentadas o sin fermentar; productos cocidos similares a los que se preparan con sémola de maíz o con arroz y algunos alimentos preparados fritos en aceite. Otro importante uso que se le da al sorgo, especialmente en África, es para la elaboración de bebidas alcohólicas como la cerveza. Fuera de África, el sorgo se utiliza en pequeñas cantidades en la industria cervecera de México y los Estados Unidos. En China, alrededor de la tercera parte de la producción de sorgo se destina a la fabricación de bebidas alcohólicas, principalmente de un fuerte licor tradicional. En Nigeria, se utilizan también pequeñas cantidades de sorgo para producir edulcorantes. Alrededor del 48% de la producción mundial de sorgo se utiliza como

pienso, la demanda de pienso, procede de los países desarrollados y de los países de ingresos medios de América Latina y Asia, en los que existe una gran demanda de carne y, por tanto, un sector ganadero intensivo (FAO, 1997).

### **Hongos de campo y almacén**

Todos los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, su transporte y almacenaje, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, ocasionando pérdidas económicas al reducir el potencial de producción de los cultivos que atacan. Durante su desarrollo los granos y semillas pueden ser invadidos por diversos hongos en el campo que además, pueden ser transmitidos de un ciclo a otro a través de las semillas. Asimismo, durante su transporte y almacenaje los granos y las semillas pueden ser invadidos por hongos cuyo hábitat natural generalmente son las bodegas, silos y trojes (Moreno, 1988). Los principales daños ocasionados por estos hongos son: 1) reducción del poder germinativo; 2) ennegrecimiento total o parcial de los granos y semillas (particularmente de los embriones); 3) calentamiento y hedor; 4) diversos cambios bioquímicos; 5) producción de micotoxinas, las que al ser ingeridas pueden ser dañinas al hombre y a los animales domésticos; y 6) pérdida de peso (Christensen y Kauffmann, 1969).

Los hongos que crecen sobre productos agrícolas en especial los que invaden granos y semillas durante su desarrollo, cosecha o almacenamiento, han sido clasificados por Christensen y Kauffman (1969) en tres tipos.

- 1) Hongos de campo, que invaden los granos y semillas antes de la cosecha y requieren humedades relativas mayores de 90% para su crecimiento. Este grupo incluye especies de diversos géneros como: *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* entre otros, que se caracterizan por ocasionar diferentes enfermedades a las plantas y que son transmitidos de un ciclo a otro a través de las semillas.

- 2) Hongos de almacén, que invaden los granos y semillas después de la cosecha; principalmente incluyen especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, que pueden crecer en humedades relativas de 65-90%, condiciones de humedad muy frecuentes en el almacenamiento de granos. Se ha encontrado que algunas especies pueden invadir el grano desde el campo, especialmente cuando las condiciones ambientales favorecen su desarrollo.
- 3) Hongos causantes de un deterioro avanzado, como *Chaetomium* y *Sordaria* que pueden invadir los granos y otros productos que han estado bajo muy malas condiciones de almacenamiento, las que en ocasiones se inician en el campo. Estos hongos se desarrollan en productos almacenados en altas humedades relativas, superiores al 90%.

#### **Hongos que dañan al grano de sorgo**

A nivel internacional los hongos de campo más importantes que dañan el grano de sorgo, son *Fusarium moniliforme*, *F. semitectum* y *Curvularia lunata*; se sabe que algunas líneas de este grano resistentes a *Fusarium* y *Curvularia* pueden ser atacados por *Phoma* (Doggett, 1988). Existen además algunos hongos considerados como saprobios y patógenos débiles, como *Alternaria*, *Stemphylium*, *Epicoccum*, *Cladosporium* y *Torula*, que invaden hojas, tallos y espigas de plantas de cereales como el sorgo, que han sufrido efectos severos de factores desfavorables o que se encuentran en la etapa de maduración. Estos organismos son agresivos productores de esporas, están ampliamente distribuidos y se reproducen en tejido vegetal enfermo, maduro, o muerto, especialmente durante periodos de alta humedad. A la coloración gris o negra de las espigas y de la semilla debido a estas infecciones fungosas se le llama moho de hollín, punta negra o tizne. El desarrollo de micelio y manchado del grano (punta negra) puede reducir su rendimiento y calidad (Zyllinsky, 1984).

### Enfermedades del sorgo

Otras enfermedades importantes del sorgo que se presentan durante su desarrollo en el campo son: 1) el mildiú vellosa causado por *Sclerosphthora mascrospora* y *Sclerospora sorghi*; la enfermedad aparece con mayor frecuencia durante las primeras etapas de crecimiento de la planta, provocando clorosis, achaparramiento y amacollamiento excesivo. Gran parte de las plantas severamente enfermas mueren o raramente producen grano viable; 2) las manchas foliares, ocasionadas por varias especies de hongos como *Ramulispora sorghi* agente causal de la raya tiznada de la hoja, *Gloeocerospora sorghi* que produce la mancha zonada de la hoja, *Ascochyta sorghina* el cual provoca la mancha rugosa de la hoja, *Ramulispora sorghicola* que induce la mancha ovalada de la hoja, *Phyllachora sorghi* que ocasiona la mancha negra de la hoja, y *Cercospora sorghi* causante de la mancha gris de la hoja; 3) el tizón de la hoja es otra enfermedad en el sorgo ocasionada por *Helminthosporium turcicum*, el que además, puede infectar a la semilla antes de germinar y producir la podredumbre de la misma; 4) la antracnosis cuyo agente causal es *Colletotrichum gramincicola*; aunque esta enfermedad es bastante común en el sorgo, rara vez causa pérdidas económicas serias; 5) las royas son tal vez las enfermedades más ampliamente conocidas y destructivas de los cultivos de cereales, la especie *Puccinia purpurea* es la más importante en el cultivo de sorgo; 6) existen otros hongos que invaden principalmente a nivel de panoja en condiciones de alta humedad y temperatura, destruyendo algunas flores o la totalidad de la panoja, como *Fusarium moniliforme* que ocasiona el tizón de la panoja: los carbonos que son patógenos de cereales de grano pequeño y muchos pastos, las especies más comunes en el sorgo son: el carbón cubierto del grano (*Sphacelotheca sorghi*), el carbón volador (*Sphacelotheca cruenta*), el carbón largo (*Tolyposporium chrenbergii*), y el carbón de la panoja (*Sphacelotheca reiliana*). El comezuelo, es otra enfermedad que se presenta en la panoja de sorgo, cuyo agente causal es *Sphacelia sorghi*, que bajo condiciones favorables produce esclerocios que remplazan a los granos de sorgo (Williams *et al.*, 1978)

Por otra parte, en el sorgo también se presentan enfermedades ocasionadas por otros fitopatógenos como las bacterias *Xanthomonas holcicola* y *Pseudomonas andropogoni*

que causan el rayado bacteriano de la hoja; los virus que provocan achaparramiento y mosaicos en este cultivo, y varias especies de *Striga* que es una planta parásita, la cual impide el crecimiento de la planta, reduce su rendimiento y en los casos más graves ocasiona la muerte.

### **Micotoxinas producidas por hongos que atacan al grano de sorgo y sus implicaciones en la sanidad vegetal, animal y humana**

La alimentación humana y animal en gran parte se basa en el consumo de granos y sus derivados, los que frecuentemente son invadidos por hongos, causando diferentes problemas, entre ellos la contaminación con metabolitos secundarios llamados micotoxinas que ponen en riesgo la salud de los animales domésticos y del hombre, ya que cuando se ingieren causan intoxicaciones (Moreno, 1988). Los hongos micotoxígenos han sido aislados de muchos alimentos que están sometidos a deterioro. Los principales géneros de hongos asociados con la producción de micotoxinas incluyen especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Stachybotrys* y *Phoma* (Wainwright, 1992). Algunos de los hongos que invaden a el cultivo de sorgo, además de causar deterioro del grano pueden producir micotoxinas, tanto durante el desarrollo del grano en el campo como durante el almacenamiento. Las micotoxinas producidas por especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma* y *Aspergillus* posiblemente son los productos tóxicos mejor conocidos e importantes en este cultivo.

*Fusarium moniliforme*, agente causal de el tizón de panoja, ha sido señalada como una de las enfermedades más comunes en el cultivo de sorgo. Esta especie además, es capaz de producir micotoxinas como la moniliformina, la zearalenona y las fumonisinas. La moniliformina es una toxina considerada particularmente importante, porque se ha encontrado que esta sustancia produce la muerte o hemorragias, especialmente en el tracto gastrointestinal cuando se administra por vía oral en pollos de un día de nacidos, en una dosis de 40 mg/kg. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en ratones hembras es de 20.9 mg/kg y en ratones machos de 29.1 mg/kg. También se ha encontrado que la moniliformina tiene efectos tóxicos en plantas, al alterar principalmente la regulación del crecimiento de

éstas. Además de *F. moniliforme* la moniliformina, es sintetizada por *F. graminearum*, *F. fusarioides* y *Gibberella fujikuroi* (Colel y Cox, 1981).

La zearalenona es un metabolito que tiene una actividad estrogénica, provocando desórdenes hormonales, a los que se conoce como síndrome estrogénico, en varios animales. El cerdo es el animal doméstico más susceptible a esta toxina, en las hembras esta toxina puede provocar enrojecimiento e hinchamiento de la vulva y en casos severos el agrandamiento de la vulva y prolapso vulvar, esto induce a los cerdos a tallarse contra los troncos, provocando infecciones que pueden llegar a la septicemia; el resultado final de todo el síndrome en animales preñados puede ser el aborto. En los machos jóvenes esta toxina produce feminización, atrofiando los testículos y provocando un crecimiento anormal de las glándulas mamarias; esto no sucede con los marranos adultos y en ambos sexos causa infertilidad (Miller y Trenhol, 1994). Esta toxina es sintetizada por muchas otras especies de *Fusarium* como: *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, etc. La zearalenona ha sido detectada en muestras de grano de sorgo; Schroeder y Hein (1975) confirmaron la presencia de zearalenona en dos muestras de grano de sorgo con tizón de panoja, y los aislamientos de *Fusarium* de las mismas muestras también produjeron la toxina en el laboratorio. Asimismo, McMillian *et al.* (1983) detectaron la presencia de zearalenonas en granos de sorgo colectados de campos agrícolas en los estados de Georgia y Mississippi; 19% de las muestras resultaron positivas, con niveles de toxina de 1.468 a 2 µg/kg.

Las fumonicinas son un grupo de micotoxinas que también son sintetizadas por algunas especies de *Fusarium*. La fumonicina B<sub>1</sub>, es sintetizada por *F. moniliforme* y es considerada como responsable de la leucoencefalomacia en caballos y el síndrome del edema pulmonar en cerdos. En ratas alimentadas por 18 meses con una dosis de 50 mg/kg, la mayoría de las ratas desarrollaron un carcinoma hepático. Por otra parte, en los últimos años en China y el sur de África esta toxina se ha asociado con la incidencia de cancer de esófago en humano, aunque esto aún no se ha comprobado (Miller y Trenholm, 1994).

Otro hongo frecuente en el grano de sorgo es *Alternaria*, en los últimos años se ha logrado inducir la producción de micotoxinas por algunas especies de *Alternaria*, encontrando que estos metabolitos secundarios pueden ser tóxicos tanto para los animales como para el hombre; de estos metabolitos, cinco han sido aislados de diferentes alimentos contaminados en forma natural con especies de *Alternaria*. Algunos de los metabolitos secundarios estudiados e identificados de *Alternaria* son el alternariol (AOH), el monometil-éter de alternariol (AME), el ácido tenuazónico (ATE), el altenueno (ALT) y la altertoxina I (ALT I), siendo los tres primeros las principales toxinas de *Alternaria* porque se ha encontrado que varias especies producen estos metabolitos en cantidades relativamente altas (Shade y King, 1984).

El alternariol, el monometil-éter de alternariol y el altenueno son considerados, por su estructura química, derivados de las dibenzo  $\alpha$  pironas. Los dos primeros compuestos han sido determinados en manzanas (AOH de 0.07 a 5.88 mg/100g y AME de 0.02 a 0.23 mg /100g ), en tomates (AOH de 0.03 a 0.53 mg/100g), en naranjas (AOH de 0.33 a 4.10 mg/100g y AME de 0.04 a 3.33 mg/100g) y en limones (AOH de 0.11 a 0.28 mg/100g y AME 0.02 a 0.44 mg/100g) Stinson *et al.* (1981). También, han sido encontrados en sorgo manchado (AME+AOH de 7.9  $\mu$ g/kg), y en cacahuete manchado (no se reportaron las concentraciones) Sauer *et al.* (1978).

El monometil-éter de alternariol es considerado particularmente importante porque en los estudios realizados por Scott y Stoltz (1980) se demostró que tiene actividad mutágena baja. Asimismo el alternariol y el monometil-éter de alternariol son toxinas agudas débiles y los valores de la dosis IP para el alternariol en ratones es de 200 mg/kg del peso corporal y para el monometil-éter de alternariol es de 400 mg/kg (Colel y Cox, 1981). El último causa necrosis visceral, y ambos compuestos son fetotóxicos.

El altenueno ha sido encontrado en sorgo (en concentraciones de 0.1-1.5 mg/kg. Sauer *et al.*, 1978) y en tomates (de 0.01 mg/kg. Stinson *et al.*, 1980). Se sabe poco acerca de su toxicidad, aunque en células de HeLa se ha encontrado que es citotóxico (DI<sub>50</sub> de 28  $\mu$

g/ml). Los valores de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) en ratones es de 50 mg/kg del peso corporal (Colel y Cox, 1981).

Otra toxina que produce *Alternaria*, el ácido tenuazónico, derivada del ácido tetrámico, la que también es considerada como una de las principales toxinas de este hongo. Este compuesto fue estudiado inicialmente por su posible aplicación en el tratamiento del cáncer, ya que se consideró un compuesto antitumoral en animales y no por contaminar alimentos. Smith *et al.* (1968) demostraron posteriormente que esta sustancia producía hemorragias en órganos vitales, especialmente en el tracto gastrointestinal, cuando se administraba por vía oral o intravenosa en ratones y ratas, en una dosis de 50 a 398 mg/kg por peso corporal. En dosis altas produce la muerte de las ratas y los ratones en 9-10 días. El ácido tenuazónico, que también es sintetizado por *Pyricularia oryzae* y *Phoma sorghina* (Shephard *et al.*, 1991), ha sido implicado como causante de un desorden hemorrágico en el humano llamado onyalai en África. En 1978 Sauer *et al.* encontraron hiperactividad y una pérdida pequeña de peso en ratas a las que se les administró una dosis diaria de 29 mg/kg de ácido tenuazónico durante tres semanas, pero no encontraron efectos patológicos; posiblemente esta toxina pueda originar algunas alteraciones a largo plazo ya que inhibe la síntesis de ADN. El ácido tenuazónico ha sido encontrado en tomates contaminados, en concentraciones de 0.1-1.4 mg/kg, y en pasta de tomate y manzanas en niveles por debajo de 1 mg/kg (Watson, 1984).

La altertoxina I es producida por *Alternaria* en pequeñas cantidades y ha sido determinada en sorgo (Sauer *et al.*, 1978) y en manzana (Stinson *et al.*, 1981b). Es considerada como una toxina aguda débil, con una dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de 150 mg/kg de peso corporal en ratones, y se ha demostrado que es tóxica en células de HeLa.

Se ha puesto poca atención en los efectos sinérgicos que pueden causar las toxinas de *Alternaria* suministradas en la dieta diaria de un organismo, ya que por los diferentes estudios realizados se ha observado que algunos alimentos analizados, como tomates, manzanas, sorgo y cacahuete, pueden contener más de dos tipos de estos metabolitos de

*Alternaria*. En 1984 Watson encontró que los efectos tóxicos del alternariol y monometil-éter de alternariol; en células de HeLa, es menor cuando estas toxinas actúan independientemente que cuando se prueba su citotoxicidad mezclando ambos compuestos por lo que sugiere, que para poder evaluar el riesgo que poseen los metabolitos de *Alternaria* en la dieta alimenticia de animales en el laboratorio es necesario alimentarlos durante periodos prolongados con dosis bajas. Considera también que se debe poner mayor atención en los principales grupos de plantas cultivadas que son susceptibles a ser infectadas por especies de *Alternaria*, ya que es un hongo que tiene una distribución cosmopolita, es habitante del suelo y muchas de sus especies son patógenas de plantas de cultivos económicamente importantes como trigo, tabaco, maíz, cacahuete, sorgo, cebada, alfalfa y pastos. Dichas especies también causan problemas durante el transporte y almacenamiento de los productos vegetales, como granos y semillas, e incluso enmohecimientos severos de frutos y vegetales en refrigeración, por desarrollarse adecuadamente en temperaturas bajas (Stinson *et al.*, 1981).

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos químicos, los cuales varían en su grado de toxicidad. Las especies productoras de estas toxinas son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*. Las principales aflatoxinas son cuatro: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, y G<sub>2</sub>. La aflatoxina B<sub>1</sub> es considerada como la toxina más importante de este grupo de metabolitos debido a que se ha detectado con mayor frecuencia en forma natural en granos y semillas. Además, posiblemente sea la causa de la necrosis hepática de los humanos, y recientemente se ha reconocido que pueda estar implicada en el desarrollo de carcinoma hepático de manera sinérgica con el virus de la hepatitis B (Moss, 1996). Algunas cepas de *A. parasiticus* son capaces de producir las aflatoxinas B y G, y aproximadamente el 35% de las cepas de *A. flavus* producen solo las aflatoxinas del grupo B.

Shotwell *et al.*, (1969) no pudieron confirmar la presencia de aflatoxinas en ninguna de las 533 muestras de sorgo comercial que analizaron; Stoloff (1976) reportó niveles de 13-50 µg/kg de aflatoxinas en 2 de las 66 muestras de sorgo comercial analizadas. En otro

estudio realizado por McMillian *et al.*, 1983 detectaron la presencia de aflatoxinas en niveles de 1-90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en el 56% de las muestras de grano de sorgo analizadas, procedentes de campos de cultivo de los estados de Georgia y Mississippi. En 1996 se detectó una concentración muy alta de aflatoxinas (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en grano de sorgo del estado de Texas, lo que causó gran sorpresa debido a que en este estado, los niveles más altos de aflatoxinas generalmente detectados en grano de sorgo son de 30-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Latimer, 1996).

Debido a los posibles efectos adversos que el grano de sorgo contaminado con micotoxinas pudiese tener en el ganado, se han hecho varios estudios para conocer la incidencia de micotoxinas en este grano en condiciones naturales, demostrándose que durante el análisis, por cromatografía de capa fina, para determinar aflatoxinas y zearalenonas es posible confundir estas micotoxinas con otras sustancias cuyos patrones de migración, Rf, brillo y coloración cuando son iluminadas con luz ultravioleta, son muy similares. Algunas de estas sustancias, identificadas también como micotoxinas, son el alternariol y el monometil-éter de alternariol (Shotwell *et al.*, 1969; Seitz *et al.*, 1975 a, b; Sauer *et al.*, 1978).

García y Martínez (1991a) analizaron 44 muestras de sorgo dulce de importación para determinar la presencia de aflatoxinas y zearalenona siguiendo las técnicas analíticas oficiales de la AOAC, 1984 para maíz. La razón del análisis fue la alarma despertada entre algunos grupos de ganaderos y agencias gubernamentales responsables de la entrada de sorgo al país, debida a un informe que registraba contaminación abundante y niveles altos de zearalenona en el sorgo que se importó a principios de 1989. En las placas preliminares encontraron 19 y 20 muestras contaminadas con zearalenona y aflatoxinas respectivamente (44 y 47% del total de las muestras analizadas); sin embargo, después de las pruebas confirmatorias estos valores se redujeron a 7 y 0 muestras contaminadas con las toxinas correspondientes.

Al analizar la micobiota del sorgo, Garcia y Martinez (1991b) encontraron grandes cantidades de *Alternaria alternata*, 67% del total de los aislamientos de mohos que obtuvieron (2,504), comparadas con 14% de *Fusarium* spp., 13% de *Aspergillus* spp. y menos de 1% de *Penicillium* spp. Lo anterior sugiere que si efectivamente el sorgo es el causante de los abortos en cerdos y otros problemas en el ganado, como suponen algunos porcicultores y ganaderos, sería conveniente determinar otras micotoxinas, como aquellas producidas por especies de *Alternaria* y *Fusarium*, sin descuidar la micobiota presente y las implicaciones que estos mohos pudiesen tener en la industria de los alimentos balanceados, no solamente desde el punto de vista de la contaminación con micotoxinas sino también desde el punto de vista del biodeterioro que los mohos pudiesen inducir.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Conocer la microbiota y las micotoxinas, principalmente del género *Alternaria*, en muestras de grano de sorgo dulce.

### **Objetivos particulares**

- 1.- Conocer la microbiota presente en muestras de grano de sorgo dulce, utilizado como materia prima en la elaboración de alimento balanceado para ganado y aves.
- 2.- Identificar a nivel de especie los aislamientos de *Alternaria*.
- 3.- Determinar la presencia y concentración de zearalenona y aflatoxinas, micotoxinas comúnmente detectadas en granos de cereales.
- 4.- Determinar la presencia y concentración de las micotoxinas de *Alternaria*, particularmente de alternariol y monometil-éter de alternariol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Grano

El grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) empleado en este estudio fue proporcionado por la Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO) y Agricultura en Evolución (AGREVO), de campos del Bajío. Se trabajó con 21 muestras a las cuales se les determinó el contenido de humedad, germinación, micobiota y concentración de micotoxinas.

### Contenido de humedad

El contenido de humedad de los granos de sorgo fue determinado mediante el método de secado en estufa a 130 °C durante 18 horas. Se obtuvo por diferencia de peso y fue expresado con base en el peso húmedo, del promedio de cuatro repeticiones para cada una de las muestras analizadas, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CH} = \text{A/B} \times 100$$

en donde: CH= Porcentaje de contenido de humedad

A= Pérdida de peso en gramos

B= Peso original de la muestra

### Pruebas de germinación

La prueba de germinación fue realizada con 400 granos de sorgo por cada muestra, colocando 100 granos sobre toallas de papel húmedas dobladas por la mitad y cubriéndose con otra toalla húmeda doblada de la misma forma. Las toallas se enrollaron y se metieron dentro de una bolsa de plástico perforada, incubándose a una temperatura de 26 °C; a los 4 días se hizo la primera lectura y la segunda a los 10 días (ISTA, 1993).

### **Determinación de la micobiota**

Para determinar el número y la clase de hongos presentes en los granos de sorgo, se desinfectaron los granos superficialmente con hipoclorito de sodio (NA OCL) al 2% durante un min; posteriormente 100 granos de cada una de las muestras se sembraron en placas de Papa-Dextrosa-Agar (PDA), repartiendo 25 granos por caja de Petri (de cada una de las muestras se realizaron cuatro repeticiones). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 6 días, después de los cuales se aislaron e identificaron los hongos presentes en el sorgo. Los hongos correspondientes a *Alternaria* se determinaron hasta nivel de especie siguiendo la clave de Ellis (1971); los demás hongos conidiales se determinaron a nivel de género, utilizando la clave de Barnett y Hunter (1972). En el caso de los Coelomycetes se utilizó la obra de Domsch *et al.* (1980), y para *Aspergillus*, que se identificó a nivel de grupo, la de Raper y Fennell (1965).

### **Determinación de las micotoxinas**

#### **Análisis químico**

Se utilizaron dos métodos para realizar el análisis de micotoxinas presentes en las muestras de grano de sorgo, uno como una prueba previa para la detección de zearalenona y aflatoxinas y otro para alternarioles.

De las 21 muestras de sorgo, se seleccionaron aleatoriamente ocho y se analizaron por el método múltiple para micotoxinas de Eppley (1968) que es un método analítico para zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas. Esta técnica ha sido parcialmente adoptada como primera acción oficial por la AOAC Internacional (1995) para determinar aflatoxinas (49.2.14), y zearalenona (49.8.01) en maíz, con una modificación, que consiste en una partición líquido-líquido con hexano y acetonitrilo para eliminar lípidos y pigmentos del extracto.

El método para determinar la presencia y concentración de alternariol y monometil-éter de alternariol en las 21 muestras de sorgo analizadas fue el propuesto por Seitz *et al.* (1976), usando cromatografía de capa fina (TLC).

Estos métodos de análisis pueden dividirse en diversas fases según se indica a continuación:

**Método de Eppley (1968) para la extracción de aflatoxinas y zearalenona**  
**a) Extracción**

De cada una de las muestras de sorgo analizadas se tomaron 50g y se colocaron en una licuadora Waring (a prueba de explosión), junto con 25g de tierra de diatomeas (Hyflo Super Cel), 25 ml de agua destilada y 250 ml de cloroformo. La mezcla se licuó durante tres min a máxima velocidad y después las muestras extraídas fueron filtradas a través de papel filtro (Whatman Núm. 1, Qualitative).

**b) Columna de cromatografía**

Se utilizó una columna de cromatografía de gel de sílice, preparada con un tubo de cromatografía de 22X300 mm, en cuyo extremo inferior se colocó fibra de vidrio, 5g de sulfato de sodio anhidro y cloroformo, aproximadamente hasta la mitad del tubo. Posteriormente se agregaron 10g de gel de sílice 60 Merck, tamaño de partícula 0.0633-0.200 mm, (70 -230 mallas ASTM), para cromatografía en columna previamente activado y se mezcló con una varilla de vidrio para dispersarlo. Las paredes del tubo se lavaron con unos 20 ml de cloroformo y cuando la velocidad de asentamiento disminuyó, se drenó un poco de cloroformo para ayudar al asentamiento, dejando de 5-7 cm de esta sustancia por arriba del gel de sílice. Finalmente se agregaron lentamente 15g de sulfato de sodio y el cloroformo se drenó hasta el tope del sulfato de sodio.

Los primeros 50 ml colectados del extracto se pasaron por la columna de cromatografía de gel de sílice, adicionando 150 ml de hexano y posteriormente 150 ml de benceno; ambos solventes fueron eluidos a máxima velocidad (10-20 ml/ min) y luego desechados. La zearalenona fue eluida con 250 ml de solución acetona/benceno 5/95 v/v (fracción 1); después la columna se lavó con 150 ml de dietil éter anhidro. Las aflatoxinas fueron eluidas con 150 ml de solución metanol/cloroformo 3/97 v/v (fracción 2).

#### **e) Concentración**

Las fracciones obtenidas de cada elusión fueron evaporadas a casi sequedad en un rotavapor (Buchi Oil RE 111) con baño de vapor integrado (Buchi 461), evitando el calor excesivo (30 °C). En el caso de las aflatoxinas, los residuos fueron transferidos a viales (20 ml) realizando tres lavados con 10 ml de cloroformo y luego evaporados a casi sequedad en baño de vapor, en atmósfera de nitrógeno, y se conservaron en congelación (-20 °C) para su uso posterior. Para la zearalenona, el residuo se transfirió a un embudo de separación realizando cuatro lavados con 10 ml de hexano y uno con 10 ml de acetonitrilo, respectivamente; después se agitó y se dejaron separar las capas. La capa inferior (acetonitrilo) se colectó y se evaporó a casi sequedad en rotavapor, transfiriendo el residuo con 10 ml de cloroformo a un vial (20 ml), evaporando en baño de vapor en atmósfera de nitrógeno y conservado en congelación (-20 °C) hasta su uso posterior.

#### **d) Cromatografía de capa fina**

Se utilizaron placas de gel de sílice 60 (Merck, núm. de cat. 5721, de 20 x 20 cm, y 0.25 mm de grosor) activado por medio de un calentamiento previo durante una hora a 105 °C.

##### **Placas preliminares para aflatoxinas y zearalenona.**

Las fracciones de aflatoxinas fueron resuspendidas en 200 µl de benceno/acetonitrilo, 98/2 v/v agitándose durante un minuto en un agitador mecánico (Super-Mixer 1290, Line Instruments Inc). Con una microjeringa de 50 µl, se colocaron dos manchas de 10 µl cada una sobre una línea imaginaria a 2.5 cm del borde inferior de la placa; en esta misma placa se colocaron 3 manchas de 3, 5 y 7 µl, respectivamente, de una solución patrón de aflatoxinas B y G (concentración 1 µg/ml), y sobre una de las manchas de 10 µl de muestra se adicionó una mancha de 5 µl de solución patrón (mezcla problema + patrón). Las placas se desarrollaron dentro de un tanque, no equilibrado y no saturado, con el sistema de solventes cloroformo/acetona (95/5 v/v), durante ± 40 minutos. Las placas se sacaron del tanque y se dejaron secar durante unos min; ya secas se introdujeron en una cabina de luz ultravioleta (Cromato Vue), con longitud de onda larga (360 nm) y se realizó la determinación de las aflatoxinas por comparación visual entre las manchas

problema y las manchas patrón, detectando como positivas las muestras que presentaran un brillo azul y un Rf similar a las manchas de la solución patrón.

Las fracciones de zearalenona fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de benceno. agitándose durante un min con agitador mecánico; posteriormente, con una jeringa de 50  $\mu$ l se colocaron dos manchas de 10  $\mu$ l de cada muestra sobre una línea imaginaria a 2.5 cm del borde inferior de la placa. En esta misma placa también se colocaron manchas de 3, 5 y 7  $\mu$ l de solución patrón de zearalenona (concentración de 10  $\mu$ g/ml), y sobre una de las manchas se adicionó una mancha de 3  $\mu$ l de esta misma solución. Las placas se desarrollaron en un tanque no equilibrado, ni saturado, con un sistema de solventes de alcohol/cloroformo (5/95 v/v) durante 40 min. Las placas se sacaron del tanque y ya secas se introdujeron en una cabina de luz ultravioleta con longitud de onda corta (260 nm); se detectaron como positivas las muestras que presentaran un brillo azul verde y Rf similar a las manchas de la solución patrón. Las muestras positivas se conservaron en congelación para su posterior cuantificación.

#### **e) Pruebas confirmatorias**

Estas fueron realizadas para determinar la identidad de las toxinas detectadas: para detectar aflatoxinas las manchas en la placa de cromatografía se asperjaron con una solución de ácido sulfúrico/agua destilada (1/3 v/v). Con esta solución las manchas de aflatoxinas viran a un tono amarillo al ser observadas bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm).

Para confirmar zearalenona, las manchas en la placa de cromatografía fueron asperjadas con una solución de cloruro de aluminio (20g Cl<sub>3</sub> Al/100ml OH), y la placa se calentó durante 5 min a 130°C. Al ser observadas bajo luz ultravioleta de onda larga las manchas de zearalenona fluorescen de un color azul.

## **Método de Seitz *et al.* (1976c) para la extracción de alternariol y monometil-éter de alternariol**

### **a) Extracción**

De cada una de las muestras de grano de sorgo analizadas se tomaron 50g y se colocaron en una licuadora, con 250 ml de metanol y se mezclaron durante tres minutos a máxima velocidad. Los primeros 30 ml del extracto se filtraron y se colectaron. Este volumen se colocó en un embudo de separación de 250 ml y se le adicionaron 60 ml de sulfato de amonio al 20% y 30 ml de hexano, agitándose el embudo durante 30 seg. Posteriormente se dejaron separar las capas, la fase acuosa de sulfato de amonio/metanol se pasó a otro embudo de separación de 250 ml, y se extrajo dos veces con 5 ml de cloruro de metileno, recibiendo los extractos combinados en un vial (20 ml). La capa de hexano se lavó dos veces con 25 ml de metanol/agua al 50% y cada lavado se recogió en un vaso de precipitados; la fase acuosa se vació en un embudo de separación y se extrajo dos veces con 5 ml de cloruro de metileno, recibiendo el extracto posiblemente perdido de monometil-éter de alternariol en un vial.

### **b) Concentración**

Las fracciones obtenidas de cada extracción fueron evaporadas a sequedad en baño de vapor, en atmósfera de nitrógeno y conservadas en congelación (-20°C) hasta su uso posterior.

### **c) Cromatografía de capa fina**

Cada una de las fracciones de micotoxinas fue resuspendida en 200  $\mu$ l de benceno/acetoneitrilo (98/2 v/v) agitándose durante un min en un agitador mecánico.

### **Placas preliminares para alternariol y monometil-éter de alternariol**

De cada una de las muestras analizadas con una jeringa de 50  $\mu$ l se colocaron del extracto final dos manchas de 25  $\mu$ l, sobre una línea imaginaria a 2.5 cm del borde inferior de una placa de gel de sílice 60 activada por una h a 105 °C. Sobre una de las manchas de 25  $\mu$ l de muestra se adicionaron una mancha de 10  $\mu$ l de cada una de las soluciones patrón.

Asimismo en el centro de la placa se colocaron tres manchas de 25, 50 y 75 $\mu$ l, respectivamente, de una solución patrón de alternariol (concentración 0.8  $\mu$ g/ $\mu$ l), y sobre estas tres manchas patrón se adicionaron otras tres manchas de 2, 6 y 10 $\mu$ l de solución patrón de monometil-éter de alternariol (concentración 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l).

Las placas se desarrollaron dentro de un tanque, no saturado, ni equilibrado, con cloroformo/acetona (88/12 v/v) durante 50 min aproximadamente. Las placas ya secas se observaron bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm), y se detectaron como positivas las muestras que presentaron un brillo azul-verde o azul y un Rf similar a las manchas de las soluciones patrón. Todas las muestras que se detectaron como positivas se conservaron en congelación (-20°C) y se analizaron por duplicado.

#### **Placas cuantitativas**

Con una jeringa de 100  $\mu$ l se colocaron, del extracto final, tres manchas de cada una de las muestras analizadas y determinadas como positivas para ambas o para alguna de las toxinas, sobre una línea imaginaria a 2.5 cm del borde inferior de una placa de gel de sílice 60 previamente activada. La concentración de las manchas problema varió de acuerdo a la concentración, determinada por la comparación visual que se hizo de las muestras que resultaron positivas en las placas preliminares (de 50, 75 y 100 $\mu$ l a 100, 150 y 200 $\mu$ l). En el centro de la placa se colocaron tres manchas de 25, 50 y 75 $\mu$ l, respectivamente, de una solución patrón de alternariol (concentración 0.8  $\mu$ g/ $\mu$ l) y sobre estas tres manchas patrón se adicionaron otras tres manchas de 2, 6 y 10 $\mu$ l de una solución patrón de monometil-éter de alternariol (concentración 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l). Las placas se desarrollaron dentro de un tanque, no saturado, ni equilibrado con el sistema de solventes cloroformo/acetona (88/12 v/v) durante 50 min aproximadamente. Las placas ya secas se introdujeron en una cabina de luz ultravioleta con longitud de onda larga (360 nm); las toxinas de *Alternaria* se observaron como manchas azul verde y azules, utilizando como referencia las manchas de la solución patrón.

#### **d) Pruebas confirmatorias**

Estas fueron realizadas para confirmar la identidad de las micotoxinas detectadas. Para alternariol las manchas en la placa de cromatografía se asperjaron con una solución de ácido sulfúrico/agua destilada (1/3 v/v). Con esta solución las manchas de alternariol viran a un color azul intenso al ser observadas bajo luz ultravioleta de onda larga. Para monometil-éter de alternariol las manchas en la placa de cromatografía se asperjaron con una solución de cloruro de aluminio (20g Cl<sub>3</sub>Al/ 100ml OH) y la placa se calentó durante 5 min a 130 °C. Al ser observadas las manchas de monometil-éter de alternariol bajo luz ultravioleta de onda larga fluorescen de color azul cielo intenso.

#### **Determinación de la concentración de micotoxinas**

Para la cuantificación de cada toxina detectada en la placa confirmatoria para las muestras que se detectaron positivas se ajustó la concentración de las mismas según la siguiente fórmula (AOAC, 1995).

$$\mu\text{g de toxina} \times \text{kg de muestra} = \left( \frac{S \times Y \times V}{X \times W} \right)$$

En donde: S =  $\mu\text{l}$  de la mancha del patrón con intensidad igual a la de la muestra

Y = concentración del patrón utilizado (  $\mu\text{g/ml}$  )

V =  $\mu\text{l}$  de la dilución final del extracto de la muestra

X =  $\mu\text{l}$  del extracto de la mancha de la muestra con intensidad de fluorescencia igual a la mancha patrón

W = gramos de muestras aplicados al embudo de separación

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I Análisis de la micobiota del grano de sorgo

De los aislamientos obtenidos de las muestras de sorgo analizadas, el más abundante de los mohos fue *Alternaria alternata*, con 871 aislamientos ( 55.86%, Tabla 1); algunas especies del género *Alternaria* son consideradas como saprobias y otras patógenas débiles que invaden hojas, tallos y espigas de cereales en el campo produciendo tizones y manchas foliares, especialmente cuando el cultivo ha sufrido efectos severos de factores desfavorables, u otras enfermedades, tales como pudrición de la raíz, tizón de las hojas, acame y ataque de áfidos, o se encuentre en etapa de maduración (Zillinsky, 1984).

El desarrollo de micelio y manchado del grano de sorgo se ha relacionado con la presencia de especies del género *Alternaria*. Seitz *et al.* (1975a) encontraron, en siete híbridos comerciales de sorgo procedentes del este de Kansas, que cuando el grano se producía en zonas con alta humedad, particularmente un poco antes o durante la cosecha, éste era invadido por mohos del género *Alternaria*, induciendo daño y manchado del grano; además estas mismas condiciones favorecieron la producción de alternarioles.

Las especies de *Alternaria* también han sido aisladas de otros cereales de grano pequeño. Bruce *et al.* (1984) encontraron, en un total de 230 muestras de cereales, 148 con especies de *Alternaria*; 74.6% del total de las especies fueron *A. alternata* en grano de trigo, 85.3% en cebada y 71.8% en centeno. De los 101 aislamientos de diferentes especies de *Alternaria*, 46 de los 59 correspondientes a *A. alternata* (77.9%) produjeron una o más toxinas en el laboratorio.

En un estudio realizado por García y Martínez (1991b) se analizaron 44 muestras de un lote de sorgo dulce importado, sospechoso de estar contaminado con zearalenona, para conocer los niveles de mohos contaminantes. En ese caso también se encontró que el hongo predominante fue *A. alternata*, con 1575 aislamientos (64%).

A pesar de que se tiene poca información sobre los efectos adversos que produce *A. alternata* en sorgo, los resultados obtenidos en este estudio demuestran una alta incidencia de esta especie en el grano, por lo que no se debe subestimar su presencia, ya que además de inducir enfermedades, daño y manchado del grano de sorgo, puede producir micotoxinas.

Otra especie de *Alternaria* determinada con poca incidencia en las muestras de sorgo analizadas fue *A. raphani* (0.64%, Tabla 1); sin embargo no se debe ignorar debido a que, en estudios realizados por Bruce *et al.* (1984) en granos de trigo, cebada y centeno, se encontró que esta especie es productora de alternariol, monometil-éter de alternariol y ácido tenuazónico.

Del género *Phoma* se obtuvieron 294 aislamientos (18.85%, Tabla 1). Este es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido y usualmente se presenta como patógeno de muchas plantas, tanto herbáceas como leñosas. Las especies del género *Phoma* se observan frecuentemente como invasores secundarios en hojas y brácteas florales de los cereales durante la etapa de maduración. Su actividad patógena está considerablemente restringida en los cultivos de cereales y pastos (Zillinsky, 1984). Sin embargo, algunas líneas de sorgo que son resistentes a especies de *Fusarium* y *Curvularia* pueden ser susceptibles a ser invadidas por *Phoma* (Dogget, 1988). Además puede producir ácido tenuazónico, que tiene diversos efectos nocivos en animales experimentales, como ratones y ratas, y en altas dosis produce la muerte. Este hongo ha sido implicado, incluso, como causante de un desorden hemorrágico llamado onyalai en África (Watson, 1984).

*Epicoccum* fue otro de los hongos determinados, encontrándose 102 aislamientos (6.54%, Tabla 1). Es considerado como un hongo que se presenta en todas partes, tanto como saprobio en material vegetal muerto como en lesiones de manchas foliares causadas por otros hongos o bacterias. No ha sido relacionado con la producción de micotoxinas.

Del género *Helminthosporium* se obtuvieron 90 aislamientos (5.77%, Tabla 1). Una de las especies mejor conocidas que invaden el sorgo es *H. turcicum*, agente causal del tizón de la hoja y de plántulas. También puede invadir la semilla antes de germinar, produciendo una podredumbre de la misma (Williams *et al.*, 1978).

A pesar de que *Fusarium* es uno de los hongos más importantes que inducen pudriciones de panoja en sorgo, se obtuvieron únicamente 34 aislamientos (2.18%, Tabla 1) de las muestras analizadas. *F. moniliforme* causa tizón de la panoja en condiciones de alta humedad y temperatura, invade las inflorescencias, algunas de las flores o la totalidad de la panoja (Williams *et al.*, 1978). Esta especie es productora de varias micotoxinas, entre ellas zearalenona, moniliformina y fumonisinas (Miller y Trenholm, 1994).

*Colletotrichum* sólo se aisló de una muestra (Tabla 1). La especie más importante que produce mancha foliar (antracnosis) y pudrición del tallo (pudrición roja) en sorgo es *C. graminicola* (Williams *et al.*, 1978).

Otros géneros aislados con muy baja incidencia de algunas muestras de sorgo fueron *Curvularia*, *Torula* y *Nigrospora* (Tabla 1). De *Curvularia*, que es un hongo frecuente en panoja de sorgo donde causa ennegrecimiento del grano y baja su viabilidad, se obtuvieron únicamente seis aislamientos en una de las muestra analizadas. *Torula* es un hongo que se desarrolla frecuentemente en cereales en la Meseta Central de México, durante las épocas húmedas de cosecha. Invade espigas, partes superiores de tallos y vainas foliares, produciendo un típico aspecto de hollín (Zillinzky, 1984). De este hongo se encontraron seis aislamientos en una muestra. De *Nigrospora* se obtuvieron cinco aislamientos de dos muestras; es un hongo con especies que viven como saprobias en el suelo, pero también pueden atacar una gran variedad de plantas y no se sabe que produzca micotoxinas (Moreno, 1988).

*Aspergillus* y *Penicillium* (Tabla 1) invaden granos y semillas en el campo y durante el almacenamiento en condiciones desfavorables, causando reducción del poder germinativo

de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas. De las muestras analizadas, el género *Aspergillus* fue el más abundante. Del grupo *A. flavus*, que incluye especies potencialmente productoras de aflatoxinas, se obtuvieron 62 aislamientos. De los grupos *A. terreus*, *A. tamari* y *A. niger* se obtuvieron 11, 1 y 30 aislamientos respectivamente. Del género *Penicillium* se obtuvieron 25 aislamientos; algunas especies de este género han sido reportadas como productoras de diversas micotoxinas (Moss, 1996).

**Tabla 1. Hongos aislados del grano de sorgo**

Hongos	Núm. de aislamientos en PDA
<i>Alternaria alternata</i>	871
<i>A. raphani</i>	10
<i>Phoma</i>	294
<i>Epicoccum</i>	102
<i>Helminthosporium</i>	90
<i>Fusarium</i>	34
<i>Curvularia</i>	6
<i>Nigrospora</i>	5
<i>Torula</i>	6
<i>Colletotrichum</i>	12
<i>A. flavus</i>	62
<i>A. niger</i>	30
<i>A. terreus</i>	11
<i>A. tamari</i>	1
<i>Penicillium</i>	25

## **II Análisis de las micotoxinas**

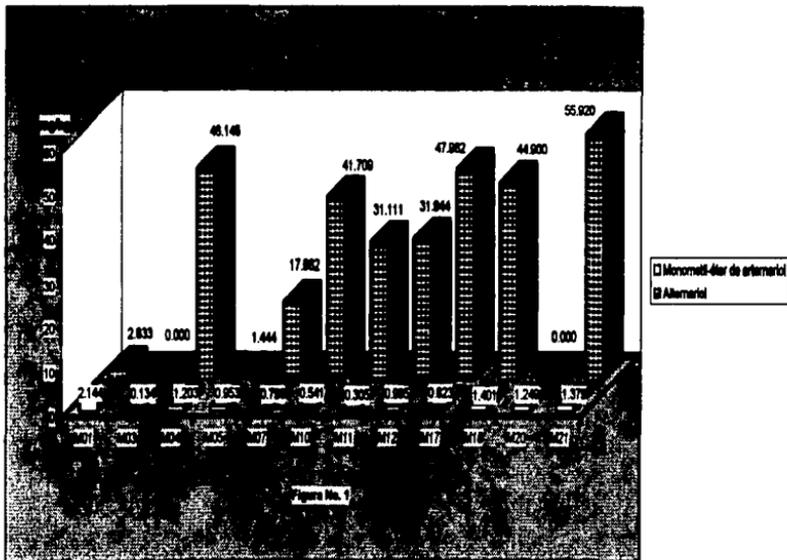
En este estudio se realizaron pruebas previas para detectar la presencia de zearalenona y aflatoxinas en las muestras de grano de sorgo. La razón del análisis fue debida a los reportes en México de niveles altos de zearalenona en granos de sorgo dulce, principalmente en algunas muestras de lotes de grano que se importaron a principios de 1989, alarmando a grupos de ganaderos y dependencias gubernamentales responsables de la entrada de sorgo al país.

Los resultados obtenidos en este estudio para detectar zearalenona y aflatoxinas indicaron que ninguna de las 8 muestras analizadas aleatoriamente estaban contaminadas con zearalenona y sólo en una se detectaron trazas de aflatoxinas B. Debido a lo anterior, y por el estudio previo realizado por García y Martínez (1991a) en el que no se pudo, con las pruebas confirmatorias, demostrar la presencia de estas toxinas, especialmente la zearalenona, se consideró importante analizar las muestras de grano de sorgo, para otras toxinas, como el alternariol y el monometil-éter de alternariol, reportadas en la literatura para este grano.

Los resultados del análisis para alternarioles en grano de sorgo indicaron que 47.6% de las muestras estaban contaminadas con alternariol, con niveles de 1.444 - 55.920 mg/kg, y 57.1% con monometil-éter de alternariol, con niveles de 0.134 - 2.144 mg/kg. Asimismo, diez de estas muestras contaminadas se detectaron positivas para ambas micotoxinas (Figura 1).

El alternariol y el monometil-éter de alternariol junto con el ácido tenuazónico son consideradas las principales toxinas de *Alternaria*, debido a que han sido detectadas en cantidades relativamente altas en frutas, vegetales y granos (cacahuete y sorgo) invadidos por este hongo. Sin embargo, los conocimientos que se tienen acerca de su toxicología, comparándolas con otras toxinas, son escasos.

Niveles de toxinas detectadas en muestras de grano de sorgo contaminadas con alternarios



En este estudio la toxina que se detectó en niveles relativamente elevados fue el alternariol. Se ha demostrado que esta toxina tiene efectos fetotóxicos, teratógenos y antibacterianos. En concentraciones de 1:40,000 inhibe totalmente el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, y de 1:20,000 a *Escherichia coli*. La  $DI_{50}$  en células de HeLa se ha encontrado que es de 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En ratones la dosis IP es de 200 mg/kg (3 de cada 10 ratones mueren).

El monometil-éter de alternariol se detectó en concentraciones muy bajas en las muestras analizadas en este estudio, no obstante, es importante porque en algunas investigaciones se ha demostrado que presenta una baja actividad mutagénica, fetotóxico, teratógeno, antibacteriano y tiene una actividad sinérgica cuando se combina con el alternariol (25 mg/kg 1:1). En concentraciones de 500  $\mu\text{g}/\text{disco}$  inhibe a *Bacillus mycoides*. En células de HeLa la  $DI_{50}$  es de 8-14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La dosis IP en ratones es de 400 mg/kg (1 de cada 10 ratones mueren) y causa necrosis visceral.

Lo anterior manifiesta la importancia fundamental que tiene realizar este tipo de análisis químicos en materias primas como el sorgo, que en México son destinadas principalmente para la elaboración de alimento balanceado para ganado y aves, pudiendo dichos metabolitos representar pérdidas económicas y problemas sanitarios para las personas involucradas en la producción pecuaria y de alimentos balanceados.

Al realizar las pruebas confirmatorias para el alternariol, se pudo observar que estas toxinas fluorescen de color azul-verde más intenso al ser asperjadas con una solución de ácido sulfúrico, a diferencia de las aflatoxinas que viran a amarillo. Por ello ambas toxinas se pueden distinguir claramente a pesar de tener casi el mismo  $R_f$  (0.39 para AOH y 0.37 para aflatoxinas G1) al desarrollarse en un sistema de solventes de cloroformo/acetona (88/12 v/v).

Para la detección de las toxinas de *Alternaria* las placas preliminares de cromatografía de capa fina se desarrollaron en cloroformo/acetona (88/12 v/v). La presencia de alternariol y

monometil-éter de alternariol se determinó al comparar las manchas del extracto final con las manchas de la solución patrón de ambas micotoxinas. Las manchas de alternariol fluorescen azul-verde bajo luz ultravioleta de onda larga (360nm), y las de monometil-éter de alternariol fluorescen azul-cielo intenso con luz ultravioleta de onda larga.

En el caso de las manchas de monometil-éter de alternariol al ser asperjadas con una solución de cloruro de aluminio y calentar la placa durante 5 min a 130 °C, éstas fluorescen azul cielo intenso, parecido al azul de la zearalenona. Debido a lo anterior, con esta última prueba confirmatoria no se puede diferenciar con certeza la toxina monometil-éter de alternariol de la zearalenona, ya que, existe la posibilidad de cometer errores de interpretación porque además, estas sustancias, presentan patrones de migración ( $R_f$  0.65) y coloraciones de fluorescencia semejantes cuando se desarrollan en el sistema de solventes cloroformo/acetona.

En este estudio, a pesar de que las pruebas confirmatorias no revelaron claramente la identidad de la toxina monometil-éter de alternariol por el análisis de la comparación visual que se hizo de las muestras que resultaron positivas en las placas preliminares, con la solución patrón de esta toxina se puede decir que la toxina detectada es el monometil-éter de alternariol, debido a que estas fluorecieron azul-cielo intenso, igual que la solución patrón, mientras que la zearalenona, fluoresce azul-verde (Seitz *et al.*, 1975a); por otra parte, siguiendo el método de Eppley (1968) con la modificación de AOAC, para detección de zearalenona no fue posible determinar esta toxina. De cualquier forma, para confirmar estos resultados, se considera conveniente utilizar otro sistema de solventes que detecten estas toxinas en el extracto final de la muestra y permita separar el monometil-éter de alternariol de la zearalenona. También otros métodos como la espectrofotometría y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) son otras alternativas para detectar, separar, cuantificar y confirmar los resultados obtenidos en este estudio por cromatografía de capa fina para estas toxinas. La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) ha sido utilizada para detectar toxinas de *Alternaria*, debido a que es un método analítico que

permite obtener una mejor separación de las toxinas y además cuantificarlas con mayor precisión (Palmisano *et al.*, 1990; Shepard *et al.*, 1991).

En este estudio se pudo observar que, a pesar de que la cromatografía de capa fina ha sido uno de los métodos más comúnmente utilizado para el análisis cuantitativo de las dibenzo  $\alpha$  pironas, altertoxinas, ácido tenuazónico y otras toxinas de *Alternaria*, existe el riesgo de que algunas toxinas como el monometil-éter de alternariol, se confundan con otras sustancias, como la zearalenona. Además, se ha encontrado que el brillo de las manchas desarrolladas de monometil-éter de alternariol se puede perder debido a su exposición a la atmósfera, a la luz ultravioleta e incluso la misma toxina durante su extracción cuando se utiliza hexano para eliminar aceites y pigmentos (Seitz *et al.*, 1975a). De las muestras de grano de sorgo que resultaron positivas para monometil-éter de alternariol durante el proceso de extracción, se detectó la pérdida de esta toxina en el hexano utilizado para eliminar aceites y pigmentos en algunas de las muestras de grano de sorgo analizadas. En la primera extracción realizada para cuantificar los niveles de monometil-éter de alternariol, dos muestras resultaron positivas al analizar la fracción de hexano, en donde se detectó una pérdida de 0.16 mg/kg (19.20%) y de 0.23mg/kg (13.14 %). De la extracción que se hizo por duplicado en tres muestras se detectó la pérdida de monometil-éter de alternariol de 0.55 mg/kg (24.66%), 0.44mg/kg (27.5%) y 0.55 mg/kg (33.13%). En muestras de sorgo analizadas por cromatografía de HPLC, Seitz y Mohr (1976) reportaron una pérdida de monometil-éter de alternariol del 29% en el hexano.

### **III Análisis de las micotoxinas en relación con la microbiota aislada**

De las muestras de sorgo que resultaron positivas para alternarioles, se puede observar que la concentración de toxina detectada no está directamente relacionada con el número de aislamientos de mohos encontrados, debido a que existen muestras (Tabla 2) en donde el número de aislamientos de *Alternaria alternata* es alto en relación con la concentración de toxinas detectadas. Asimismo, existen muestras en donde el número de aislamientos de *A. alternata* es muy bajo, o incluso de cero, mientras que la concentración de toxina resultó ser elevada (hasta de 55.92 mg /kg). Lo anterior indica que estas muestras de

grano de sorgo no estaban recién cosechadas, reflejándose esto en los resultados obtenidos en la determinación del contenido de humedad, germinación y micobiota del grano de sorgo (Tabla 2). En estas muestras se encontró un contenido de humedad alto y una germinación por debajo de lo recomendado para su almacenamiento, según las Normas para la Certificación de Semillas (SAGAR, 1975) de: 13% de contenido de humedad y una germinación mínima de 80% (Tabla 2).

De los resultados del análisis de la micobiota (Tabla 3) se puede observar, además que en dichas muestras hubo mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, considerados generalmente como mohos de almacén. Esto sugiere que posiblemente el grano de sorgo de estas muestras ya había estado almacenado por algún tiempo y que los hongos de campo, como *Alternaria*, empezaron a desaparecer al verse limitados por condiciones desfavorables para su crecimiento, quedando en el grano solamente las micotoxinas producidas por ellos y que fueron detectadas durante el análisis químico.

Tabla 2.

Número de aislamientos obtenidos de *A. alternata*, contenido de humedad, germinación y niveles de toxinas detectadas en muestras de grano de sorgo

N° DE MUESTRA	N° DE AISLAMIENTOS	% CH	% GERMINACIÓN	AOH mg/K	MEA mg/K
M01	87	12.26	80	02.833	2.144
M03	5	14.95	21	00.000	0.134
M04	77	13.64	85	48.148	1.203
M05	82	13.75	83	01.444	0.953
M07	60	14.13	92	17.962	0.796
M10	0	13.72	87	41.709	0.541
M11	40	12.45	86	31.111	0.305
M12	0	16.06	64	31.944	0.995
M17	38	12.13	84	47.962	0.823
M18	33	12.68	89	44.900	1.401
M20	39	12.09	92	00.000	1.249
M21	1	13.25	24	55.920	1.379

Tabla 3.

Micobiota de las muestras de grano de sorgo contaminadas con alternarios

HONGOS	Número de aislamientos											
	M01	M03	M04	M05	M07	M10	M11	M12	M17	M18	M20	M21
<i>A. alternata</i>	87	5	77	82	60	0	40	0	38	33	39	5
<i>A. raphani</i>	0	0	1	1	5	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phoma</i>	5	0	0	0	0	76	0	15	8	0	18	14
<i>Epicoccum</i>	4	0	19	9	4	0	0	0	4	3	7	0
<i>Helminthosporium</i>	4	1	2	2	4	0	0	0	0	14	6	0
<i>Fusarium</i>	0	0	2	1	2	9	5	2	0	2	4	1
<i>Curvularia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>Nigrospora</i>	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Torula</i>	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
<i>Colletotrichum</i>	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i>	0	8	0	0	0	1	22	55	0	0	0	0
<i>Penicillium</i>	0	0	0	0	0	3	8	1	0	0	0	0

## CONCLUSIONES

Los granos de sorgo son invadidos por diversos hongos en el campo, entre ellos *Alternaria*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Helminthosporium*, *Fusarium* y otros, que causan enfermedades en la planta en pie y reducen la calidad de los granos. Además dichos hongos son transmitidos de un ciclo agrícola a otro a través de las semillas, pudiendo afectar severamente el valor económico del cultivo. Asimismo, algunos de estos hongos encontrados pueden poner en peligro la salud de los animales domésticos, ya que varias especies de los hongos aislados (*Alternaria*, *Fusarium*, *Phoma*, *Aspergillus* y *Penicillium*) producen micotoxinas, que representan problemas económicos y sanitarios al productor pecuario y de alimentos balanceados al afectar el desarrollo de los animales y en ocasiones incluso su muerte. *Alternaria alternata* resultó ser la especie más abundante (55.86%) de los hongos aislados de las muestras de grano de sorgo analizadas; esta especie es capaz de producir bajo condiciones favorables una o más micotoxinas (alternariol y monometil éter de alternariol) de forma natural en el grano de sorgo.

Los resultados del análisis por cromatografía de capa fina para la detección de micotoxinas del grano sorgo, indicaron que en las muestras analizadas no fue posible detectar la presencia de zearalenona y con relación a las aflatoxinas solamente en una de las muestras fueron detectadas trazas de aflatoxinas B.

Con base en lo anterior y para cumplir con los objetivos del trabajo, se consideró importante determinar la presencia de toxinas, como el alternariol y el monometil-éter de alternariol ya que estas toxinas son frecuentes en el grano de sorgo y, por lo tanto, resulta importante realizar estudios más cuidadosos con relación a la micobiota y al análisis de la presencia de micotoxinas en grano de sorgo, poniendo mayor atención en aquellas micotoxinas poco estudiadas, como las del género *Alternaria*, ya que generalmente se ha reconocido a *Fusarium* como uno de los hongos más importantes agentes causales de pudriciones de paja en sorgo, y como productor de micotoxinas, entre éstas la

zearalenona, considerada como causante de abortos y otros problemas en animales de granja, especialmente ganado porcino.

Los resultados del análisis de la micobiota del grano de sorgo y de las micotoxinas, especialmente las producidas por *Alternaria*, apoyan las aseveraciones de que, las reacciones negativas observadas en los animales de granja alimentados con granos de sorgo mohoso no son causadas por micotoxinas aisladas, sino por la combinación de los efectos de cada una de las micotoxinas; esto es efectos sinérgicos. Debido a lo anterior, es importante conocer con detalle los efectos adversos que el grano de sorgo contaminado con micotoxinas de *Alternaria* pudiese tener para el ganado y las aves de corral.

## LITERATURA CITADA

- AOAC International, 1995. *Official Methods of Analysis*. 14a. ed. Cap. 26. Association of Official Analytical Chemists. Arlington.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter, 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 13a. ed. Burgess, Mineápolis.
- Bruce, V.R., M.E. Stack y P.B. Mislivec, 1984. Incidence to toxic *Alternaria* species in small grains from the USA. *J. Food Sci.* 49: 1626-1627.
- Colel, J.R. y H.R. Cox, 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. Academic Press, Nueva York.
- Christensen, C.M. y H. H. Kaufmann, 1969. *Grain Storage. The Role of Fungi in Quality Loss*. University of Minnesota Press, Mineápolis.
- Doggett, H., 1988. *Sorghum*. 2a. ed. Longman Scientific & Technical, Nueva York.
- Domsch, K.H., W.Gams y Traute-Heidi Anderson, 1980. *Compendium of Soil Fungi*, 2 vols. Academic Press, Nueva York.
- Ellis, M.B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew.
- Eppley, R.M., 1968. Screening method for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin *J.AOAC* 31: 74-78.
- García Aguirre, G. y R. Martínez Flores, 1991a. Problemas en la determinación de micotoxinas en grano de sorgo. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México. Ser. Bot.* 61: 43.

García Aguirre, G. y R. Martínez Flores, 1991b. Análisis micológico de granos de sorgo dulce. *Rev. Mex. Mic.* 7: 129-138.

International Seed Testing Association. Rules, 1993. *Seed Sci. Technol.* 21: 288.

Latimer, G., 1996. Texas Grain Sorghum has surprising aflatoxin levels. *Internet*.

McMillian, W.W., D. M. Wilson, C.J. Mirocha y N.W. Widstrom, 1983. Mycotoxin contamination in grain sorghum from fields in Georgia and Mississippi. *Cereal Chem.* 60: 226-227.

Miller, J.D. y H. L. Trenholm, 1994. *Mycotoxins in Grain Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, Minnesota.

Moreno, M.E., 1988. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Moss, O.M., 1996. Centenary review. Mycotoxins. *Mycol. Res.* 5: 513-523.

FAO, 1997. *La economía del sorgo y del mijo en el mundo. Hechos, tendencias y perspectivas*. ICRISAT y FAO, Roma.

Palmisano, F., P.G. Zambonin, A. Visconti y A. Bottalico, 1989. Determination of *Alternaria* mycotoxins in foodstuffs by gradient elution liquid chromatography with electrochemical detection. *Chromatogr.* 27:425-430.

Raper, K. W. y D. I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Sauer, D.B., L.M. Seitz, R. Burroughs, H.E. Mohr, J.L. West, R.J. Milleret y H.D. Anthony, 1978. Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *J. Agric. Food Chem.* 26: 1380-1383.
- Scott, P.M. y D.R. Stoltz, 1980. Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutat. Res.* 78:33-40.
- Schade, J.E., y A. D. King, Jr., 1984. Analysis of the mayor *Alternaria* toxins. *J. Food Chem.* 12: 978-995.
- Schroeder, H.W. y H. Hein Jr. 1975. Anote of zearalenone in grain sorghum. *Cereal Chem.* 52: 751-752.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1987-1993. *Producción y comercialización de sorgo*. Subsecretaría de Planeación. México, D.F.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1995. *Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos*. Subsecretaría de Planeación. México, D.F.
- Seitz, L.M. D.B. Sauer, H. E. Mohr y R. Burroughs, 1975a . Weathered grain sorghum: natural occurrence of alternariols and storability of the grain. *Phytopathol.* 65: 1259-1263.
- Seitz, L.M., D.B. Sauer, H. E. Mohr, R. Burroughs y J.V. Paukstelis. 1975b. Metabolites in *Alternaria* in grain sorghum: compounds that could be mistaken for zearalenone and aflatoxin. *J. Agric. Food Chem.* 23: 1-4.
- Seitz, L.M. y H. E. Mohr, 1976. Analysis of *Alternaria* metabolites by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 70: 224-230.

Shephard, S.G., P.G. Thiel y E.W. Sydenham, 1991. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tenuazonic acid and related tetramic acids. *J. Chromatogr.* 566: 195-205.

Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, H.R. Burmeister, W.F. Kwolek, G.M. Shannon y H.H. Hall, 1969. Survey of cereal grains and soybean for the presence of aflatoxin: wheat, grain sorghum, and oats. *Cereal Chem.* 46: 446-454.

Smith, E.R., T.N. Fredrichson, y Z. Hadidian, 1968. In: D.H. Watson, 1984. An assessment of food contamination by toxic products of *Alternaria*. *J. Food Prot.* 6: 485-488.

Stinson, E.E., D.D. Bills, S.F. Osman, J. Siciliano, M.J. Ceponis y E.G. Heisler, 1980. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 28, 960-963.

Stinson, E. E., S. F. Osman, E. G. Heisler, J. Siciliano y D.D. Bills, 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *J. Agric. Food Chem.* 29: 790-792.

Stubbs, R.W., J.M. Prescott, E. E. Saari y H.J. Dubin. 1986. *Manual de metodología sobre las enfermedades de los cereales*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, México.

Stoloff, L., 1976. Occurrence of mycotoxins in food and feeds. In: J.V. Rodricks. *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*. Adv. Chem. Series 149. Amer. Chem. Soc.

Wainwright, M., 1992. *Introducción a la biotecnología de los hongos*. Acribia, S.A. Zaragoza.

**Watson, D.H., 1984. An assessment of food contamination by toxic products of *Alternaria*. *J. Food Prot.* 47: 485-488.**

**Williams, R.J., R.A. Frederiksen y J.C. Girard, 1978. *Manual para la identificación de las enfermedades del sorgo y mijo*. Instituto Internacional de Investigaciones de Cultivos para los Trópicos, India.**

**Zillinsky, F.J., 1984. *Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño: una guía para su identificación*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, México.**