

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



"COMPORTAMIENTO DE 12 GENOTIPOS DE MAIZ (*Zea mays* L.)
Y SU RESPUESTA A LA INOCULACION ARTIFICIAL CON
Aspergillus flavus EN DOS FECHAS DE SIEMBRA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA
PRESENTA

FRANCISCO LOPEZ ROMERO

MARIN, N.L.

MAYO DE 1999

TL

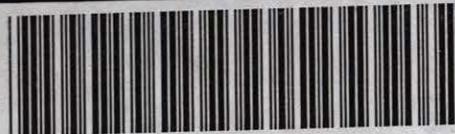
SB608

.M2

L65

1999

c.1



1080111011

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ BAJO LA DIRECCIÓN Y ASESORÍA DEL
COMITÉ SUPERVISOR INDICADO, HABIENDO SIDO ACEPTADO Y
APROBADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

COMITÉ DE TESIS



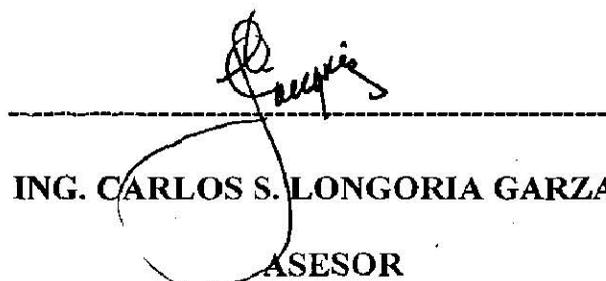
Ph. D. FRANCISCO ZAVALA GARCÍA

ASESOR PRINCIPAL



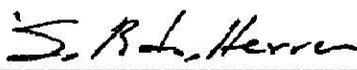
Ph. D. JOSÉ LUIS DE LA GARZA G.

ASESOR



ING. CARLOS S. LONGORIA GARZA

ASESOR



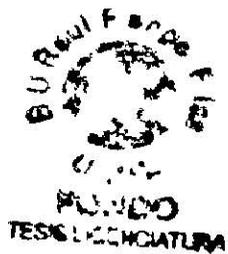
Ph. D. SERGIO RODRÍGUEZ HERRERA

ASESOR EXTERNO

MARÍN, N.L.

MAYO 1999

TL
SB 608
- M2
LCS
1999



DEDICATORIAS

A DIOS TODOPODEROSO

Gracias señor por todo lo que me has dado, gracias por permitirme conseguir uno de mis grandes anhelos a lado de mis padres, gracias por la sabiduría necesaria para la culminación de mi carrera.

A mis Padres, Sr. Francisco López de la Rosa y Sra. María Bertha Romero de López.

Para ustedes, del cual tengo toda su comprensión y apoyo en momentos difíciles, haciendo posible la culminación de uno de mis más grandes anhelos, gracias por tenerlos a mi lado y por darme la bendición de Dios; los amaré por siempre.

A mi padrino, Pbro. Francisco Arreola Morales.

Por considerarme como a un hijo, espero no defraudarlo.

A mis padrinos, Cap. Oscar Aguilar Gutiérrez (†) y Sra. Isabel Nazara de Gutiérrez.

Por tenerme siempre presente, gracias por todo.

A mis hermanos, José Luis Díaz Velázquez, Joel Díaz Velázquez, Ing. Sergio Díaz Velázquez, Heriberto Toledo Aquino e Ing. Leocadio Toledo Aquino.

Quienes en todo momento me brindaron su apoyo y me alentaron a seguir hasta el final.

A mis tíos, Ing. Eric Sosa Chicatti, Ing. Fabia I. Revuelta de Sosa y Sra. Rosa del C. Sosa Luis.

Por todo su apoyo brindado para conmigo en los momentos oportunos, siempre estaré agradecido.

A mis ahijados y sobrinos.

Por compartir momentos inolvidables.

A mis cuñadas.

Por el aprecio que siempre me demuestran.

A todos mis familiares

Con todo respeto y cariño

A mis amigos de siempre.

Siempre están en mis recuerdos.

A mi novia, Fabia I. Toledo Sosa

Por todo tu amor cariño y apoyo, recuerda que eres el motivo de mi superación. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Ph. D. Francisco Zavala García**, por sus consejos y enseñanzas durante mi etapa final de estudiante, por su apoyo en la realización de mi servicio social y por la confianza y apoyo para la realización y culminación de la presente investigación.

Al **Ph. D. José Luis de la Garza G.**, por sus valiosos consejos transmitidos para la realización y revisión de la presente investigación.

Al **Ing. Carlos Longoria Garza**, por su enseñanzas, sugerencias y asesorías brindadas a través del presente trabajo.

Al **Ph. D. Sergio Rodríguez Herrera**, de el **IMM** de la **UAAAN** y asesor externo de este proyecto por el apoyo y las facilidades brindadas para la obtención de material genético de maíz de dicha institución.

Al **Ing. Nora Esthela García Treviño**, por su amistad, su ayuda y asesoría tanto en campo como en la toma de datos de la presente investigación.

Al **Ing. Mc. Jesús Andrés Pedroza Flores**, por su valiosa asesoría y ayuda para la realización del presente trabajo a nivel de campo y en la formación del escrito, además de su amistad y apoyo.

A todos los compañeros que laboran en el **Proyecto de Mejoramiento de Maíz, Frijol y Sorgo de la FAUANL**, en especial al **Ing. José Ibarra, Rogelio Meza, Javier Sanchez y Jorge Luis Rodríguez**.

A los encargados del **Laboratorio de Fitopatología de la FAUANL**, **Ing. Fernando Cabrieles** y la **Ing. Imelda Gpe. Rivas** por su valiosa asistencia y asesoría en manejo del experimento en el laboratorio.

Al **Biólogo M.C. Javier Martínez**, responsable del **laboratorio de Micología Médica** de la **Facultad de Biología de la UANL** por sus valiosas intervenciones y asesoría en el proceso de contéo de esporas de *Aspergillus flavus* de la solución a inocular.

Al **Grupo Maseca**, en especial al **Dr. Miguel Arce Monroy**, **Ing. Manuel J. Rubio Portilla** e **Ing. Humberto Amaya Carreon**, por la atención y realización de las pruebas de cuantificación de Aflatoxinas en sus laboratorios sobre los tratamientos del presente trabajo.

A todos mis **Maestros y Compañeros** , que tuve la oportunidad de convivir y compartir mi etapa de estudiante y de los cuales aprendí algo.

A mi **Institución** a la cual le debo lo que soy como profesionista.

A Todos Gracias.

**LA AGRICULTURA ES LA PROFESIÓN PROPIA DEL SABIO, LA
MÁS ADECUADA AL SENCILLO Y LA OCUPACIÓN MÁS
DIGNA PARA TODO HOMBRE LIBRE.**

Acerón

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xv
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
SUMMARY.....	xx
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Importancia del Maíz en México.....	4
2.1.1. Aspectos históricos de las aflatoxinas.....	4
2.2. <i>Aspergillus flavus</i>	7
2.2.1. Generalidades, clasificación y condiciones ambientales de desarrollo.....	7
2.2.2. Ciclo de vida en el cultivo del maíz.....	8
2.2.3. Proceso de contaminación del maíz en campo.....	10
2.2.3.1. Condiciones ambientales para el desarrollo del hongo.....	11
2.2.4. Estrategias de defensa contra el ataque de <i>A. flavus</i> en campo.....	12
2.2.5. Contaminación del maíz en almacén.....	17
2.2.6. Mejoramiento genético del maíz para obtener resistencia.....	18

	Página
2.2.7. Investigación sobre inoculación artificial en campo para detectar maíces con resistencia a <i>A. flavus</i>	20
2.3. Aflatoxinas.....	21
2.3.1. Definición.....	21
2.3.2. Aspectos generales y características.....	22
2.3.3. Metabolismo de las AFB1.....	24
2.3.4. Factores que intervienen en su producción.....	26
2.3.5. Genes que intervienen el proceso de biosíntesis de aflatoxinas y su procedimiento.....	27
2.3.5.1. Genes involucrados involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas.....	27
2.3.5.2. Biosíntesis de aflatoxinas y sustancias propulsoras.	28
2.3.6. Toxicidad, mecanismo de acción y concentración de aflatoxinas en los organismos.....	31
2.4. Detección y Cuantificación de las Aflatoxinas.....	36
2.4.1. Aspectos generales.....	36
2.4.2. Métodos para la detección y cuantificación de aflatoxinas.....	38
2.4.2.1. Método no analítico.....	40
2.4.2.2. Método analítico.....	40
2.4.2.2.1. Método presuntivo.....	40
2.4.2.2.2. Método confirmativo.....	41

	Página
III. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1. Ubicación del Experimento.....	51
3.2. Materiales.....	54
3.2.1. Material biológico.....	54
3.2.1.1. Material genético de maíz.....	54
3.2.1.2. Cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	56
3.2.2. Material de campo.....	56
3.2.3. Material de laboratorio.....	60
3.3. Metodología.....	60
3.3.1. Desarrollo del experimento.....	61
3.3.2. Conteo de esporas para definir la solución a inocular.....	63
3.4. Variables Medidas.....	64
3.4.1. Días a floración masculina.....	65
3.4.2. Días a floración femenina.....	65
3.4.3. Rendimiento de grano por parcela.....	65
3.4.4. Porcentaje de granos de maíz infectados por <i>A. flavus</i>	65
3.4.5. Contenido de aflatoxinas en granos de maíz.....	67
3.5. Análisis Estadísticos.....	67
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1. Días a Floración.....	69
4.1.1. Días a floración masculina.....	69

	Página
4.1.2. Días a floración femenina.....	73
4.2. Rendimiento de Grano por Parcela.....	77
4.3. Porcentaje de Granos de Maíz Infe­ctados por <i>Aspergillus flavus</i>	84
4.4. Contenido de Aflatoxinas en Granos de Maíz.....	89
V. CONCLUSIONES.....	95
VI. LITERATURA CITADA.....	97
VII. APÉNDICE.....	102

INDICE DE CUADRO

	Pagina
Cuadro 1. Propiedades químicas de las aflatoxinas, según Goldblatt (citado por Monárrez, 1994). Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	24
Cuadro 2. Límite de tolerancia de aflatoxinas de acuerdo al tipo de alimento, según la FDA. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	35
Cuadro 3. Datos climatológicos que se presentaron durante el desarrollo del experimento. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	51
Cuadro 4. Datos climatológicos promedio que se presentaron durante la etapa de inoculación artificial en campo de <i>A. flavus</i> en la primera y segunda fecha de siembra. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	53

Cuadro 5.	Propiedades fisicoquímicas del suelo donde se realizó el experimento. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	53
Cuadro 6.	Cuadrados medios del ANAVA para cinco características estudiadas en 12 genotipos de maíz (G) sembrados en dos fechas de siembra (F.S.) y la interacción (G x F.S.). Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	69
Cuadro 7.	Comparación de promedios de días a floración masculina para genotipos (G) e interacción (F.S.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	72
Cuadro 8.	Comparación de promedios de días a floración femenina para genotipos (G) e interacción (F.S.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	75

Cuadro 9.	Comparación de promedios de rendimiento de grano por parcela para genotipos (G) e interacción (F.S.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	80
Cuadro 10.	Comparación de promedios de porcentaje de grano infectados por <i>Aspergillus flavus</i> para genotipos (G) e interacción (F.S.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	86
Cuadro 11	Comparación de promedios de contenido de aflatoxinas en granos para genotipos (G) e interacción (F.S.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	91

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aspergillus flavus</i> . Citado por de la Garza, (1994).....	9
Figura 2. Fórmula de las aflatoxinas. Tomado de Valle (citado por Arroyo, 1995).....	25
Figura 3. Biosíntesis de las aflatoxinas por <i>A. flavus</i> (Díaz, 1994).....	32
Figura 4. Operaciones básicas para la detección y cuantificación de aflatoxinas en productas agrícolas (Montoya, 1996).....	36
Figura 5. Promedio de temperaturas máximas y mínimas registradas durante el desarrollo del experimento. Período del 16 de febrero al 9 de agosto de 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L.....	52
Figura 6. Croquis del experimento, primera fecha de siembra. Ciclo primavera-verano, 1996. Marín, N.L.....	58
Figura 7. Croquis del experimento, segunda fecha de siembra. Ciclo primavera-verano, 1996. Marín, N.L.....	59
Figura 8. Promedio de días a floración masculina en maíz para niveles del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Ciclo primavera-verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	70

Figura 9.	Promedio de días a floración femenina en maíz para niveles del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	73
Figura 10	Promedio de rendimiento de grano en maíz para valores del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	78
Figura 11	Promedio del porcentaje de granos de maíz infectados por <i>Aspergillus flavus</i> para valores del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	84
Figura 12	Promedio de contenido de aflatoxinas en granos de maíz para valores del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	89

INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

	Página
Cuadro 1A. Comparación entre fechas de siembra de los días a floración masculina y femenina de 12 genotipos de maíz, ordenados en forma ascendente. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	103
Cuadro 2A. Sincronía de los días a floración masculina y femenina de los 12 genotipos de maíz, ordenados de acuerdo al rendimiento (de mayor a menor) en dos fechas de siembra. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de <i>A. flavus</i> en dos fechas de siembra.....	104

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la UANL que se encuentra localizado en el km 17.5 de la carretera Zuazua-Marín en el municipio de Marín, N.L., en el ciclo primavera-verano de 1996. Los objetivos del trabajo fueron: a) Observar el comportamiento de los genotipos de maíz en dos fechas de siembra, en base a días a floración masculina, femenina y rendimiento de grano por parcela. b) Verificar si existen condiciones ambientales que favorezcan la presencia e infección de *A. flavus* en el municipio de Marín N.L. c) Obtener información de variación, resistencia o susceptibilidad entre 12 genotipos de maíz a la incidencia del hongo y d) Cuantificar la presencia de aflatoxinas en los genotipos estudiados.

El experimento se estableció bajo un diseño de bloques al azar con dos fechas de siembra y cuatro repeticiones por cada una de ellas. Los tratamientos que se utilizaron fueron: 1). UAAAN-1, 2). UAAAN-2, 3). UAAAN-3, 4). NL-U-127, 5). Pob'30, 6). Ranchero, 7). Pinto Amarillo, 8). Blanco la Purísima, 9). Blanco Hualahuises, 10). H-433, 11). P-3428 y 12). NL-VS-02. Todos los tratamientos fueron inoculados artificialmente en campo con *Aspergillus flavus* a una concentración de 2×10^7 conidias ml^{-1} de solución, 20 días después de iniciado la etapa de jilote por cada genotipo.

Las variables evaluadas durante el experimento fueron: Días a floración masculina, días a floración femenina, rendimiento de grano por parcela, Porcentaje de maíz infectados por *A. flavus* y contenido de aflatoxinas en granos de maíz (ppb).

El análisis de varianza para las variables de días a floración masculina y femenina en las dos fechas de siembra mostraron diferencia significativa entre fechas de siembra, genotipos y la interacción entre ambas, dando como resultados que el genotipo más precoz en las dos fechas de siembra resultó ser UAAAN-1 y el material más tardío fue pinto Amarillo.

Para el caso de rendimiento de grano por parcela el análisis de varianza mostró una significancia entre fechas de siembra y genotipos, no así para la interacción. Los resultados para este caso mostraron que el de mayor rendimiento resultó ser Ranchero en tanto que el de menor rendimiento fue Pinto Amarillo.

Para los caso de porciento de incidencia de *A. flavus* y contenido de **aflatoxinas** en granos el análisis de varianza no mostró ninguna diferencia significativa entre fechas de siembra, genotipos y la interacción.

El porcentaje de incidencia de *A. flavus* sobre los materiales indican según Scott y Zummo (1988) que todos los genotipos resultaron susceptibles al ataque del hongo y el contenido de aflatoxinas en todos los genotipos rebasan los estándares de tolerancia para consumo humano establecidos en México por la Secretaría de Salud y Asistencia.

SUMMARY

The research was conducted at the Facultad de Agronomía experimental station on the 17.5 km highway Zuazua-Marín at Marín, N.L. It was planted at the spring-summer growing cycle of 1996. The main objectives were: 1) To determine the maize genotype behavior in two planting dates based on days to flowering and grain fill, 2) To establish if the environmental conditions promote the infection by *A. flavus* in Marín, N.L. 3) To get information about the reaction of 12 maize genotypes to artificial inoculation with *A. flavus* and 4) To quantify amount of aflatoxins in these 12 genotype.

The experiment was planted using a random complete block design with four replications and two planting dates. The genotypes included in the experiment were: 1). UAAAN-1, 2). UAAAN-2, 3). UAAAN-3, 4). NL-U-127, 5). Pob'30, 6). Ranchero, 7). Pinto Amarillo, 8). Blanco la Purísima, 9). Blanco Hualahuises, 10). H-433, 11). P-3428 y 12). NL-VS-02. All of them were artificial inoculated in the field with *A. flavus* using a solution with 2×10^7 conidia ml⁻¹. The inoculation was made 20 days after silking stage.

The following traits were measured during the experiment: Days to male flowering, day to female flowering, grain yield per plot, percentage of kernel infection by *A. flavus*, and concentration of aflatoxins in maize kernels.

The analysis of variance showed high significant differences for male and female days to flowering for genotype, planting date and the interaction. The earliest genotype in the two planting dates was UAAAN-1 and the latest genotype was Pinto Amarillo.

For grain yield the analysis of variance showed high significant differences only for genotypes and planting date. The data show the genotype with highest yield was Ranchero and Pinto Amarillo with the lowest.

For kernel infection with *A. flavus* and concentration of aflatoxins, the analysis of variance did not show significant differences among genotype, planting date and the interaction.

According to Scott and Zummo (1988) the percentage of *A. flavus* in the genotypes all of them were classified as susceptible; the amount of aflatoxins on the grain indicated that it is not suitable for food since they overpass the tolerance standard values established by the department of Health in México.

I. INTRODUCCIÓN

De los cultivos con mayor importancia económica a nivel mundial se encuentran los granos básicos; dentro de esta clasificación, el maíz es uno de los cultivos con mayor superficie sembrada. En México, el área destinada anualmente para este cultivo es de alrededor de 9 millones de hectáreas, debido a que es el alimento básico de la dieta de los mexicanos. Por lo anterior, es de vital importancia estudiar la acción de los diferentes factores que reducen la cantidad y calidad de las cosechas de este cultivo; con el fin de proponer alternativas de producción que permitan minimizar el efecto adverso de tales factores y así poder cubrir en la medida de lo posible, la demanda nacional de este grano.

Uno de los factores a los que se enfrentan los productores y por el cual se ve mermada la cantidad y calidad del grano de maíz producido, es la presencia del hongo *Aspergillus flavus*, el cual, al estar en contacto directo con los granos del elote, produce una toxina conocida con el nombre de **aflatoxina**. Estas **aflatoxinas** cuando se encuentran concentradas en los granos de maíz o en cualquier producto alimenticio que el hombre y los animales domésticos consumen, produce cáncer hepático y posteriormente la muerte si el daño es severo.

Es por eso, que las autoridades de salud, exigen que en los centros de acopio del grano se lleve a cabo análisis de detección de **aflatoxinas**, recomendando que la presencia de éstas no exceda de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de producto (ppb) en granos para consumo humano (Villarreal, 1992).

Hasta hace algunos años este hongo era encontrado con facilidad en graneros, almacenes o en lugares cerrados, considerándose a estos espacios de alto riesgo para la contaminación. Sin embargo, en las últimas tres décadas se han encontrado evidencias de contaminación de los granos de maíz en campo.

En Estados Unidos, este tipo de contaminación fue reportada por primera vez en la literatura en 1975 (Reyes, 1994). En México, una de las regiones más importantes productoras de maíz, es el norte de Tamaulipas, ahí se ha detectado la presencia de *Aspergillus* sp. desde 1980 e incrementándose el problema de contaminación en los 90's. Esta región se ha visto seriamente afectada por la presencia de dicho hongo y las pérdidas tanto materiales como económicas han sido grandes.

En el estado de Nuevo León, en agosto de 1995 se detectó un cargamento de 9 mil toneladas de maíz procedente de Anáhuac contaminado con *Aspergillus* y con presencia de aflatoxinas, el cual, representó el 65% de la cosecha total del grano en ese municipio.

De acuerdo con lo antes señalado, instituciones como INIFAP* de Río Bravo, Tamp. Méx. y otras como la UANL**, han desarrollado investigaciones que permiten conocer mejor el problema. Entre estos trabajos se encuentra la evaluación del comportamiento del hongo sobre material genético de maíz, a través de la inoculación artificial a nivel de campo, como es el caso del presente trabajo.

* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. ** Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por lo anterior, se planteó un experimento que consistió en establecer 12 genotipos de maíz en dos fechas de siembra en Marín, N.L. e inocularlos artificialmente con cepas de *Aspergillus flavus*. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) Observar el comportamiento agronómico de los genotipos de maíz en dos fechas de siembra, en base a días a floración masculina, femenina y rendimiento de grano por parcela. b) Verificar si existen condiciones ambientales que favorezcan la presencia e infección de *A. flavus* en el municipio de Marín N.L. c) Obtener información de variación, resistencia o susceptibilidad entre 12 genotipos de maíz a la incidencia del hongo y d) Cuantificar la presencia de **aflatoxinas** en los genotipos estudiados.

De acuerdo a los objetivos se definieron las siguientes hipótesis:

El comportamiento de los genotipos en base a días a floración masculina y femenina y rendimiento de granos es afectado por variaciones en el ambiente, las cuales se manifestaran al sembrarlos en diferentes fechas.

La variación de las condiciones ambientales en las fechas de siembra, producen variación en el nivel de incidencia de *A. flavus* y la síntesis de **aflatoxinas**.

Existe variación entre genotipos en el grado de resistencia o susceptibilidad a la incidencia de *A. flavus* y la cantidad de **aflatoxinas** presentes en los granos de maíz.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del Maíz en México

El cultivo del maíz en México es de gran importancia social, económica y cultural debido a la gran diversidad de usos que éste tiene; desde la producción de tortillas que forma parte esencial de la dieta alimenticia, hasta la producción de aceite comestible y forraje, entre otras cosas.

SAGAR (1996) indicó que en nuestro país, la superficie sembrada de este cultivo en 1995 fue de 9;079,636 ha de las cuales 8;020,392 fueron cosechadas. De estas, el 88% fue de temporal con aproximadamente un 76% de la producción. Así mismo, mencionó que en Tamaulipas, se tuvo una superficie sembrada de 419,807 ha con una superficie cosechada de 365,679 ha y un rendimiento promedio de 2.2 ton ha⁻¹.

En Nuevo León, en el mismo año, la superficie sembrada fue de 100,291 ha y se cosecharon solamente 31,510 ha, con un rendimiento promedio de 1.7 ton ha⁻¹. Las principales zonas de cultivo en el estado se localizan en los municipios de Anáhuac, Apodaca, Galeana y Montemorelos (INEGI, 1996).

2.1.1. Aspectos históricos de las aflatoxinas

Acosta (1994) señaló que en el estado de Texas, existen reportes de maíz infectados con *A. flavus* desde el año 1920. Debido a que las aflatoxinas aún no se conocían, se interpretaba el reporte como pudrición de mazorcas.

Reyes *et al.* (1991) señalaron que en 1960 en Inglaterra, 100,000 pavitos fueron atacados por una enfermedad. La muerte de éstos fue asociada con diferentes lotes de alimentos y estos tenían un ingrediente en común, harina de cacahuete brasileño. De ahí, se realizó una investigación la que tuvo como conclusión que la muerte de las aves fue causada por una sustancia producida por el hongo *A. flavus*. Este hongo, hasta hace poco tiempo, era considerado como un problema de almacén; sin embargo, en los últimos años se han encontrado en el campo maíces contaminados por el hongo. La presencia del hongo y los problemas de las **aflatoxinas** en campo fue reportada por primera vez en la literatura científica en 1975.

Además, los mismos autores (Reyes *et al.*, 1991) mencionaron que en México, en especial el norte de Tamaulipas, se había detectado la presencia de *Aspergillus* de forma esporádica desde 1980 hasta 1988. Sin embargo, en los siguientes dos años, la producción de maíz se afectó severamente por la presencia del hongo como consecuencia de las condiciones ambientales que se presentaron en esos años. En 1989 se sembraron 150 mil ha de maíz, de las cuales se cosecharon 440 mil toneladas, donde el 100% estuvo contaminado. En 1990 se cosecharon 500 mil toneladas en la misma superficie del año anterior, obteniéndose el 92% de infección por **aflatoxinas**. Para el siguiente año, la superficie de siembra disminuyó a 80,000 ha reduciéndose la contaminación a un 23%; esta reducción se atribuyó a que el INIFAP de Río Bravo desarrolló un paquete tecnológico con la finalidad de disminuir los riesgos de contaminación por *A. flavus*.

En los años de 1992 al 94, en esta misma región, la aplicación por los productores del paquete tecnológico que consiste en emplear variedades de maíz más rendidoras y un mejor manejo agronómico del cultivo, aunado con condiciones ambientales (temperaturas nocturnas inferiores a los 22 °C) óptimas para el cultivo y no para el hongo, favorecieron mejores cosechas (Rodríguez *et al.*, 1995). Sin embargo, las condiciones climáticas y fitosanitarias impiden que la producción regional sean estables o predecibles año con año.

En Nuevo León, trabajos efectuados en la Facultad de Agronomía de la UANL indica que la presencia del hongo *A. flavus* y la producción de **aflatoxinas** esta reportada desde 1976. En este año, estudios realizados encontraron la presencia de dicha toxina en alimentos balanceados para puercos y conejos en el área metropolitana de Monterrey, con concentraciones de 220 ppb en promedio (Aguirre, 1976). Por otro lado, la investigación de contenido de **aflatoxinas** en granos de maíz y sorgo en la misma institución empezó en 1978, cuando fueron analizadas 12 muestras de maíz y 3 de sorgo almacenadas en el área metropolitana de Monterrey, encontrando en ellas concentraciones de 6 hasta 123 ppb (Loredo, 1978). En septiembre del mismo año se determinó el contenido de **aflatoxinas** en 25 colectas de maíz almacenados en el Proyecto de Mejoramiento de Maíz, Frijol y Sorgo de la FAUANL, en el municipio de Marín N.L. encontrándose concentraciones de 10 ppb (Mora, 1978).

En Nuevo León, el primer registro de contaminación en campo fue en 1995. CONASUPO captó cerca de 9 mil toneladas de maíz contaminado con **aflatoxinas**, lo cual representó el 65% de la producción maicera del municipio de Anáhuac (El Norte, 1995).

2.2. *Aspergillus flavus*

2.2.1. Generalidades, clasificación y condiciones ambientales de desarrollo

Los hongos son organismos, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y de tejidos conductores. La mayoría de las 100,000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen (Villarreal, 1992).

La mayoría de los hongos se encuentran constituidos por estructuras tubulares que se denominan hifas; los cuales, en algunas especies se mantienen simples, formando lo que se conocen como micelios y en otros se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad como las que son llamados cetas u hongos superiores. Se reproducen principalmente mediante esporas, que son estructuras reproductoras o especializadas para la propagación del hongo, que constan de una o varias células; estas estructuras pueden formarse, sexual o asexualmente (Monárrez, 1994).

La clasificación taxonómica del *A. flavus* según Alexopoulos *et al.* (citados por De la Garza, 1994) es:

Superreino: Eukaryonta
Reino: Myceteae (fungi)
División: Amastigomycota
Subdivisión: Ascomycotina
Clase: Ascomycetes
Orden: Eurotiales
Familia: Eurotiaceae
Género: *Aspergillus*

Las condiciones de humedad relativa requeridas por el hongo para su crecimiento es de 85 %, equivalente a un contenido de humedad en el grano de maíz de entre 16.5 y 18 %. El intervalo de temperatura óptima para el desarrollo del hongo es de 36 a 38 °C y para la producción de **aflatoxinas** está entre los 25 y 35 °C. Deja de existir producción de **aflatoxinas** a temperaturas menores a 10 °C y mayores a 45 °C. El tiempo requerido para la producción de **aflatoxinas** varía desde unas cuantas horas hasta unos cuantos días, dependiendo de las condiciones de temperaturas y humedad que se presenten (Moreno y Gil, citados por Monárrez, 1994).

2.2.2. Ciclo de vida en el cultivo de maíz

El inóculo principal o inicial de *A. flavus* procede de propágulos en el suelo, micelios que invernán en los residuos vegetales y basura en suelo, insectos o esclerocios en el suelo. Otra forma más de contaminación primaria pueden ser los esclerocios de *A. flavus* que se desarrollan en granos dañados o sanos del maíz (Figura 1).

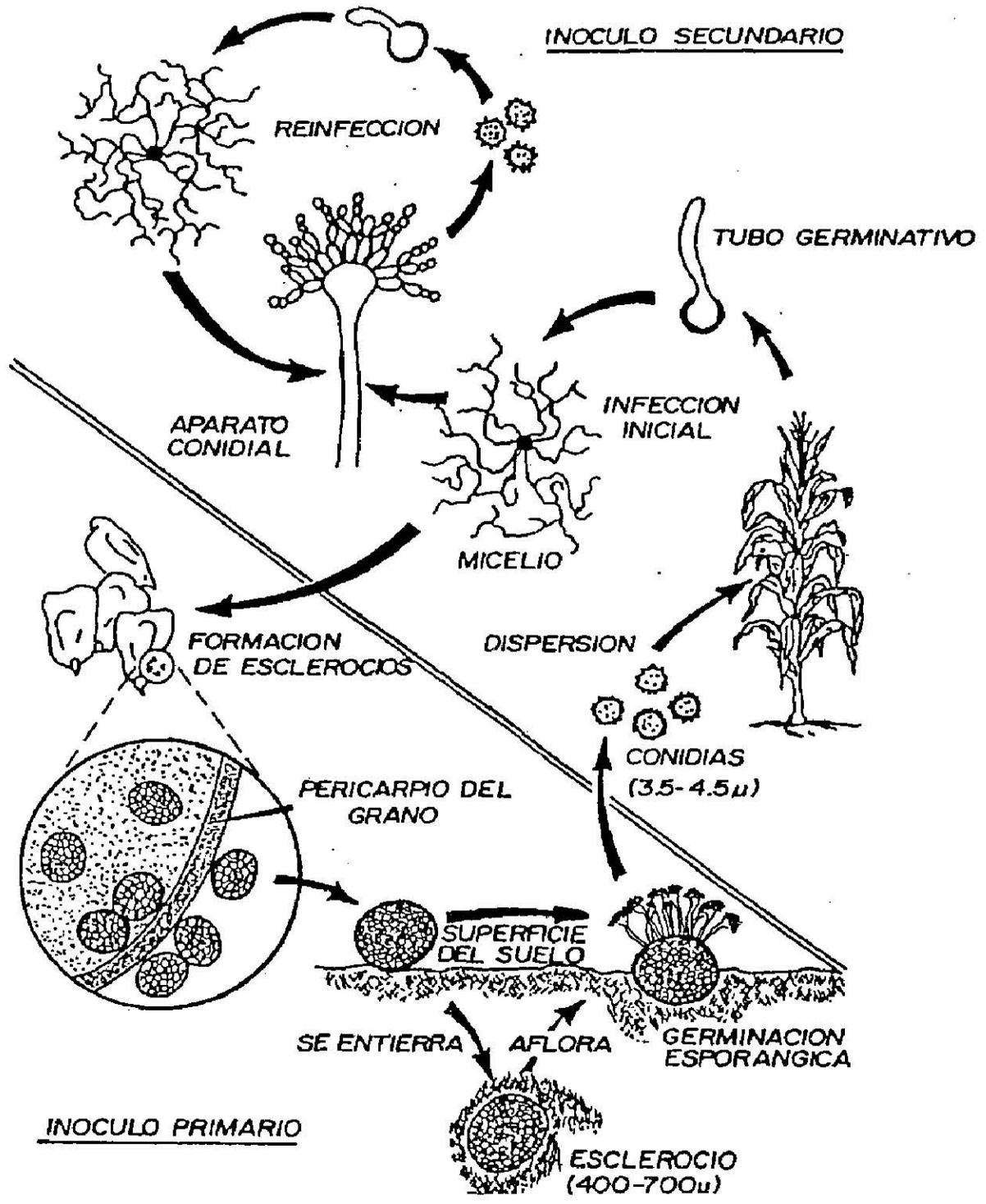


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus flavus*. Citado por de la Garza, (1994)

2.2.3. Proceso de contaminación del maíz en campo

La contaminación en el grano se efectúa a través de los estigmas en un tiempo aproximado de 20 días después de la polinización, justo cuando el grano está en desarrollo (Rodríguez, 1994); Dunlap (1994) mencionó que en condiciones naturales, se ha observado que los estigmas con coloración amarillo-café, son más susceptibles a ser colonizados por *A. flavus*, a diferencia de los estigmas jóvenes o viejos que son menos susceptibles a ser contaminados.

El mismo autor además sugirió que las hifas del hongo penetran al grano, donde el pericarpio funge como protección o barrera para impedir cualquier forma de contaminación, si este está dañado o es delgado, será más susceptible para ser colonizado por el hongo. Por esta razón, los maíces híbridos con pericarpio delgado son más susceptibles a la contaminación, ya que ofrecen menor resistencia al ataque del hongo.

Otra forma de contaminación de los granos de maíz en campo es por el daño del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), que destruye las hojas que cubren el elote dejándolos al descubierto. El hongo si se encuentra suspendido en el ambiente o es arrastrado por el gusano, le será fácil llegar a su destino. Los pájaros también dañan a la mazorca destruyendo sus cubiertas, favoreciendo con esto, la posibilidad para que el hongo penetre a los granos.

Rodríguez (1994) mencionó que el estrés de la planta producido por las condiciones climatológicas, aceleran la disposición del grano a ser contaminado por *A. flavus* y ser capaz de producir **aflatoxinas**; por otro lado, los beneficios del riego en el cultivo repercuten positivamente en las concentraciones de **aflatoxinas** y por ende menor grado de infección de *A. flavus*.

2.2.3.1. Condiciones ambientales para el desarrollo del hongo

Temperatura

Temperaturas nocturnas de 21 °C y de 32 °C temperaturas diurnas, aumentan las probabilidades de contaminación producida por *A. flavus*. Este tipo de contaminación se observa más frecuente en el sur de Texas y el noreste de México. En estos lugares, cada año en los meses de junio y julio, las temperaturas y humedad son factores limitantes para el buen desarrollo del maíz y óptimas para la presencia y desarrollo del hongo (Dunlap, 1994).

Humedad

La síntesis de **aflatoxinas** ocurre entre el 17 y 30% de humedad en el grano, aunque frecuentemente ocurre entre los 17 y 21%. Una humedad relativa por encima de 90% en el elote, beneficia al hongo a la colonización de los cabellos del elote, así como la síntesis de **aflatoxinas** en los granos infectados. La humedad del suelo también se relaciona con el ataque de *A. flavus*; ya que, de presentarse una sequía total o parcial en el cultivo, provocará

un estrés en las plantas disminuyendo sus facultades y dando una mayor posibilidad al ataque del hongo (Dunlap, 1994).

2.2.4. Estrategias de defensa contra el ataque de *A. flavus* en campo

Una buena estrategia para evitar la infección de *A. flavus* es minimizar períodos críticos de la planta como son el estrés por humedad y temperatura, principalmente durante la época de floración y llenado de grano. Las prácticas culturales que se deben tomar en consideración para reducir la contaminación de *A. flavus* en campo son: La preparación y fertilización del terreno, uso de variedades adaptadas y con buena sanidad de la mazorca, fecha de siembra apropiada, control de plagas en la mazorca, riegos, densidad de población, época y método de cosecha (Lillehoj *et al.*, citados por Rodríguez *et al.*, 1995), que son aplicadas en el paquete tecnológico propuesto por INIFAP (Río Bravo) y aprobada por SAGAR.

Preparación del terreno

Macías (1992) mencionó que previo a la siembra, es recomendable la limpieza del terreno que consiste en deshierbar, juntar y quemar los desechos anteriores de cosecha, arar a una profundidad de 25 a 30 cm, rastrear para destruir terrones que impidan una buena distribución de los riegos y que puedan ser focos de infección de plagas y fuente de inóculo primario de *A. flavus*; y por último, una nivelación del terreno que ayudará a una buena distribución de los riegos que se efectúen en el cultivo.

Elección de las variedades

A la fecha no se han encontrado variedades de maíz resistentes al ataque de *A. flavus* y por consiguiente libres de **aflatoxinas**. Sin embargo, para minimizar los riesgos de contaminación con **aflatoxinas** en maíz, Reyes (1994) y Rodríguez (1994) señalaron que algunas de las características que deben presentar las variedades a seleccionar además de adaptación a las condiciones ambientales de la región, manejo y altos rendimientos del cultivo son: a) cobertura total de la mazorca, b) pericarpio o cubierta del grano gruesa, c) granos duros y d) tolerancia a plagas de la mazorca.

Fecha de siembra

Escoger la fecha de siembra que favorezca el buen desarrollo del cultivo, además que las altas temperaturas asociadas con la sequía no se presenten en la etapa de floración y llenado de grano son prácticas de cultivo que pueden reducir la infección por el hongo. En el norte de Tamaulipas, se observa que las fechas de siembra después del 15 de febrero tienen un riesgo mayor de contaminación por el hongo en comparación con los cultivos sembrados en el periodo del 20 de enero al 15 de febrero. Las siembras de maíz tardías, están expuestas con mayor probabilidad a las altas temperaturas, castigándolas y favoreciendo además el desarrollo del hongo, la síntesis de **aflatoxinas**, la incidencia de plagas y otras enfermedades que causan un incremento en el estrés de la planta, en comparación con los maíces sembrados en fechas tempranas (Rodríguez *et al.*, 1995).

En monitoreos efectuados en la región norte de Tamaulipas durante 1991, se encontró que la fecha de siembra recomendada, disminuía el daño y la contaminación de **aflatoxinas** hasta en un 500% en comparación con los maíces sembrados después del 15 de febrero (Rodríguez *et al.*, 1995).

Fertilización

Se ha determinado que un estrés por sequía, junto con un bajo aprovechamiento de nitrógeno por la planta aumenta el estrés fisiológico, y por consecuencia hay un mayor grado de susceptibilidad a las **aflatoxinas**.

Macías (1992) recomendó una buena y adecuada fertilización del cultivo (N, P, K y elementos menores) con buena humedad para permitir a las plantas una asimilación mejor. Una dosis de 140-40-00 para suelos de primera y 120-40-00 en suelos de segunda, se uso en el norte de Tamaulipas.

Irrigación

Rodríguez *et al.* (1995) recomendaron un buen manejo de los riegos de auxilio ya que ayuda al cultivo a reducir los riesgos de ataque por *A. flavus*, principalmente en la época de polinización y llenado de grano. Esta condición se asocia con factores de densidad de población y fertilización. Para el norte de Tamaulipas, se sugiere la aplicación de tres riegos

de auxilio para satisfacer la demanda hídrica del cultivo en tres etapas distintas de desarrollo y que son: vegetativa (6 a 7 hojas), espigamiento y llenado de grano.

Densidad de población

Una alternativa más para reducir riesgos al ataque de *A. flavus* en el maíz es la densidad de población, que consiste en modificar el número de plantas por metro y un ajuste en la distancia entre surcos. La justificación para el uso de este factor es la relación que existe entre el agua, nutrientes y la planta. A mayor número de plantas, la demanda de agua y nutrientes se incrementa por lo tanto la probabilidad de estrés y la infección del hongo también se incrementa. Rodríguez *et al.* (1995) mencionaron que una densidad óptima recomendada en el norte de Tamaulipas es de 55 mil plantas por hectárea, en combinación con un adecuado manejo agronómico en el cultivo.

Época y métodos de cosecha

Para este factor se recomienda cosechar antes de lo programado, a una mayor humedad de lo recomendado en el grano (28%), aumenta el peligro de ser contaminado con **aflatoxinas**, pero se deben tomar medidas al momento de almacenar el producto, ya que debe secarse y guardarse con una humedad de grano del 13 % y así evitar problemas en almacén. En lo que respecta a la máquina cosechadora, debe modificarse en velocidad para que el grano no sea dañado o quebrado y mantenerlo libre de impurezas. Si se sospecha de infección, se recomienda no cosechar mazorcas caídas que no fueron colectadas por la maquinaria y no mezclarlas con el resto del grano. También se sugiere la entrega rápida de

la cosecha, ya que durante el transporte corre peligro de contaminación. Como se mencionó, previo al momento de almacenar el producto, se debe reducir hasta un 13% de humedad del grano y posteriormente almacenarlo. Se sugiere el manejo de los lotes sanos y contaminados de forma separada, para que no exista riesgo de contaminar toda la producción (Macías, 1992).

Plagas de la mazorca

Rodríguez (1994) señaló que diversos estudios han demostrado que la infección de *A. flavus* y la presencia de **aflatoxinas** en maíz, puede ocurrir en ausencia de insectos durante el desarrollo de la mazorca, es decir que estos no son indispensables para que la contaminación del grano se lleve a cabo. Sin embargo, Rodríguez *et al.* (1995) señalaron que la presencia de plagas incrementan considerablemente la posibilidad de contaminación al actuar como vectores del hongo, y/o facilitar su penetración al provocar heridas a la cubierta y granos del elote. Estos mismos autores, citaron que los insectos más comunes que dañan los elotes son: El gusano elotero (*Heliothis zea*), el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y los gusanos barrenadores como el barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*), *Diatraea lineolata* y *D. saccharalis*.

La forma de minimizar riesgos de contaminación por este factor, es a través de la aplicación de prácticas culturales que permitan el control de las plagas de la mazorca antes de que estas penetren en ella. Algunas prácticas culturales que se pueden emplear para tal

fin son: a) uso de insecticidas, b) uso de trampas con atrayentes y c) variedades con cobertura completa de la mazorca.

2.2.5. Contaminación del maíz en almacén

Reyes (1994) mencionó que el hongo *A. flavus*, al principio se le consideró como un problema de almacén, esto por los numerosos casos de infección que se tenían reportados.

De la Garza (1996) señaló que este hongo tiene diferentes índices de crecimiento los cuales varían con el contenido de humedad en el grano, siendo el óptimo en maíz alrededor de 18.5%, nivel en el cual se presenta el más rápido crecimiento. Así mismo, indicó que una forma normal de control de *A. flavus* en los granos de maíz, es almacenarlos con un contenido de humedad del 13%, evitar la mezcla de granos con distinto contenido de humedad, verificar que el grano esté almacenado en espacios con buena ventilación e impedir que se presenten cambios bruscos de contenido de humedad y temperatura. Además, propone una temperatura de almacenamiento entre 5 y 10 °C, para evitar con ello, la presencia de insectos, ácaros y reducir al mínimo la actividad del hongo. También sugiere, evitar almacenar granos con daño físico producido por insectos, por la cosechadora o por mal manejo del grano en el transporte y almacenaje, con el fin de no favorecer la contaminación del lote por cambios de temperatura y humedad. En períodos cortos de almacenaje, pueden tolerarse contenidos de humedad y temperaturas ligeramente mayor a los recomendados; de no ser así, se deberán seguir las indicaciones mencionadas.

Para disminuir el problema, sugiere el uso de fungicidas para el control del hongo en el almacén aunque esto puede representar un costo extra para el productor. Fungicidas como el captan, clorotalonil, carbendazín-M y captafol, han protegido al grano de maíz del ataque del hongo hasta por 120 días de almacenamiento en condiciones óptimas. Otra forma de control es la utilización de ácidos orgánicos como el propiónico mezclado con ácido acético y fórmico los cuales resultan eficientes para el control del hongo. Se recomienda también la utilización de amoníaco que es menos efectivo que los ácidos orgánicos, aunque al aplicarlo tiene la facultad de inactivar a la **aflatoxinas**. (De la Garza, 1996).

2.2.6. Mejoramiento genético en maíz para obtener resistencia

Otras medidas que pueden ser tomadas como herramientas para reducir el riesgo de infección por *A. flavus* y la producción de **aflatoxinas**, son el mejoramiento genético para la resistencia al ataque de *A. flavus* y a la producción de **aflatoxinas** en maíz.

Reyes (1994) señaló que la resistencia genética en maíz a la infección del hongo y a la producción de **aflatoxinas** como forma de control, fue considerada a principios de los años 70's. En las primeras observaciones que se realizaron al respecto y de las que se refería a la contaminación de forma natural, indicaban que el germoplasma existente poseía poco o ninguna resistencia, esto debido a la gran variación existente año a año de localidad a localidad, las técnicas de muestreo y la variación en la cantidad y calidad del inóculo. Debido a esto, hubo necesidad de mejorar las técnicas y método de inoculación artificial, encontrándose que el uso de un cepillo y una jeringa reportaban mejores resultados.

Hoy en día, se han encontrado características genéticas que pueden ser controladas y que ayuden a reducir el problema de infección por *A. flavus* y son:

1. Resistencia del grano a la infección de *Aspergillus*, lo cual pueda deberse a factores físicos, químicos o ambos.
2. Ausencia de **aflatoxinas** en el grano después de la infección.
3. Retraso de la senectud del jilote después de la polinización.
4. Buena cobertura de la mazorca.
5. Resistencia de la planta a daños por insectos.
6. Resistencia de la planta a temperaturas altas y sequía.

Es importante resaltar que los dos primeros puntos son complicados a la hora de tomar datos en campo, lo que obliga a hacer conteos de granos en forma individual. En los siguientes cuatro puntos la toma de datos se efectúa de forma indirecta con respecto a la resistencia; ya que se ha encontrado que dichos caracteres están ligados con la presencia de *A. flavus* y las **aflatoxinas**.

Otra forma de tratar de reducir el problema de infección, se logra mediante selección del material genético y desarrollando genotipos que presenten mayor grado de resistencia al ataque de *A. flavus*. Posteriormente se evalúan los materiales que resulten menos susceptibles al ataque, haciendo pruebas de concentración de **aflatoxinas** por cada material genético (Scott y Zummo, 1988).

En la investigación también, se hacen pruebas "in vitro" de resistencia a *Aspergillus* sometiendo las semillas a infección, posteriormente se evalúan en campo las más resistentes y sembrándolas con semilla remanente. Por otra parte, algunos investigadores inoculan semillas con *Aspergillus* en laboratorio para posteriormente dejarlas germinar en un período de dos o tres semanas, haciendo un conteo de germinación y sembrando las que resulten sobrevivientes del proceso (Reyes, 1994).

En forma generalizada, se determina o se justifica hacer una selección de los materiales resistentes al ataque de *Aspergillus* y/o a la contaminación de **aflatoxinas**, ya que en ellos se encuentra suficiente variabilidad genética. Todos los métodos de mejoramiento antes mencionados no son muy precisos, ya que se encuentran resultados contradictorios por factores como localidad y años, lo que imposibilita hacer cualquier tipo de sugerencia del uso de alguna variedad o híbrido que posea resistencia a **aflatoxinas**.

2.2.7. Investigaciones sobre inoculación artificial en campo para detectar maíces con resistencia a *A. flavus*

Scott y Zummo (1988), realizaron una serie de investigaciones con el objetivo de identificar líneas consanguíneas (endogámicas) de maíz con resistencia al ataque de *A. flavus*. Se emplearon tres diferentes métodos de inoculación artificial en campo, en la primera se uso el **pinbar** (barra de agujas); se evaluó el porcentaje de granos infectados internamente por el hongo *A. flavus*, encontrándose variación en la infestación que fluctuó entre líneas del 6 a 30% en un período de dos años. Enseguida fueron analizadas cinco

líneas que fueron seleccionadas como resistentes y cinco como líneas susceptibles usando como metodología las técnicas de inoculación de barra de punta (aguja) y la barra de dos agujas, encontrando que la barra de aguja dio el nivel más alto de infección del grano de maíz. Se observó que las técnicas de inoculación empleadas mostraron que los dos grupos de líneas consanguíneas diferenciaron significativamente una de la otra.

En un análisis de 50 líneas inoculadas mediante la técnica de barra de punta, mostró que el porcentaje de infección por *A. flavus* fue del 4-62 %. Las líneas que resultaron resistentes (Mp 313 E, SC54 y Mo18W) y susceptibles (T202, T216 y SC212 M) promediaron de un 10 y 44% de granos infectados, respectivamente.

2.3. Aflatoxinas

2.3.1. Definición

La **aflatoxina** es una micotoxina, se define como el desecho metabólico que secreta el hongo del género *Aspergillus* y de la especie *flavus*. La palabra se acuñó en 1961 y se forma con la inicial A de *Aspergillus* y de la sílaba Fla de *flavus* y de la palabra toxina de sustancia tóxica (Acosta, 1994).

Ashworth (citado por Macías, 1992) definió a las **aflatoxinas** como sustancias químicas, producto del metabolismo del hongo *A. flavus* que secretan al sustrato que colonizan y que producen contaminación al grano de maíz y a otros cultivos.

También se define a las **aflatoxinas** como metabolitos secundarios de los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomiuos*. Químicamente corresponden a las bis-dihidrofuranocumarinas y son los cancerígenos biológicos más potentes que se conocen (Arroyo, 1995).

Las micotoxinas son compuestos químicos que producen los hongos durante su crecimiento en sustratos orgánicos como cereales, oleaginosas, productos lácteos y cárnicos entre otros alimentos; estas sustancias producen efectos tóxicos, para el que las consume en alimentos contaminados. Por su importancia y efecto negativo, las **aflatoxinas** son las micotoxinas más conocidas y estudiadas (Rodríguez *et al.*, 1995).

2.3.2. Aspectos generales y características

Arroyo (1995) señaló en base a la información de diversos autores, que la presencia de **aflatoxinas** en productos alimenticios se mide en concentraciones de partes por billón (microgramos de aflatoxina por kilogramo de producto). Las **aflatoxinas** en general, resisten temperaturas de 260 hasta 320 °C, lo cual hace difícil su eliminación a través de cocción, frituración y pasteurización de alimentos contaminados. Son fluorescentes a la luz ultravioleta y según la coloración que denote recibe el nombre de **aflatoxinas B** si ésta es de color azul y **G** si la coloración es verde. Existen seis tipos de **aflatoxinas** principales producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* y son:

- B1 Con coloración azul y el N°1 indica que es la que más rápido viaja en el análisis cromatográfico de capa fina.
- B2 De color azul y el N°2 indica que es menos rápida que el corrido en el cromatograma de capa fina que la B1. Es 10 veces menos mutagénica que la anterior, aunque ésta sea una derivación de ella.
- G1 Coloración verde, también de derivación de la B1, con anillos de 5 carbonos.
- G2 Con fluorescencia de color verde, el N°2 indica que la velocidad de desplazamiento en el cromatograma es más lenta que la G1.
- M1 Es un derivado hidroxilado de la B1, se encuentra en la leche (milk).
- M2 Es derivado de la M1 y el N°2 indica que corre más lento en el cromatograma que la M1.

La **aflatoxina B1 (AFB1)** es la más importante desde el punto de vista toxicológico y químico, ya que es la precursora de los restantes tipos de **aflatoxinas** y la más comúnmente encontrada en los alimentos. Presenta entre sus propiedades físicas, una fluorescencia azul intensa al ser expuesta por luz ultravioleta convencional de longitud de onda larga (350 nm) con tres picos máximos de absorción en 223, 265 y 362 nm, ligeramente soluble en agua y en muchos otros solventes orgánicos de polaridad intermedia, como son el metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y cloroformo. Es extraída de los granos de maíces contaminados utilizando cloroformo-metanol o acetona acuosa al 70%. Se desnaturaliza con hipoclorito de sodio, por lo cual se recomienda este producto, para descontaminar material de laboratorio. Su descomposición sin evaporarse se lleva a cabo a una temperatura de 270 °C (Arroyo, 1995).

Goldblatt (citado por Monárrez, 1994) determinó las propiedades químicas más importantes de los seis grupos principales de **aflatoxinas** (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Propiedades químicas de las aflatoxinas, según Goldblatt (citado por Monárrez, 1994). Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Aflatoxina	Formula Empírica	Peso Molecular	T° de Descomp. °c	dl ₅₀ ² ug *
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12-50
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	85
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244-246	39
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	172
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	17
M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	62

* Pavitos de un día de nacido.

La fórmula estructural de los primeros cinco tipos de **aflatoxinas** ya mencionados en el cuadro se muestra en la Figura 2.

2.3.3. Metabolismo de la AFB1

Las **aflatoxinas** por si solas no representan peligro, ya que deben sufrir una activación metabólica para dar paso a la forma carcinogénica 8,9-epóxido de **aflatoxina B1**, que se forma por la acción de oxidación del enlace 8,9 vinil éter de la AFB1 el cual se une en forma covalente con las biomoléculas que a su vez producen aductos de ácidos nucleicos y/o aductos proteicos (Castrellón, 1996).

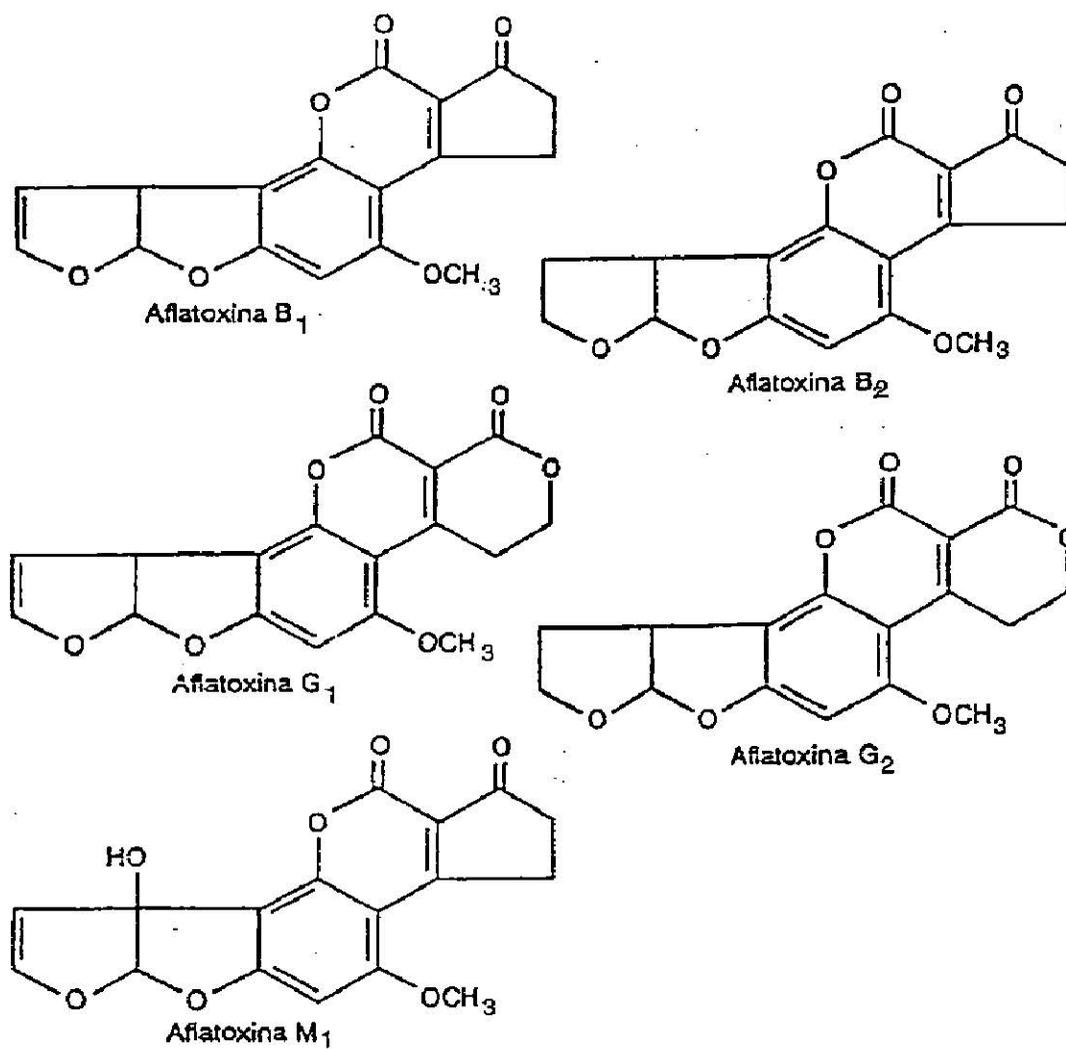


Figura 2. Fórmula química de las aflatoxinas. Tomado de Valle (citado por Arroyo, 1995).

2.3.4. Factores que intervienen en su producción

Para que se dé la producción de **aflatoxinas** debe conjuntarse la presencia de una serie de factores que son:

1. El hongo productor.
2. Lugar disponible con sustrato.
3. Condiciones adecuadas de humedad y temperatura en el ambiente y el sustrato.
4. Condiciones de oxígeno ideales en el lugar de almacenamiento o en el lugar de desarrollo del hongo.
5. Existencia de microflora.
6. Tiempo de almacenamiento.

Es importante señalar el hecho de que la presencia de *Aspergillus* spp. no implica necesariamente la producción de **aflatoxinas** ya que existen cepas con la capacidad de producción de la micotoxina y otras que no, además de requerir los factores ambientales adecuados antes mencionados (Monárrez, 1994).

Por otro lado, Díaz (1994) mencionó tres factores que intervienen en el proceso de contaminación de aflatoxinas y que además de seguir una secuencia lógica son parte de un mecanismo complejo y son: *Aspergillus* spp. + Hospedero + Condiciones ambientales = **Aflatoxinas**.

2.3.5. Genes que intervienen en el proceso de biosíntesis de aflatoxinas y su procedimiento

2.3.5.1. Genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas

Para la solución del problema de contaminación con **aflatoxinas**, es importante conocer estrategias y herramientas que controlan el desarrollo y metabolismo de *Aspergillus* spp. Para lograrlo se requiere conocer la regulación molecular de la formación de **aflatoxinas**, es decir, conocer los pasos biosintéticos.

Díaz (1994) indicó que los genes son portadores de la información genética que especifica la característica de los individuos e influye en sus funciones:

- a) Un proceso de duplicación, que dará un buen número de individuos similares.
- b) Un Proceso de transferencia de información que conduce a la síntesis de enzimas y otras moléculas que intervienen en el metabolismo celular.

En este último caso, para la biosíntesis de **aflatoxinas** es la más importante. Los genes que se encuentran en el núcleo contienen DNA, que mediante mecanismos de transcripción; envían la señal con el RNAm (mensajero) a los ribosomas que se encuentran en el citoplasma. Ya en los ribosomas se efectúa la traducción de información genética mediante un RNAt (transferencia), el cual es traducido en aminoácidos que a su vez forman proteínas y enzimas. Este último es factor determinante para catalizar procesos metabólicos

específicos como el de la biosíntesis de **aflatoxinas**. En estudios recientes con *Aspergillus* spp., se ha demostrado que al menos cuatro genes son responsables de la biosíntesis de **aflatoxinas** y estos son: afl-R, nor-1, ver-1 y omt-1; así como también otros genes homólogos.

2.3.5.2. Biosíntesis de las aflatoxinas y sustancias propulsoras

La síntesis de **aflatoxinas** se efectúa esencialmente en tejidos ricos en lípidos que se encuentran en el embrión y la aleurona. Ya establecido el hongo en estos puntos, puede avanzar hasta llegar al endospermo. La contaminación por **aflatoxinas** en los granos del elote están distribuidos al azar, lo que significa que no todos los granos están contaminados y que un grano sano tiene la capacidad de impedir el acceso al hongo en sus tejidos (Dunlap, 1994).

En observaciones realizadas después de un lapso de 24 hr, *A. flavus* alcanza las condiciones óptimas de temperatura y humedad (27-30 °C, 85% de humedad relativa) para que éste empiece con el proceso de desecho metabólico, esta producción alcanza su máximo hasta el doceavo día para después bajar su rendimiento (Giralt *et al.* citado por Arroyo, 1995).

Steyn (citado por Arroyo, 1995) indicó que la producción de toxinas alcanza su punto máximo en la producción de **aflatoxinas** hasta el quinto día, que es cuando el hongo está en

su fase estacionaria de crecimiento. La disminución en la producción de **aflatoxinas** disminuye del sexto al octavo día.

Para una mejor comprensión de la síntesis de **AFB1** es importante conocer la influencia de algunas sustancias que son sus precursoras. Estas sustancias aparentemente tienen un origen en común que parte de una estructura base de C_{20} poli- β -quetido.

Xantonas

Una xantona la esterigmatocistina, contiene un sistema angular acoplado de bisdihidrofurano. Fue aislada por primera vez del micelio de *Aspergillus versicolor* (Hatsuda y Kuyama, citados por Arroyo, 1995).

Kelton (citado por Arroyo, 1995) comprobó que *A. flavus* produce derivados de esterigmatocistina como lo son la dihidro-O-metil- esterigmatocistina, O-metil-esterigmatocistina y aspertoxina. Se sabe que la esterigmatocistina es 10 veces menos carcinogénica que la **AFB1** en ratas, la esterigmatocistina es el primer compuesto caracterizado que contiene la función bisdihidrofurano.

Polihidroiantraquinosas

La característica especial de estos compuestos es el de ser de un color naranja-rojizo y por corresponder químicamente a 1, 2, 6, 8-tetraoxi-2-alkil antraquinonas (Arroyo, 1995).

La averulina resulta de lo anterior, siendo el primer compuesto natural en ser caracterizado con un sistema de 1,3-benzodioxano en su estructura; aislado a partir de 6, 8-O, O-dimetilnidurifina de *A. versicolor* y fue propuesto como un intermediario, en la biosíntesis de aflatoxinas (Katsube *et al.* y Kington *et al.*, citados por Arroyo, 1995).

El ácido solorínico que proviene de *Solarina crocea*, fue reportado por primera vez en 1937 por Koller y Russ. El ácido norsolorínico, compuesto dimetilado producido también por *A. versicolor*; ha sido propuesto como precursor en la biosíntesis de averufina, además de producir averantina y 1'-O-metilaverantina. El tratamiento ácido de estos dos últimos compuestos resulta en la formación de averitrina, siendo también un metabolito de *A. versicolor* (Arroyo, 1995).

Yao y Hsieh (citados por Arroyo, 1995) observaron que tratando cepas de *A. parasiticus*, con el cloruro de O,O-dimetil-O-(2,2-diclorovinil)fosfato, se observó que la aflatoxigenicidad de la cepa se reducía además de ver un pigmento de color naranja-rojizo llamado acetato de versiconal, que en solventes polares existe como una mezcla de tres isómeros. Si además se trata al compuesto con un ácido mineral diluído, da lugar a la versicolorina C, también en *A. parasiticus* se lograron aislar los metabolitos llamados acetato de versiconol y versiconol.

En el proceso de biosíntesis, intervienen de manera secuencial, cinco compuestos que son: acetato → poliquétido → antraquinonas → xanthonas → aflatoxinas.

En la actualidad se conocen todas las moléculas que intervienen en el proceso, así como la mayoría de las enzimas que intervienen en cada uno de los pasos. El inicio comienza a partir del acetato que posteriormente da lugar a la versicolorina A y B, a cuales dan origen posteriormente a la aflatoxina B1 y B2 respectivamente (Díaz, 1994).

En la Figura 3, se muestra de manera desglosada el proceso de la biosíntesis de **aflatoxinas** en las cuales se mencionan todos los compuestos que intervienen.

2.3.6. Toxicidad, mecanismos de acción y concentración de las aflatoxinas en los organismos

Para el caso del hombre, la ingestión de cantidades mayores de **aflatoxinas** puede provocar la muerte inevitablemente; resultados no menos peligrosos y fatales son cuando éstas son consumidas en pequeñas cantidades provocando síntomas clínicos de cáncer en el hígado.

Moreno (1994) mencionó que este tipo de micotoxinas son las más estudiadas por el hombre, ya que son las sustancias carcinogénicas más potentes que perjudican al hombre y animales domésticos. Naccha (1996) por su parte, consideró a estos metabolitos como carcinogénicos, hepatotóxicos, teratógenos, mutagénicos e inmunosupresores; también, Torres (1996) consideró que el hígado es el principal órgano de ataque.

La **aflatoxina B1** es la más peligrosa y se ha demostrado que con sólo ingerir $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ diariamente puede producir cáncer, siendo excretada en la leche u orina como AF M1 (Valle, citado por Torres, 1996).

Para el caso de los animales domésticos, dicha contaminación también es severa, ya que les produce una sintomatología de daños en el DNA provocando: muerte celular, deformación de los huesos, hígado, fragilidad capilar, impedimento de coagulación, falta de crecimiento, lesiones hepáticas y hemorragias entre otras cosas (Vicam Co., 1996).

Monárrez (1994) mencionó que las **aflatoxinas** que se encuentran en los alimentos y que a la vez son ingeridas por el hombre, son absorbidas en la mucosa intestinal para posteriormente pasar al torrente sanguíneo llegando al: hígado, riñones y sistema nervioso; donde se concentran, hasta producir sus efectos patológicos como lesiones necróticas, tumores y hemorragias.

La FAO*, ha tratado de controlar el problema de micotoxicosis e indica algunas recomendaciones para que la población mundial no sufra con este problema en los alimentos las cuales son:

- a). Prevención del desarrollo de las micotoxinas (prevención de la incidencia de A. flavus y contaminación con aflatoxinas).

* Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

- b). Vigilancia y control de la contaminación por micotoxinas (verificación de la calidad de los productos alimenticios).
- c). Capacitación, información e investigación.

Para lograr el punto a), que es donde la agricultura toma mayor importancia, se recomienda la utilización de prácticas agrícolas que eviten cualquier factor de contaminación en el producto agrícola antes de la cosecha; así como también la utilización de técnicas eficientes de secado, la implementación de instalaciones de almacenamiento adecuadas y un buen manejo en el transporte de los alimentos (Torres, 1996).

Para punto b), la FAO recomienda límites de tolerancia permisibles de **aflatoxinas** en los alimentos, aunque en cada país se toman decisiones diferentes.

Ortíz (citado por Villarreal, 1992) indicó que en la FAO, en el año 1974 fijó límites de tolerancia de **aflatoxinas** en alimentos de consumo humano en un nivel de entre 5 a 20 ppb; sin embargo, Japón exige “cero” $\mu\text{g kg}^{-1}$ en sus estándares de tolerancia en sus productos alimenticios. Por otro lado, en 1988 la Agencia de Alimentos y Medicina de los Estados Unidos (FDA - Food and Drug Administration) para el maíz, da como límites de tolerancia los que aparecen en Cuadro 2.

Cuadro 2. Límite de tolerancia de aflatoxinas de acuerdo al tipo de alimento, según la FDA. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Ppb* (microgramo kg ⁻¹)	U S O S
Hasta 20	Para consumo humano, animales jóvenes, animales lecheros, y usos no determinados.
Hasta 100	Alimentación de animales reproductores de ganado bovino y porcino, o aves adultas.
Hasta 200	Alimentos de cerdos en su etapa final de engorda
Hasta 300	Alimentación de ganado bovino en su etapa final de engorda

* Partes por billón

En México, la S.S.A. y la S.A.G.A.R. establecieron de manera oficial en 1989 como límites máximos de tolerancia de **aflatoxinas** para el maíz del norte de Tamaulipas los siguientes:

De 0 a 20 ppb para consumo humano; hasta 299 ppb para uso forrajero y de 300 a más partes ppb, destrucción del producto (Villarreal, 1992).

La FAO, en América Latina y el Caribe, recomienda límites de tolerancia de 20 ppb de AF totales (B1, B2, G1, G2) en alimentos para humanos, 200 ppb en cereales para alimentos balanceados de bovinos y porcinos de engorda, 0.5 ppb de AFM1 en la leche. Aunque en realidad se estudia la posibilidad de reducir las normas de 20 a 10 ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Torres, 1996).

2.4. Detección y Cuantificación de las Aflatoxinas

2.4.1. Aspectos generales.

El procedimiento que se sigue para la detección de **aflatoxinas** en productos agrícolas es como se indica en la Figura 4.



Figura 4. Operaciones básicas para la detección y cuantificación de aflatoxinas en productos agrícolas (Montoya, 1996).

Es importante tomar en cuenta que la distribución de aflatoxinas en un lote de granos contaminados es totalmente irregular, teniendo como consecuencia demasiada variación en las concentraciones por cada muestra representativa de la cual se toman los análisis (Garza, 1994).

Mientras más grande sea el tamaño de la muestras que se va a analizar, más irregular será la distribución de aflatoxinas; dicho de otra manera en un lote de granos almacenados un porcentaje muy pequeño de estos puede contener un alto nivel de aflatoxinas, por lo que se dificultará obtener la concentración promedio con exactitud.

Para este caso, Garza (1994) sugirió tomar muestras representativas con un tamaño mínimo de 5 kg por cada una y que provengan del muestreo del lote a analizar.

En lo que respecta a la homogeneización, la muestra se considera que esta llegue a su óptimo cuando las partículas del grano son minimizadas o trituradas. De ahí se procede a tomar una submuestra de ésta, dicha submuestra según Montoya (1996) debe tener un peso de 20 a 100 g.

El procedimiento de extracción se utiliza para separar las **aflatoxinas** en la muestra. Por lo general, el procedimiento se lleva a cabo con disolventes orgánicos como son: metanol, acetonitrilo, cloroformo, mezclas de metanol-agua, entre otras. También se emplea la extracción de fase sólida con columnas C18 e inmunoafinidad, este último tiene la

ventaja de ser más selectivo en el componente ya que lo concentra más y eliminan compuestos no deseados en el análisis (Montoya, 1996).

Por otra parte, los procedimientos de: limpieza, concentración, detección y cuantificación de **aflatoxinas** se efectúa de manera directa empleando para ello equipo especializado como pueden ser los cromatógrafos. De este tipo, están la cromatografía de capa fina, cromatografía en minicolumna y cromatografía líquida de alta resolución que proporcionan datos cualitativos y cuantitativos.

Garza (1994) mencionó que para antes de efectuar los análisis, es importante tomar en consideración tres pasos que son:

- a) Tomar muestras representativas.
- b) Reducir o minimizar el tamaño de las partículas de cada muestra, obteniendo submuestras para su análisis.
- c) De las submuestras se obtendrán las **aflatoxinas** que deberán ser aisladas para su cuantificación.

2.4.2. Métodos para la detección y cuantificación de aflatoxinas

Para la identificación y cuantificación de **aflatoxinas** en productos agrícolas, la ciencia se apoya en la química analítica. Dicha ciencia marca dos características de exactitud y confiabilidad, según sea el uso que se le de a los resultados:

- a). La científica que nos da los datos analíticos de precisión, exactitud, detectabilidad, sensibilidad y la especificidad.
- b). En lo que se refiere a lo práctico, se incluye la aplicabilidad, costo, tiempo, equipo y nivel de capacitación necesaria.

Para fin de investigación, la primera característica es la recomendable ya que quizás pueda llegar a un valor exacto tanto como sea posible y su fin es exclusivo de estudio (Montoya, 1995).

Para efectuar la operación de detección y cuantificación de **aflatoxinas**, es necesario tomar como base algunas características o propiedades físico - químicas como pueden ser la fotosensibilidad y emisión de fluorescencia al ser excitadas por luz ultravioleta, además de considerar la solubilidad con ciertos solventes orgánicos como son: acetona, metanol y cloroformo (SSA y CONASÚPO; citados por Villarreal, 1992).

Moreno (citado por Villarreal, 1992) mencionó que en lo referente a la fluorescencia, esta se debe a la presencia de ácido kójico, que es un químico que puede ser producido mediante procesos aerobicos por una gran variedad de hongos como *A. flavus* y a una peroxidasa encontrada en el grano de maíz.

Por otro lado, Vicam Co., 1996 indicó que la presencia del ácido kójico puede darle al grano un tipo de coloración verde-amarillo, aunque dicha coloración no nos asegura que el grano este o no contaminado con **aflatoxinas**.

Para la detección de **aflatoxinas** existen varios métodos y técnicas distintas que nos permitan tener conocimiento del grado de contaminación de las muestras en cuestión, cada uno de los métodos tiene ventajas y desventajas que se citan a continuación.

2.4.2.1. Método no analítico

Son métodos no científicos que dan resultados de forma cualitativa y que por lo general se efectúan a simple vista (observaciones rápidas). En ocasiones se apoya con la ayuda de un fluoroscopio, que nos indica con luz ultravioleta una coloración amarillo-verdosa indicativa de que la muestra puede estar contaminada. No es recomendable por su poca exactitud (Villarreal, 1992).

2.4.2.2. Método analítico

Método científico en el cual la presencia de **aflatoxinas** se valora de forma cualitativa y/o cuantitativa, se apoya con personal técnico capacitado y con herramienta de laboratorio. De acuerdo con Ortiz (citado por Villarreal, 1992) existen dos clasificaciones:

2.4.2.2.1. Métodos presuntivos

Son métodos cualitativos que detectan la presencia o no de las **aflatoxinas** en concentraciones mayores de 20 microgramos de **aflatoxinas** kg^{-1} de producto.

Para esta categoría se encuentran los siguientes métodos:

Minicolumna de Holaday-Velasco

En este método se hace uso de minicolumnas cromatográficas (HV), como primer paso se separa o extrae tóxico de la muestra, para luego ser tratado con benceno y después llevado a la minicolumna (HV); posteriormente el extracto se lleva a la luz ultravioleta. Si la muestra tiene **aflatoxinas**, éstas se manifestaran con la presencia de un anillo fluorescente de color azul en la columna. Por su naturaleza, se considera un método directo que proporciona resultados rápidos y económicos. No requiere personal altamente calificado (Ortíz, citado por Villarreal, 1992).

Pruebas de inmunoensayos

También conocidas como “Métodos de ELISA”, tienen como característica el de ser rápidas y exactas, aunque los resultados se manejan en forma cualitativa. Son pruebas inmuno-absorventes con enzimas, y su característica es la de utilizar anticuerpos específicos para **aflatoxinas**. Entre estos tipos de pruebas se encuentran: Afla-cup, Agri-screen cualitativo y EZ-Screen (Ortíz; citado por Villarreal, 1992).

2.4.2.2.2. Métodos Confirmativos

Son métodos cuantitativos que ofrecen resultados precisos sobre la cantidad de **aflatoxinas** y algunos incluso, especifican el tipo o clase de ellas.

De acuerdo a Ortíz (citado por Villarreal, 1992), dentro de esta clasificación se encuentran los siguientes métodos:

- Cromatografía en capa fina (TLC) cuantitativa.
- Cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC).
- Aflatest (Vicam, L.A.).
- Oxoid (Oxoid, U.S.A., Inc.).

Así mismo, la compañía Neogen Co. (1996) de EUA indica o recomienda una variante del Agri-screen cualitativo, que denomina Agri-screen cuantitativo (VERATOX).

Cromatografía de capa fina (TLC - Thin Layer Chromatography)

Método en el cual los extractos requieren de una gran limpieza, para ello se necesita de una columna cromatográfica para purificarlo; ya realizado esta operación los extractos son concentrados y las **aflatoxinas** son detectadas por luz ultravioleta, después de correr una prueba de cromatografía en capa fina. En este caso el proceso completo requiere de aproximadamente tres horas y para ello se requiere de material de laboratorio como cloroformo para la extracción de **aflatoxinas**, siendo este solvente uno de los inconvenientes ya que es tóxico (Garza, 1994), además de que el método es relativamente costoso.

Cromatografía de líquidos de alta presión. HPLC (high pressure liquid chromatography)

El método consiste en la preparación de extractos, previamente purificados, además del uso de solventes muy puros. En lo que respecta a la derivación, se efectúa con ácido trifluoroacético, para que posteriormente sea inyectado al sistema HPLC. En un tiempo de 20 min se obtienen gráficas con información cuantitativa precisa y de tipo de **aflatoxinas**.

Se le considera a este método como el de mayor precisión en análisis cuantitativos de **aflatoxinas**; además, es capaz de detectar en la muestra concentraciones muy pequeñas de toxinas. Uno de los inconvenientes que impiden que sea este equipo de uso común, es el alto costo para realizar las pruebas, además de requerir de personal calificado para su manejo (Ortíz; citado por Villarreal, 1992).

Los dos últimos métodos mencionados ofrecen al usuario la precisión específica de cada una de los tipos de **aflatoxinas** como B1, B2, G1, G2 y M1, así como también la cantidad exacta de toxina en cada muestra. En algunos casos, las técnicas de columnas de inmunoafinidad que son rápidas y eficientes, son suficientes para los requerimientos de los usuarios.

Aflatest y Oxoid

Son métodos que combinan la medición directa e indirecta, utilizando para ello anticuerpos sin que sean un ensayo de ELISA. Estos métodos consisten en capturar a las

aflatoxinas en minicolumnas, empleando para ello anticuerpos específicos aislándolas posteriormente por elusión y cuantificándolas por métodos directos de medición TLC y HPLC y los métodos de forma indirecta de ELISA. Se requiere, como en otros métodos, obtener un extracto de la muestra que es diluída en una solución buffer y se hace pasar por una minicolumna absorbente que contiene anticuerpos específicos de las **aflatoxinas** (Ortíz; citado por Villarreal, 1992).

El procedimiento Aflatest (Vicom Co., 1996) es un método que ha demostrado confiabilidad en sus resultados y por consiguiente, se emplea como método oficial para la detección de **aflatoxinas** en granos.

El tiempo requerido para efectuar los análisis es de solo 10 m aproximadamente y no requiere de personal altamente calificado (Villarreal, 1992). Este método tiene varios niveles de sensibilidad proporcionando resultados en partes por billón (ppb) y se caracteriza por utilizar una columna cromatográfica de afinidad monoclonal (Garza, 1994).

Veratox* (Agri-screen Cuantitativo). (Neogen Corp., 1996)

Este tipo de métodos se clasifica como ELISA (inmunoabsorbente, ligado a enzimas) de competencia directo. Para la extracción de **aflatoxinas**, el primer paso, se realiza con el uso de una solución de metanol con agua y después se realiza el proceso de mezclado y filtración. Las toxinas que son extraídas por el filtrado, se muestrean para posteriormente ser mezcladas con el conjugado. Esta mezcla en solución, se transfiere a las pozos

recubiertos con anticuerpos; en la que la toxina libre, compite con el conjugado por los sitios enlazantes del anticuerpo. El conjugado no ligado o libre, junto con las demás sustancias producidas en esta fase son eliminadas mediante un proceso de lavado con agua estéril agregando un conjugado. La presencia del conjugado no libre o ligado, da lugar a la coloración de ésta; como resultado de la presencia de un conjugado enlazado. Posteriormente se agrega un reactivo detonador rojo y se observa el color resultante de la solución. Una coloración azul indica que la muestra es negativa y una coloración roja que indica que la muestra da positivo fuerte. Las absorbancias de las muestras (OD_{650}) se comparan con las lecturas de los controles (OD_{650}) y se calculan las partes por billón (ppb) de **aflatoxinas**.

A. Reactivos suministrados

1. 48 pozos recubiertos de anticuerpo monoclonal.
2. 48 pozos de mezclado, marcados con la raya roja.
3. Frascos de etiqueta amarilla (4): 1.5 ml. Controles de 0.5, 15 y 50 ppb (**Aflatoxinas**). Precaución: solución de alcohol metílico.
4. Frascos de etiqueta azul: 7ml conjugado de aflatoxina-HRP.
5. Frascos de etiqueta verde: 24ml sustrato TMB.
6. Frascos de etiqueta roja: 32 ml solución detenedor rojo.
7. Recipiente para reactivos: Para cargar la pipeta multi-canal.
8. Indicaciones de uso.

Una recomendación hecha por la empresa comercializadora del “kit”, indica que los reactivos de estos pueden utilizarse solamente hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta siempre y cuando se mantenga en refrigeración entre 2-8 °C.

B. Materiales requeridos pero no suministrados

1. Para la extracción: Use una relación muestra/solvente de 5:1. Ejm: para una muestra de 50 g, use 250 ml de metanol 70% grado ACS en agua destilada o desionizada.

a) Mezclador de alta velocidad: Waring con recipiente de 1l o su equivalente.

b) Probeta graduada: De plástico (250 ml), o equivalente.

c) Material de vidrio para la extracción de la muestra: embudo de vidrio para filtración y frasco de capacidad de 125 ml.

d) Papel filtro: Whatman No. 1 o equivalente.

e) Molino: marca Dickens Mill, VCM, Glen Disc Mill o Retch Mill.

f) Fuente de agua destilada o desionizada.

2. Material absorbente : Toallas de papel, papel KayDry o equivalente.

3. Porta-pozos.

4. Pipeta y puntas desechables: MLA de 100 µl o equivalente.

5. Pipeta volumétrica: de 5 ml, desechable, de plástico.

6. Pipeta multi-canal: Titer-tek de 12 canales, o equivalente.

7. Reloj/alarma.

C. Preparación de la muestra

La muestra debe colectarse siguiendo las técnicas aceptadas para muestrear. La muestra debe molerse y mezclarse cuidadosamente antes de pasar al proceso de extracción.

D. Molienda y extracción.

1. Preparar el metanol al 70 % mezclando 210 ml metanol grado ACS con 90 ml de agua destilada y desionizada por cada muestra a evaluar.
2. Obtenga una muestra representativa, usando su técnica normal de muestreo y moler hasta que tenga un tamaño de partícula malla 20.
3. Usando una mezcladora de alta velocidad, mezcle 50g de la muestra molida con 250 ml de solución de metanol al 70% durante dos minutos.
4. Pase por lo menos 15 ml a través del filtro para obtener la muestra líquida (filtrado). Use papel Whatman N° 1.
5. La muestra ahora está lista para correr la prueba.

E. Procedimiento para la prueba y preparación de las soluciones

El sustrato está listo para su uso. Use el siguiente cuadro para determinar la cantidad de sustrato necesario. Extraiga solamente el volumen necesario para cada lote de pruebas. No devolver sustrato sobrante al frasco.

Nº de Tiras	Nº de Muestras	ml de Sustrato
1	1-8	3.0
2	9-20	4.0

F. Prueba cuantitativa, Procedimiento:

1. Corte de la tira un pozo de mezclado (raya roja) para cada muestra a correrse y cuatro pozos para los controles. Colóquelo en el porta-pozos.
2. Corte una cantidad igual de la tira de pozos recubiertos de anticuerpo. Marque la cuba en el extremo izquierdo con la letra "c" y coloque las pozos en el porta-pozos.
3. Mezcle bien los reactivos antes de usarlos, girando suavemente cada frasco.
4. Coloque 100 μ l del conjugado (frasco de etiqueta azul) en cada cuba del mezclado.
5. Usando una punta nueva para cada canal de la pipeta, transfiera 100 μ l de controles y muestras a las pozos de mezclado (raya roja), como es indicado abajo.

Tira 1	0	5	15	50	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Tira 2	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20

6. Usando la pipeta multi-canal, mezcle el contenido de las pozos, absorbiendo y soltando el líquido dentro de las pozos, tres veces. Transfiera 100 μ l a las pozos recubiertos de anticuerpo y deslice el porta-pozos hacia adelante y hacia atrás, rápidamente. Incúbelos durante 10 min. a temperatura ambiente. Deseche las pozos de mezclado.
7. Usando un sifón de enjuague, o agua corriente (caudal suave) llene cada pozo con agua y vacíelo inmediatamente. Repita este procedimiento cinco veces. Voltee las pozos boca abajo y golpéelos sobre una toalla de papel hasta que no queden gotas de agua.

8. Usando una pipeta volumétrica, transfiera del frasco de etiqueta verde la cantidad de sustrato necesaria y colocar en el bote/recipiente. Utilizando puntas nuevas, transfiera 100 μ l del sustrato a cada pozo y mezcle bien. Incubar durante 5min. Desechar el sustrato sobrante y enjuagar el bote/recipiente con agua.

9. Usando igual volumen que para el sustrato, coloque el reactivo detenedor rojo mediante pipeta en el recipiente para reactivos. Usando las mismas puntas que para el sustrato y la pipeta multi-canal, coloque 100 μ l del detenedor rojo dentro de cada pozo y mezcle cuidadosamente. Deseche las puntas.

G. Obtención de resultados

Transfiera los datos de absorvancia obtenidos a la computadora (Programa con curvas VERATOX) para obtener la concentración de **aflatoxinas** en ppb.

Es importante mencionar que todos los métodos son válidos para la determinación de **aflatoxinas** en productos alimenticios, solo que se recomienda la utilización de alguno de ellos según sean los objetivos necesidades y tiempo requerido por el usuario, además de tomar en consideración la disponibilidad de recursos económicos.

Para erradicar el problema de **aflatoxinas** en lotes de granos, se están haciendo aún investigaciones y evaluando nuevas técnicas; para tener mejores resultados en cuanto a diagnóstico y cuantificación, todo con el propósito de brindar al usuario mayor precisión y menor costo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del Experimento

El presente experimento se desarrolló en el ciclo primavera verano de 1996, considerando dos ambientes en dos fechas de siembra con riego completo (16 de febrero y 19 de marzo). El experimento se estableció en el Campo Agrícola Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), que se encuentra localizado en la carretera Zuazua-Marín Kilómetro 17.5 en el municipio de Marín, N.L. Su ubicación geográfica corresponde a los 25° 33' de latitud norte y 100° 03' longitud oeste, con una altitud de 367.3 msnm.

De acuerdo con la clasificación climática de Köppen modificado por García (1973), el clima de esta localidad se clasifica como $BS_1 (h_1) hx (e')$; siendo un clima seco árido con cociente p/t (precipitación anual en mm/temperatura promedio anual en °C) mayor de 22.9 mm, lo cual indica que es de los climas menos secos del grupo BS con temperatura del mes más frío abajo de los 18°C con una oscilación anual de temperaturas medias mensuales mayores de 14 °C.

La temperatura promedio anual en esta región es de 21 °C, con una temperatura promedio anual máxima de 28.4 °C y una mínima de 16.6 °C. En cuanto a la precipitación pluvial promedio anual es de 466 mm y con una humedad relativa del 70% (Departamento de Meteorología y Climatología de la Facultad de Agronomía de la UANL, 1996).

Las condiciones ambientales, promedio mensual de temperaturas, humedad relativa y evaporación así como la precipitación mensual acumulada que se registraron durante la fase experimental del presente trabajo se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Datos climatológicos que se presentaron durante el desarrollo del experimento. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N. L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Temperaturas	Meses						
	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
T. máxima del mes (°C)	40	39	43	41	42	41	43
Media de T. máxima (°C)	25.79	27	33.1	37.70	38.2	38.90	35.80
T. media mensual (°C)	17.06	18.09	23.71	30.08	30.66	31.17	28.95
T. mínima del mes (°C)	0	-1	6	16	20	21	19
Media de T. mínimas (°C)	8.41	9.2	14.66	22.45	23.13	23.54	22.09
Precipitación (mm)	0	0	0	0	41.5	45	180.3
Evaporación (mm)	174.72	200.15	243.53	249.48	235.3	-----	187.38
Humedad relativa (%)	45.65	42.88	58.69	72	75	74.6	76.68

Fuente: Departamento de Meteorología y Climatología de la Facultad de Agronomía de la UANL, 1996.

El promedio de temperaturas máximas y mínimas registradas durante el experimento se presentan en la Figura 5.

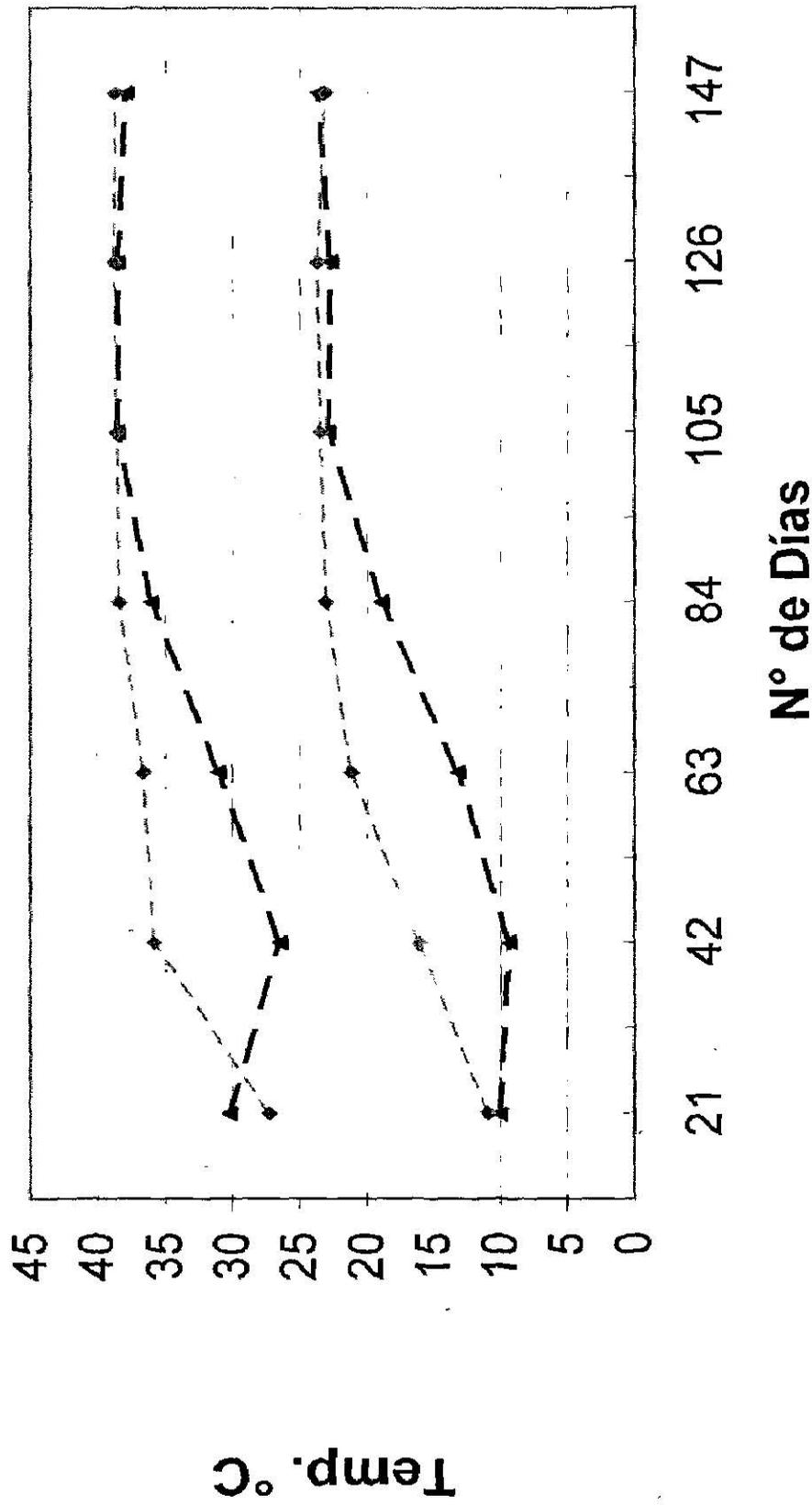


Figura 5.- Promedio de temperaturas máximas y mínimas registradas durante el desarrollo del experimento. Período del 16 de febrero al 9 de agosto de 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín, N.L.

Las temperaturas promedio registradas durante el proceso de inoculación artificial en campo hasta la cosecha, efectuadas en 12 materiales genéticos de maíz se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Datos climatológicos promedio que se presentaron durante la etapa de inoculación artificial en campo de *A. flavus* en la primera y segunda fecha de siembra. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Fecha de Siembra	T. max.	T. min.	T. media	Evap. mm	% H.R.	Lluvias mm.
1	42	20	37.65	102.054	75.06	63.5
2	42	21	32.31	384.04	74.83	59.3

Fuente: Departamento de Meteorología y Climatología de la Facultad de Agronomía de la UANL, 1996.

Las características físico-químicas del suelo donde se establecieron las dos fases experimentales se presentan en el Cuadro 5 (CEA-FAUANL, 1996).

Cuadro 5.- Propiedades físico-químicas del suelo donde se realizó el experimento. Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de agronomía UANL. Marín, N.L.. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Características	Valor medio	Clasificación
PH	7.5	Ligeramente alcalino
Conductividad eléctrica	1.3 mmhos cm ⁻¹	No salino
Textura	-----	Arcilloso
Materia orgánica	2.3%	Medio
Nitrógeno total	0.1 ppm	Pobre
Fósforo extractable	2.1 ppm	Pobre
Potasio extractable	342.0 ppm	Medianamente rico

3.2. Materiales

3.2.1. Material Biológico

3.2.1.1. Material genético de maíz

Los materiales genéticos de maíz empleados en el presente experimento fueron 12, de los cuales ocho fueron obtenidos del banco de germoplasma de la Facultad de Agronomía de la UANL uno del campo experimental agrícola del ITESM en Apodaca N.L. y los tres restantes del Instituto Mexicano del Maíz de la UAAAN en Saltillo, Coahuila. Algunas características fenológicas de los genotipos estudiados se presentan a continuación:

1. Blanco Hualahuises (FAUANL): Ciclo tardío, floración aprox. de 65 días cosecha de 100 a 120 días y altura de la planta de 2.20 a 2.40 m.
2. Blanco la Purísima (FAUANL): Ciclo tardío, floración aprox. de 80 días cosecha de 130 a 140 días y altura de la planta de 2.20 a 2.40 m.
3. Ranchero (FAUANL): Floración aprox. de 70 días, cosecha de 110 días y porte de la planta de 1.80 a 2.00 m.
4. Pinto Amarillo (FAUANL): Floración apróx. de 75 días, cosecha aprox. de 120 días y porte de la planta de 2.00 m aprox.
5. NL-U-127 (FAUANL): Floración aprox. de 70 días, cosecha aprox. de 120 días y porte de la planta de 1.80 m aprox.
6. Pob'30 (FAUANL): Floración aprox de 70 días, cosecha aprox. de 120 días y porte de la planta de 1.50 a 1.70 m aprox.

7. H-433* (FAUANL): Floración aprox. de 75 días, cosecha aprox. de 120 días y con porte alto.

8. P. 3428** (FAUANL): Floración aprox. de 75 días, cosecha de 120 días y de porte alto.

Materiales usados en el experimento y que fueron conseguidos fuera de la institución.

9. NL-VS-02 (ITESM): Ciclo tardío, floración aprox. de 70 días cosecha de 120 días y de porte alto; proporcionado en el campo experimental del Instituto Tecnológico y Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey. Apodaca N.L.

Los tres materiales siguientes fueron solicitados al Programa Mexicano del Maíz de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y fueron clasificados como:

10.- UAAAN-1, UAAAN-2, UAAAN-3: Materiales de porte mediano a bajo, floración aprox. de 70 días y cosecha de 90 a 100 días.

* Se obtuvo de PRONASE.

** Se obtuvo de una casa comercial.

3.2.1.2. Cepa de *A. flavus*

Para efectuar la inoculación en campo se utilizó una cepa fungosa suministrada por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México D.F. Dicha cepa presenta características que corresponden a la monografía del género *Aspergillus* de Kenneth B. Raper y Doroty I. Fennell y que fue identificada como *A. flavus* Link aislado a partir de semilla de maíz.

Características macroscópicas. Colonia de color verde-amarillo generalmente compacto y en ocasiones desarrollo de micelio aéreo, formación de esclerocios de color café claro a oscuro en un periodo de 8 a 10 días según condiciones de cultivo.

Características microscópicas. Cabeza conidial radiada a columnar, esterigmas uniseriados y biseriados, cónidios ligeramente rugosos.

Dicha cepa fue enviada en medio de cultivo papa-dextrosa agar. También se identificó como una cepa que tiene altas posibilidades de producción de **aflatoxinas** cuando alcanza su estado maduro.

3.2.2. Material de campo

Los materiales y herramientas que fueron utilizados para la realización de todas las labores agrícolas en campo durante el experimento fueron las siguientes:

a) Para la preparación del suelo, siembra, labores culturales y cosecha se empleó un tractor, arado, rastra de disco, bordeador, sembradora experimental, azadones, barra con 9 agujas para la inoculación artificial de *A. flavus*, vaso de vidrio para transportar la solución con esporas de *A. flavus*, recipiente con agua, guantes, tapa bocas, bolsas de plástico.

b) Para efectuar la toma de datos se usaron: Un libro de campo, cinta métrica, lápices, marcadores con color negro, etiquetas, engrapadoras, banderillas.

c) Para el control de plagas y fertilización se aplicaron los siguientes productos:

Fertilización: 150 kg de sulfato de amonio con 20.5% de N

Insecticidas: Metamidofos 600, dosis de 1.5 l ha⁻¹ para el control de trips y pulgón.

Dos aplicaciones por cada fecha de siembra.

Decís, dosis de 0.51 l ha⁻¹ para el control del gusano cogollero y gusano elotero.

Una aplicación por cada fecha de siembra.

Área de cultivo utilizada durante el experimento

El área de terreno utilizado para cada uno de los experimentos fue de 1,100 m². El croquis de cada uno de ellos se presenta en las Figuras 6 y 7.

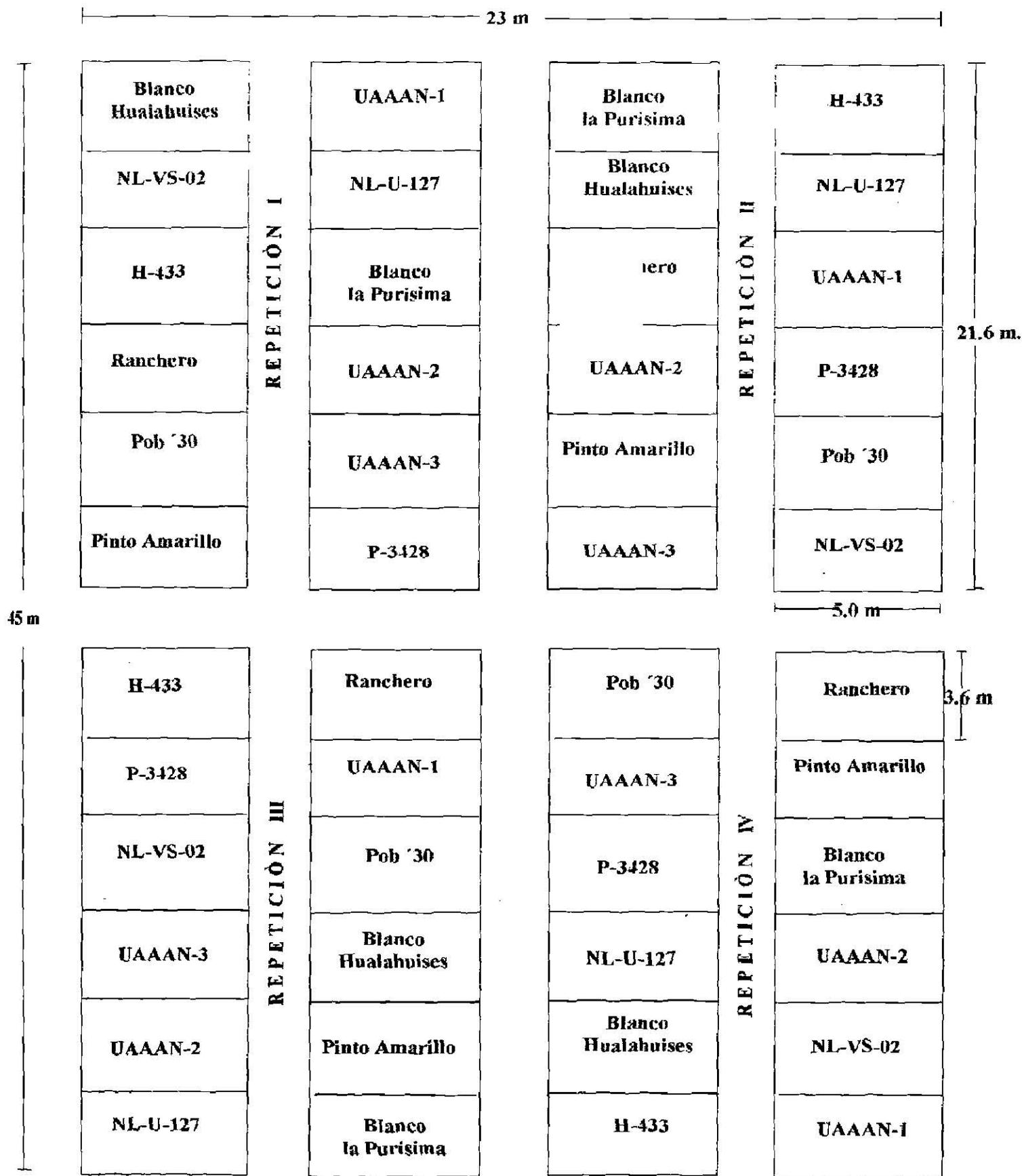


Figura 6. Croquis del experimento, primera fecha de siembra. Cielo primavera-verano 1996.
Marín, N.L.

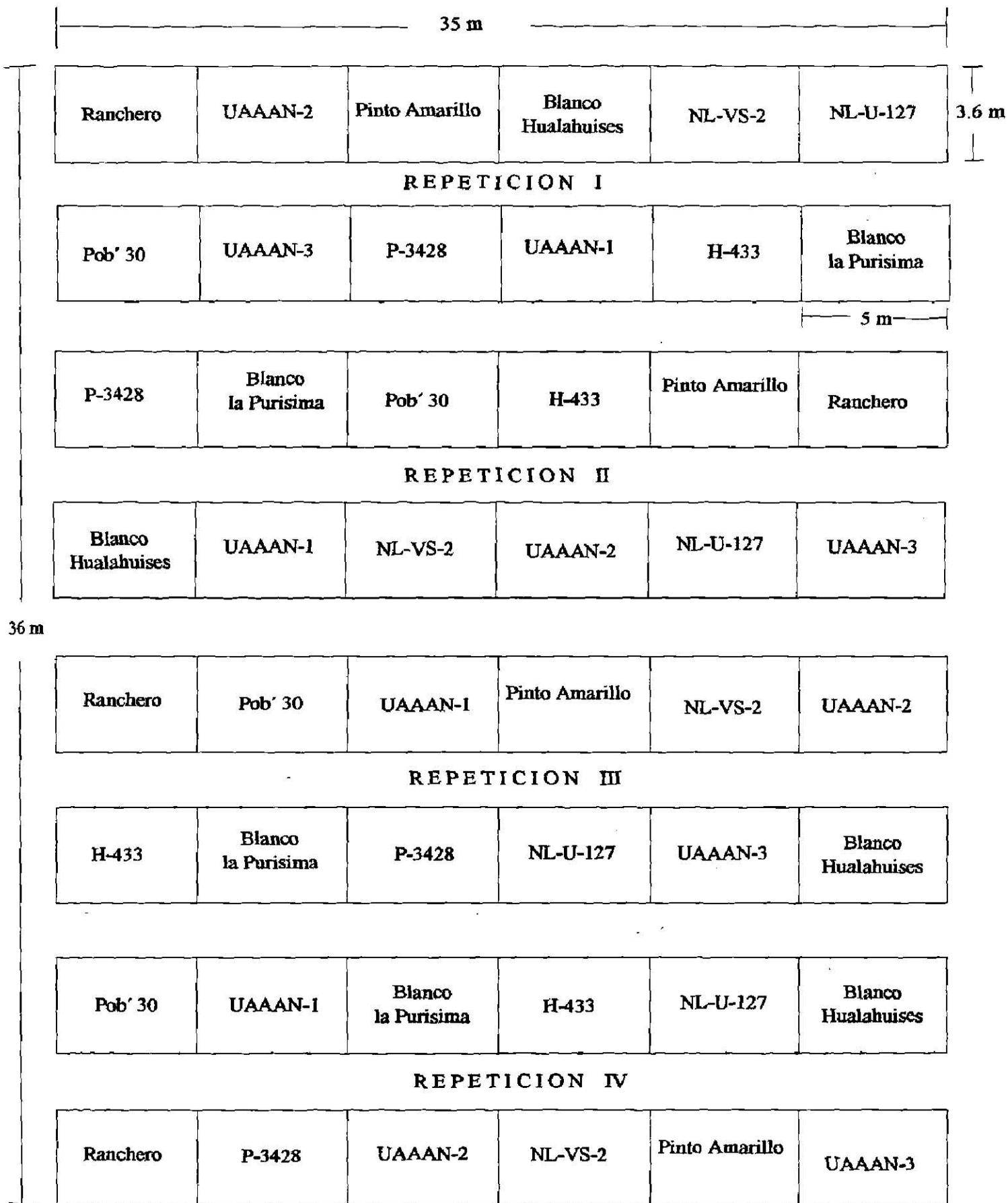


Figura 7. Croquis del experimento, segunda fecha de siembra . Ciclo primavera-verano 1996. Marín, N.L.

3.2.3. Material de laboratorio

a) Material utilizado para la multiplicación del hongo y para la evaluación de granos de maíz contaminados por *A. flavus*: Medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar), cajas petri, vasos de precipitado, balanza granataria, matraces volumétricos, espátula, agitador, incubadora, autoclave, NaOCl, agua destilada estéril, pinzas, antibiótico y cámara de transferencias.

b) Materiales empleados para estimar el conteo de esporas: Cajas petri, tubos de ensayo, autoclave, agua estéril, pinzas, vasos de precipitado, centrifugado, Twin 20 que es una solución que se utiliza para el lavado de las esporas y conidios, espectrofotómetro, hemocitómetro, jeringa de insulina, cubre objetos, micropipetas, medio de cultivo PDA; (papa dextrosa agar).

3.3. Metodología

Tratamientos

Los tratamientos se formaron por la combinación de 2 fechas de siembra y 12 genotipos de maíz inoculados con conidios de *A. flavus* en una dosis de 2×10^7 conidios ml^{-1} , 20 días después de la floración femenina.

3.3.1. Desarrollo del experimento

Diseño

Para la distribución de los 12 tratamientos en dos ambientes se utilizó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones por cada fecha de siembra, en tanto que para el análisis de las dos fechas de siembra se utilizó un diseño de bloques al azar combinado. El tamaño de la unidad experimental fue de cuatro surcos de 5 m de largo a una distancia de 0.90 m entre surcos, considerándose como parcelas útiles los dos surcos centrales y una densidad de población aproximada de 20,000 plantas ha⁻¹.

Es importante resaltar que en la primera fecha de siembra influyo negativamente en la distribución de los riegos aplicados dando un mal comportamiento de los genotipos en la cuarta repetición por lo que se opto por eliminarlo, dejando al experimento con tres repeticiones.

Para las dos fechas de siembra, se preparó la cama de siembra efectuando un paso de arado, dos de rastra, después se surcó y se aplicó riego de pre-siembra. Previo a la siembra, se aplicó al suelo sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). Las siembras se realizaron en suelos húmedos los días 16 de febrero y 19 de marzo de 1996 a chorrillo ligero y con una profundidad de 0.06 m, empleando para ello una sembradora experimental. Cuando las plantas tenían entre 0.15 y 0.20 m de altura, se efectuó un raleo dejando una separación entre plantas de 0.25 m.

En cuanto al control de plagas fue necesario la eliminación de trips y pulgón que se presentaron en fase vegetativa del cultivo, aplicando para ello Metamidofos 600 y en la etapa de floración se controló el gusano cogollero con Decis aplicados con una bomba de aspersión. Para satisfacer los requerimientos de agua en la planta se hizo necesario la aplicación de cinco riegos de auxilio para las dos fechas de siembra.

Procedimiento de inoculación artificial en campo

La inoculación artificial de *A. flavus* se realizó en los 20 días después de iniciado la floración femenina (etapa de jilote) siguiendo la metodología descrita por Scott y Zummo (1988), con modificaciones. El procedimiento utilizado se describe a continuación:

Con una solución de agua estéril y *A. flavus* en concentración de 2×10^7 conidios ml^{-1} , se procedió a la inoculación en campo empleando Pinbar (barra con 9 agujas), la cual se sumergió en la solución para impregnarlas con conidios y posteriormente inyectarlos de forma paralela con las hileras de granos; la barra de agujas se colocó en forma vertical sobre el jilote y se empujó para atravesar las espatas y penetrar a los granos procurando inyectar solo una hilera de granos, posteriormente y modificando lo propuesto por Scott y Zummo (1988), la mazorca se roció con un atomizador de agua con el propósito de simular alta humedad relativa en el ambiente, después se cubrió con una bolsa de plástico transparente por un período de 24 hr para asegurar en lo posible la inoculación y desarrollo del hongo.

La cosecha se realizó por parcela en una sola fecha dentro de cada ambiente, considerando realizarla cuando todos los materiales presentaban madurez fisiológica; indicada por la aparición de capa negra en los granos, siendo estas fechas los días 11 de junio y 9 de agosto para la fecha uno y fecha dos respectivamente.

3.3.2. Conteo de esporas para definir la solución a inocular

El procedimiento de muestreo y conteo de conidios que se utilizó, es el empleado para determinar la concentración de glóbulos rojos en sangre humana a sugerencia de Martínez (1996), con modificaciones por el Q.B.P. Javier Martínez.

Se inició con la preparación de una solución de muestreo de concentración de conidios formándose con 100 ml de agua destilada y una cantidad aleatoria de conidias de *A. flavus*. Se tomaron muestras de dicha solución evaluando en cada una de ellas la concentración de conidios, siendo hasta el número 10 en la cual se encontró la concentración deseada de 2×10^7 conidios por cada ml de agua. Cada una de las muestras se extrajo con una jeringa para insulina con un volumen de 1 ml, colocándola en el hemocitómetro. El uso de la jeringa fue la modificación propuesta por Martínez, dado que las pipetas del hemocitómetro son pequeñas y no permiten el paso de los conidios.

El conteo de conidios se hizo considerando el área del hemocitómetro que se encuentra en la parte central de la cámara (usada para el conteo de hematíes o glóbulos rojos), la cual está dividida en 400 cuadros menores seccionados por líneas dobles en 25 cuadros grandes y conteniendo cada una 16 cuadros menores; de los 25 cuadros grandes se

tomaron 5 siendo estos los cuatro de las esquinas y el del centro, dando un total de 80 cuadros menores contabilizándose los conidios que se encuentren en le área usando para ello las siguientes fórmulas.

Número de conidios encontrados en 5 cuadros (80 s).....	2000
Número correspondiente a 400 cuadritos: 2000×5	10,000
Esa cantidad para convertirla de 1 décima de mm. a 1mm. cúbico se multiplicó x 10	100,000
Dilución a 1/200.....	2×10^7

Después de identificada la muestra con la concentración de conidios deseada, esta se determinó su transmitancia en el espectrofotómetro con una calidad de luz de 530 nm obteniéndose un valor de 11%, éste fue utilizado como base para preparar soluciones con dosis de conidios deseados.

3.4. Variables Medidas

Las variables evaluadas fueron: Días a floración masculina y femenina, rendimiento de grano por parcela porcentaje de granos infectados por *A. flavus* y contenido de aflatoxinas en granos.

3.4.1. Días a floración masculina

Esta variable se cuantificó considerando los días transcurridos desde la fecha de siembra en húmedo hasta que al menos el 50% de las plantas de cada parcela, presentaban al menos un 50% de anteras expuestas en la espiga.

3.4.2. Días a floración femenina

Se consideró los días transcurridos desde la fecha de siembra en húmedo hasta cuando el 50% de las plantas de la parcela, presentaban jilotes con estigmas expuestos.

3.4.3. Rendimiento de grano por parcela (kilogramos por parcela útil)

La cosecha se realizó, considerando todas las mazorcas de los dos surcos centrales de cada parcela y se contabilizaron. Posteriormente se desgranó y se pesó.

3.4.4. Porcentaje de granos de maíz infectados por *A. flavus*

Esta variable se estimó considerando 35 semillas por cada unidad experimental poniéndolas en medio de cultivo PDA y observando a simple vista el desarrollo del hongo por cada semilla.

La metodología empleada para la evaluación de granos de maíz infectados *por A. flavus* fue indicada por Rivas (Comunicación personal)*.

Primero, se disolvió el medio de cultivo PDA en agua destilada estéril previamente calentado en una concentración de $39 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de agua y agregando al final una pizca de antibiótico para eliminar posible competencia de otros hongos y/o bacterias, posteriormente se vació el contenido en cajas petri para su esterilización en la autoclave a una presión de 15 a 20 lb pg^{-2} y a una temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min; después, se procedió a enfriar a temperatura ambiente, hasta la solidificación del medio de cultivo en las cajas. Luego, en una cámara aislada, las semillas de maíz se colocaron por tres min en NaOCl al 2%; después de ese tiempo, se retiró con unas pinzas y se sumergió en agua destilada estéril. A continuación, las semillas se acomodaron en cajas petri con medio de cultivo ya establecido, colocando siete semillas por cada caja petri para su desarrollo; dejándolas durante cinco días en la incubadora, a una temperatura de 27 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Al final de los cinco días se determinó el porcentaje de granos infectados contabilizando los granos con coloración verde oscuro, siendo estos indicativo de contaminación por *A. flavus* dividiendo la cantidad sobre el total de granos en cada caja petri.

Cabe mencionar que en cada tratamiento fue colocado en cinco cajas petri y cada caja con siete semillas, lo que nos da un total por tratamiento de 35 semillas; además fueron diferenciadas por repeticiones y por fechas de siembra, para llevar un orden en los análisis.

* Ing. Imelda Gpe. Rivas, encargada del Laboratorio de Fitopatología de la FAUANL.

3.4.5. Contenido de aflatoxinas en granos de maíz (ppb)

El método que se empleó para la determinación de esta variable fue VERATOX (Agri-screen cuantitativo); prueba cuantitativa del tipo ELISA (Inmunoabsorbente, ligada a enzimas) de competencia directa de la marca Neogen (Neogen Corp., 1996), especificando solamente la cantidad total de **aflatoxinas** en el producto sin diferenciar el tipo o clase de ellas. La evaluación de esta variable se realizó solamente en 2 repeticiones y se hicieron en los laboratorios de análisis de aflatoxinas del grupo industrial MASECA en Monterrey N.L.

3.5. Análisis Estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el modelo bloques al azar en localidades donde el modelo se describe a continuación (Olivares, 1995).

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + \beta_j(i) + \mathcal{K}_k + (L\mathcal{J})_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, l$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

$$k = 1, 2, \dots, t$$

Donde:

- Y_{ijk} es la observación del tratamiento k en el bloque j en la localidad i .
- μ es el efecto verdadero de la media general.
- L_i es el efecto verdadero de la i -ésima localidad.
- $\beta_j(i)$ es el efecto del j -ésimo bloque en la i -ésima localidad.
- \mathcal{T}_k es el efecto del k -ésimo tratamiento.
- $(L\mathcal{T})_{ik}$ es el efecto de la interacción entre el tratamiento k y la localidad i .
- ε_{ijk} es el error experimental de la ijk -ésima observación.

Previo a la realización del análisis de varianza se efectuó una transformación de datos mediante la formula $Y = (y + 1)^{1/2}$ para las variables: Fecha de floración (masculina y femenina), porciento de incidencia de *A. flavus* y concentración de **aflatoxinas**, con la finalidad de asegurar la normalidad en la distribución de los datos, homogeneidad de varianza y disminución del coeficiente de variación.

Posteriormente se procedió a realizar un análisis de varianza bajo el diseño de bloques al azar en localidades para las variables consideradas. En los casos en donde se encontró diferencia significativa, se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey. Los análisis se hicieron con el apoyo del paquete estadístico de computo FAUANL (Olivares, 1995).

Para la variable rendimiento, en ambas fechas de siembra, el análisis de varianza se determinó utilizando el paquete de computo SAS, en los casos donde se encontró diferencia significativa se realizó una comparación de promedios bajo la prueba de Duncan.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del análisis estadístico de los parámetros determinados en el estudio se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Cuadrados medios del ANAVA para cinco características estudiadas en 12 genotipos de maíz (G) sembrados en dos fechas de siembra (F.S.) y la interacción (G x F.S.). Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Variable	F. S.	Genotipo	F.S. x G
Floración masculina	3111.5 **	23.5 **	10.04 **
Floración femenina	1430.9 **	25.01 **	16.21 **
Rto. de grano por parcela	1.0977 **	0.260 **	0.131 NS
% de incidencia de <i>A. flavus</i>	300.34 NS	365.48 NS	519.61 NS
Ppb de aflatoxinas	388.17..NS	1152.7 NS	2985.5 NS

NS= No significativo. **= Significativo al 1%

4.1. Días a Floración

4.1.1. Días a floración masculina

El análisis de varianza para esta variable (Cuadro 6), muestra que existen diferencias altamente significativas entre fechas de siembra, variedades y la interacción variedades por fechas de siembra.

La comparación de medias entre fechas de siembra (F.S.) se presenta en la Figura 8, observándose que en la fecha de siembra 1 el promedio de días para alcanzar esta etapa fenológica fue de 87.7 días, mientras que en la fecha de siembra 2 fue de 75.4 días; es decir que en la fecha de siembra dos, en promedio los genotipos fueron más precoces.

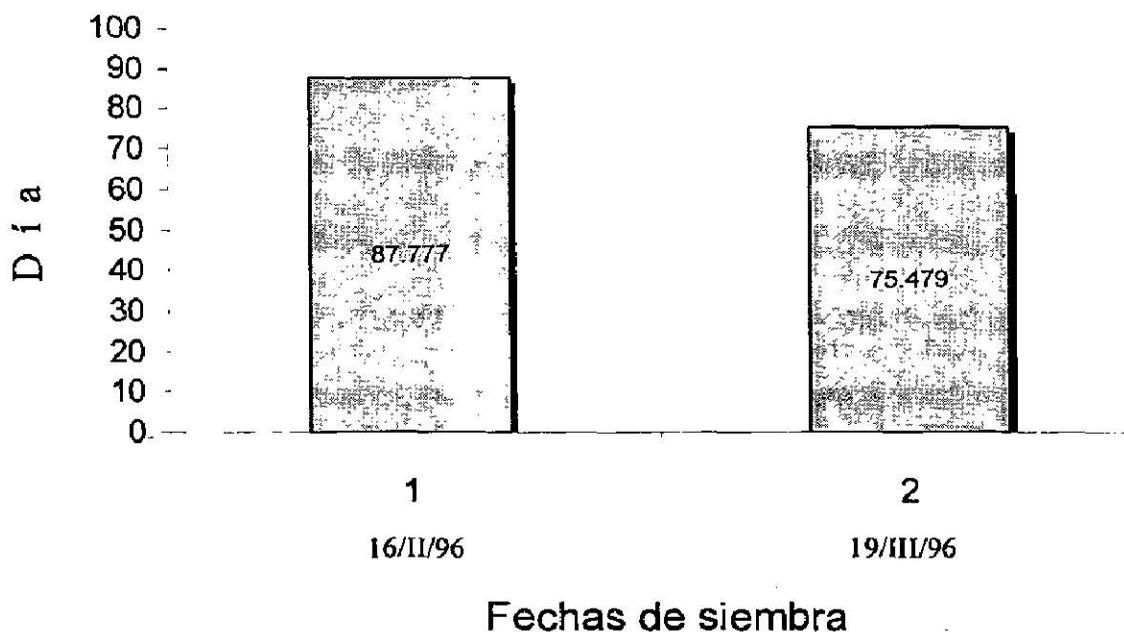


Figura 8. Promedio de días a floración masculina en maíz para niveles del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-Verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

En el Cuadro 7 se presenta la comparación de medias para el factor genotipos (G), mostrando que el genotipo más precoz resultó ser UAAAN-1 con valor promedio de 78.1 días, siendo estadísticamente iguales a él, Blanco Hualahuises, Ranchero, UAAAN-3, NL-U-127 y Blanco la Purísima con valores que fluctúan entre 79.4 y 80.0 días. El genotipo estadísticamente más tardío fue Pinto Amarillo con promedio de 84.4 días.

Con respecto a la interacción (G x FS), en el mismo Cuadro 7, se muestra que en la fecha de siembra 1, el genotipo más precoz resultó ser UAAAN-1 con un promedio de 82.7 días, siendo estadísticamente iguales a él, Ranchero, UAAAN-3, Blanco Hualahuises, P-3428, NL-U-127, Blanco la Purísima y H-433, cuyos valores fluctuaron entre 85 y 88 días. El más tardío fue Pinto Amarillo con un valor promedio de 93.7 días y estadísticamente iguales a él NL-VS-02, UAAAN-2, Pob'30, H-433, Blanco la Purísima, NL-U-127 y P-3428 con valores de 91 a 87 días. Para la fecha de siembra 2, la comparación de medias señala que los genotipos más precoces fueron Blanco Hualahuises y Blanco la Purísima con valores de 74.5 días y estadísticamente iguales los genotipos NL-U-127, UAAAN-1, UAAAN-3, NL-VS-02, H-433, P-3428, Ranchero y UAAAN-2, teniendo valores de entre 74.8 y 75.8 días. El más tardío fue Pinto Amarillo, con un valor promedio de 77.5 días y estadísticamente iguales a él, Pob'30, UAAAN-2, H-433, P-3428, Ranchero, UAAAN-3 y NL-VS-02 con valores promedio de 77 a 75.3 días.

Al comparar entre F.S. el comportamiento de cada uno de los genotipos, se aprecia que en todos, el tiempo transcurrido en días, para alcanzar esta etapa fenológica, fue menor en la fecha de siembra 2 con respecto a la fecha de siembra 1, registrándose que la

reducción en tiempo fluctuó desde 7.9 días (UAAAN-1) hasta los 16.2 días (Pinto Amarillo).

Cuadro 7. Comparación de promedios de días a floración masculina para genotipos (G) e interacción (F.S. x G.). Ciclo Primavera-Verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comparación de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Genotipos	Tratamiento.	Genotipos	(F. S. x G.)			
			Fecha de Siembra 1		Fecha de Siembra 2	
Pinto Amarillo	7	84.4 A *	93.7	A	77.5	A
NL-VS-02	12	82.0 BC	91.0	AB	75.3	ABC
UAAAN-2	2	82.0 BC	90.3	AB	75.8	ABC
Pob'30	5	82.4 B	89.7	AB	77.0	AB
H-433	10	80.9 BCD	88.0	ABC	75.5	ABC
Blanco la Purísima	8	80.0 DE	87.3	ABC	74.5	C
NL-U-127	4	80.0 DE	87.0	ABC	74.8	BC
P-3428	11	80.4 CD	87.0	ABC	75.5	ABC
Blanco Hualahuises	9	79.4 DE	86.0	BC	74.5	C
UAAAN-3	3	79.7 DE	85.7	BC	75.3	ABC
Ranchero	6	79.6 DE	85.0	BC	75.5	ABC
UAAAN-1	1	78.1 E	82.7	C	74.8	BC

* Los genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales en la prueba de comparación de medias de Duncan al 0.05.

4.1.2. Días a floración femenina.

Para esta variable, el análisis de varianza (Cuadro 6) se determinó que existen diferencias altamente significativas entre fechas de siembra, genotipos y la interacción (genotipos x fecha de siembra).

La comparación de medias entre fechas de siembra (Figura 9), muestra que los días a floración femenina de la fecha de siembra 1; es estadísticamente mayor que el valor de la segunda fecha de siembra, teniendo valores promedio de 89.9 y 81.5 días, respectivamente.

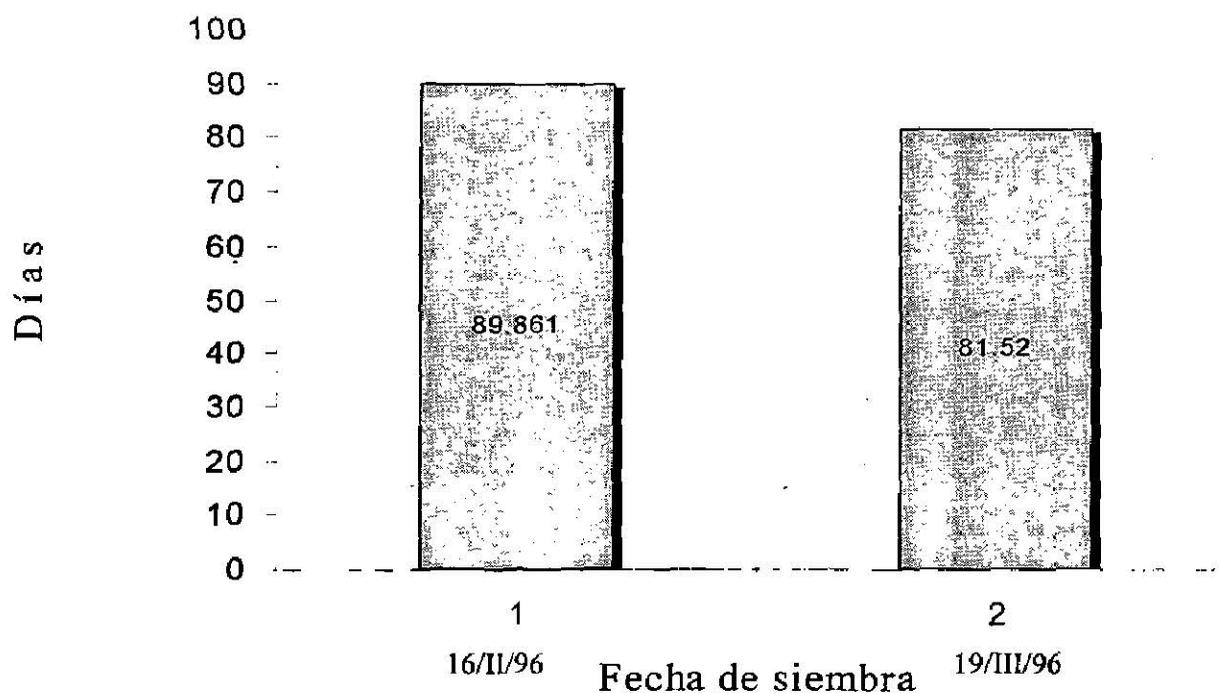


Figura 9. Promedio de días a floración femenina en maíz para niveles del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-Verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Para el factor genotipos (G) la comparación de medias se indica en la Cuadro 8, donde se muestra que Narro-1 y Ranchero fueron los más precoces con valores de 83.2 y 83 días respectivamente, siendo estadísticamente iguales UAAAN-3, NL-U-127, Blanco Hualahuisés, Blanco la Purísima y P-3428 con valores promedio de entre 83.4 y 84.9 días. El genotipo más tardío fue Pinto amarillo con 88.9 días.

En el Cuadro 8 también se indica el efecto de interacción F.S. x G. En dicho cuadro se observa que en la fecha de siembra 1, el genotipo UAAAN-1 fue el más precoz con un valor de 84.7 días, resultando estadísticamente igual a él los materiales UAAAN-3, Ranchero, Blanco Hualahuisés, NL-U-127, P-3428, Blanco la Purísima y H-433; con valores de 85.7 hasta 90.3 días en promedio. El genotipo más tardío fue Pinto amarillo con un valor promedio de 96.6 días y estadísticamente igual a él, los genotipos NL-VS-02, UAAAN-2, Pob'30 y H-433 con valores de 93.0 hasta 90.3 días. Para la segunda fecha de siembra, no se detectó diferencia significativa entre genotipos; siendo el intervalo de variación de los valores promedio, entre 80 y 83 días (UAAAN-1 y Pinto Amarillo, respectivamente).

Al comparar entre fechas de siembra el comportamiento de cada uno de los genotipos evaluados se observa en todos que en la fecha de siembra 2; el período de tiempo en que alcanzaron esta etapa fenológica fue menor respecto a la primera fecha de siembra, fluctuando la diferencia entre fechas de siembra de 2.7 días (UAAAN-1) a 13.7 días (Pinto Amarillo).

Cuadro 8. Comparación de promedios de días a floración femenina para genotipos (G) e interacción (F.S. x G.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comparación de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Variedad	Tratamiento.	Genotipos	(F. S. x G.)	
			Fecha de Siembra 1	Fecha de Siembra 2
Pinto Amarillo	7	88.9 A *	96.7 A	83.0
NL-VS-02	12	86.4 B	93.0 AB	81.5
UAAAN-2	2	86.1 BCD	92.3 ABC	81.5
Pob'30	5	86.7 B	92.0 ABC	82.8
H-433	10	85.4 BCDE	90.3 ABCD	81.8
Blanco la Purísima	8	84.4 CDEF	90.0 BCD	80.3
P-3428	11	84.9 BCDEF	89.3 BCD	81.5
NL-U-127	4	84.3 DEF	89.0 BCD	80.8
Blanco Hualahuises	9	84.4 CDEF	88.7 BCD	81.3
Ranchero	6	83.0 F	86.7 CD	80.3
UAAAN-3	3	83.4 EF	85.7 D	80.0
UAAAN-1	1	83.2 F	84.7 D	80.0

* Los genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales en la prueba de comparación de medias de Duncan al 0.05.

La variación registrada en el comportamiento entre genotipos de las variables días a floración masculina y días a floración femenina, se debe su constitución genética debido al origen geográfico de cada genotipo empleado (Poehlman, 1965).

En relación a las diferencias entre las fechas de siembra, se deben a las condiciones ambientales registradas en la fecha de siembra 1 y fecha de siembra 2, principalmente a la variación en la temperatura del ambiente. En la Figura 5 se observa que las temperaturas

registradas en la fecha de siembra 2, fueron mayores que en la primera fecha de siembra; lo cual tuvo como consecuencia que la duración de las etapas de germinación a floración masculina y femenina en la fecha de siembra 2, se acortaran con respecto a la fecha de siembra 1.

La modificación de la fenología por efecto de temperaturas según Larcher (1977), se debe a que el desarrollo de las plantas está sincronizado con procesos meteorológicos y esencialmente con acumulación de calor, lo cual provoca en cualquier genotipo, que la duración de sus distintas etapas sea variable bajo condiciones ambientales diversas; señalando además que a mayor temperatura mayor acumulación de calor y por consiguiente menor duración de las etapas fenológicas. Reyes (citado por Martínez *et al.*, 1997), señaló que temperaturas mínimas y máximas superiores a los 20 °C y 32 °C, respectivamente; tienen como consecuencia que el ciclo biológicos del cultivo del maíz, sea menor que cuando las temperaturas son inferiores a estos niveles, debido a la reducción en la duración de las diversas etapas fenológicas tal como ocurrió en el presente estudio.

En el Cuadro 1A, se presentan las diferencias entre fechas de siembra para las floraciones de cada uno de los genotipos; se aprecia en general que para estas características, los genotipos más precoces fueron menos sensibles a variaciones del ambiente que los más tardíos. Lo antes expuesto, se puede ejemplificar con los casos de UAAAN-1 y Pinto Amarillo. UAAAN-1 fue el genotipo más precoz para ambas floraciones (floración masculina y floración femenina) en las dos fechas de siembra ; así mismo, fue el que menos diferencia presentó (7.9 y 4.6 días, respectivamente) para ambas floraciones al compararse entre fechas de siembra. En contraparte, Pinto amarillo fue el

más tardío en ambas floraciones, en las dos fechas de siembra y presentó mayores diferencias (16.2 días para la floración masculina y 13.6 días para la floración femenina) al comparar cada una de sus floraciones entre diferentes ambientes. De lo anterior, se puede concluir que la sensibilidad de los genotipos en cuanto a duración de las etapas fenológicas en respuesta a variaciones de temperatura, está relacionada en forma directamente proporcional con la amplitud del ciclo biológico del cultivo.

4.2. Rendimiento de Grano por Parcela.

En el Cuadro 6 se indican los resultados del análisis de varianza para esta variable, consignándose que hubo diferencias altamente significativas para las fuentes de variación fechas de siembra, variedades, pero no para la interacción variedades por fechas de siembra.

La Figura 10 presenta la comparación de promedios para rendimiento en grano por parcela, registrándose que en el caso de fechas de siembra la que produjo mayor rendimiento de grano por parcela fue la fecha de siembra 1, con un valor promedio de 0.48 kg parcela⁻¹; en tanto que para la segunda fecha de siembra el promedio fue de 0.22 kg parcela⁻¹.

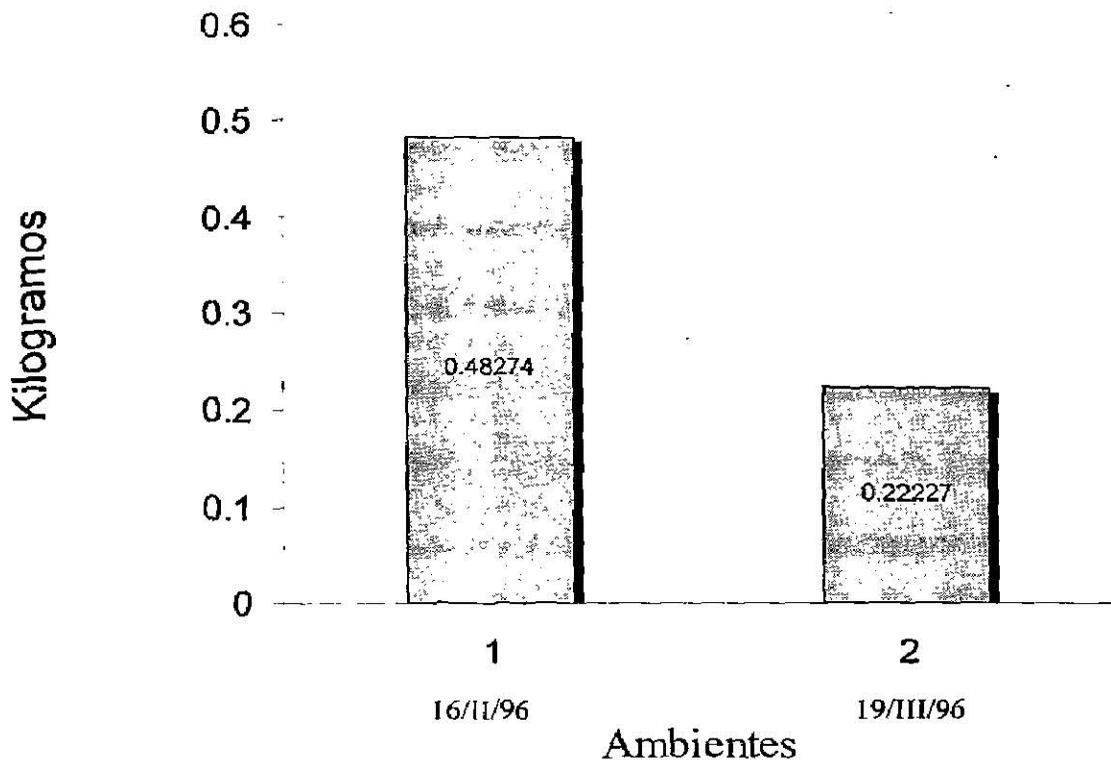


Figura 10. Promedio de rendimientos de granos en maíz por parcela para valores del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

En cuanto a los valores promedio de genotipos (G), en el Cuadro 9, se observa que el menos rendidor fue Pinto Amarillo con un valor promedio de $0.07 \text{ kg parcela}^{-1}$, resultando estadísticamente iguales a él; UAAAN-2, Pob'30, NL-VS-02, UAAAN-3, P-3428 y Blanco Hualahuises, cuyas producciones de grano por parcela fluctuaron entre 0.13 y $0.35 \text{ kg parcela}^{-1}$. El genotipo más rendidor fue NL-U-127 con un valor promedio de $0.62 \text{ kg parcela}^{-1}$; siendo estadísticamente iguales a él, P-3428, Blanco Hualahuises, UAAAN-1,

Blanco la Purísima, Ranchero y H-433, , con valores que fluctuaron entre 0.32 y 0.50 kg parcela⁻¹.

En el Cuadro 9 se muestran los resultados numéricos correspondientes, apreciándose que en la fecha de siembra 1, el material que resultó con el valor promedio más bajo fue el Pinto Amarillo con 0.06 kg parcela⁻¹. El material con mayor rendimiento de grano fue el Ranchero con un valor de 1.01 kg parcela⁻¹. En la segunda fecha de siembra se observó la misma tendencia, en cuanto a que el material genético con menor rendimiento de grano fue Pinto Amarillo con un valor de 0.08 kg parcela⁻¹. Con respecto al genotipo de mayor rendimiento en esta fecha de siembra fue NL-U-127 con un valor de 0.39 kg parcela⁻¹.

En el Cuadro 9 se observa que el mayor rendimiento se presentó en la fecha de siembra 1 con respecto a la segunda fecha de siembra. Las diferencias en rendimiento entre fechas de siembras dentro de genotipos, varió de 0.05 (UAAAN-2 y Pob'30) hasta 0.77 kg parcela⁻¹ (Ranchero). Los genotipos que presentaron tendencia inversa a la antes mencionada fueron Pinto Amarillo y UAAAN-3, los cuales resultaron tener mayor rendimiento de grano por parcela en la segunda fecha de siembra en relación a la primera, con diferencias entre fechas de siembra de 0.02 y 0.14 kg parcela⁻¹ respectivamente.

La variación del rendimiento entre fechas de siembra, se puede atribuir a la variación en las condiciones ambientales que se registraron entre ellas y básicamente a diferencias en sus valores de temperaturas máximas y mínimas (Figura 5). Lo anterior se basa en el hecho que en el presente estudio, la disponibilidad de agua en el suelo no fue un factor

diferenciable entre fechas de siembra, ya que la disponibilidad de agua para riego fue suficiente para evitar estrés por humedad en ambas fechas de siembra.

Cuadro 9. Comparación de promedios de rendimiento de grano por parcela para genotipos (G) e interacción (F.S. x G.). Ciclo Primavera-Verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comparación de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

(F. S. x G.)					
Genotipos	Tratamiento.	Genotipos	Fecha de Siembra 1	Fecha de Siembra 2	
Ranchero	6	0.49 AB *	1.01	0.24	
NL-U-127	4	0.62 A	0.93	0.39	
H-433	10	0.50 AB	0.84	0.24	
UAAAN-1	1	0.43 ABC	0.73	0.20	
Blanco la Purísima	8	0.44 ABC	0.69	0.26	
P-3428	11	0.32 ABCD	0.43	0.23	
Blanco Hualahuises	9	0.35 ABCD	0.42	0.29	
NL-VS-02	12	0.20 BCD	0.23	0.17	
Pob'30	5	0.16 BCD	0.19	0.13	
UAAAN-2	2	0.13 CD	0.16	0.11	
UAAAN-3	3	0.21 BCD	0.13	0.27	
Pinto Amarillo	7	0.07 D	0.06	0.08	

* Los genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales en la prueba de comparación de medias de Duncan al 0.05.

El menor rendimiento de grano por parcela en la fecha de siembra 2, con respecto a la fecha de siembra 1, pudiera ser explicado en base a dos causas:

a) Mayores temperaturas. Al presentarse mayores temperaturas en esta fecha de siembra, el rendimiento de grano pudo haber sido afectado probablemente por una reducción en el número de granos por mazorca al coincidir temperaturas mayores al óptimo (21 °C nocturna y 32 °C diurnas) con la etapa de espigamiento y polinización, pues según Dunlap (1994) y Berbecel y Eftimesku (citados por Martínez *et al.*, 1997), al coincidir esa etapa fenológica con temperaturas mayores al óptimo, se acelera el proceso de diferenciación reproductiva provocando una alta aborción de semillas debido a desbalances metabólicos en la planta. Así mismo, las mayores temperaturas pudieron haber afectado el peso promedio del grano, ya que aun desde antes del espigamiento, se registraron temperaturas nocturnas mayores al óptimo, lo cual pudo haber tenido como consecuencia una reducción de la duración del período de llenado de grano así como a mayores valores de tasas de respiración, debido a un mayor desdoblamiento de carbohidratos, teniendo como consecuencia que haya una menor cantidad de fotosintatos disponibles para el llenado de grano (Peter *et al.*; citados por Martínez *et al.*, 1997).

b) Fecha de siembra. Es otro factor que pudiera ayudar a explicar la variación de rendimiento por la sincronía entre las floraciones masculinas y femeninas (Cuadro 2 A). En la primera fecha de siembra se observa menor asincronía que en la segunda fecha de siembra. En el primer caso, los valores de dicha asincronía fluctuaron alrededor de dos días en todos los genotipos mientras que en la segunda fecha de siembra fue de cinco a seis días. Un mayor grado de asincronía entre floraciones limita la eficiencia de la polinización al haber menor coincidencia entre liberación de polen por las anteras y la receptividad de estigmas.

De acuerdo a lo anterior, podemos señalar que es de vital importancia no sembrar fuera de la fecha de siembra recomendada, la cual comprende del 15 de febrero al 15 de marzo para esta región, con el fin de evitar en lo posible someter al cultivo a condiciones adversas de temperatura, aun cuando se cuente con riego disponible para evitar riesgos de reducciones en el rendimiento.

En cuanto a la variación del rendimiento de grano entre genotipos, se puede señalar que Pinto Amarillo, NL-VS-02 y Pob'30, aun y cuando son genotipos regionales, presentaron los más bajos valores promedio para esta característica. Lo anterior pudiera ser explicado principalmente por el hecho de que al haber sido los materiales más tardíos en su floración, se tuvo baja eficiencia de polinización, ya que la receptividad de sus estigmas coincidió poco con la liberación de polen de ellos y de los otros materiales genéticos. La tendencia indicada se confirma con el análisis de correlación realizado para las variables de días a floración masculina y femenina con respecto al rendimiento de grano por parcela cuyo valor de coeficiente de correlación para ambos casos fue de -0.41, lo cual indica siendo de signo negativo una asociación entre las variables antes mencionadas inversa; genotipos más tardíos son menos rendidores. La explicación de los bajos rendimientos en el caso de UAAAN-2 y UAAAN-3 provenientes del Instituto Mexicano del Maíz de la UAAAN (IMM), puede ser explicado porque son materiales con origen geográfico de regiones semi-tropicales; los cuales, al ser establecidos en una zona de clima cálido y con baja humedad relativa, pueden presentar pobre adaptación al calor de esta regiones, tal como lo señaló Dunlap (1994), quien indicó que los genotipos mejorados para zonas templadas, presentan baja tolerancia al estrés al calor y generalmente muestran pobre rendimiento de grano.

En el caso de UAAAN-1, presentó nivel de rendimiento similar y en algunos casos, numéricamente mayor que el de otros materiales con amplia adaptación a las condiciones ambientales de la región. Su buen comportamiento pudiera ser explicado porque siendo un genotipo igual nque UAAAN-2 y UAAAN-3 mostró una mayor adaptación a las condiciones climáticas de la región en cuestión; ya que el IMM trabaja en el mejoramiento genético en diversas zonas del país.

El resto de los materiales presenta buen nivel de rendimiento, lo cual es explicable porque estos han sido sintetizados o mejorados para regiones con condiciones ambientales similares a las de la localidad de prueba e incluso algunos de ellas son reproducidos en la localidad.

Finalmente, para trabajos posteriores y con el fin de explicar mejor las variaciones de rendimiento de grano, se sugiere tomar en consideración la evaluación de caracteres relacionados directamente con el rendimiento, como son entre otros, cantidad de grano por mazorca, peso promedio de grano y duración del período de llenado de grano.

De acuerdo a lo hasta aquí planteado y considerando que las características de días a floración masculina y femenina así como el rendimiento de grano por parcela, en términos generales mostraron menor expresión en la segunda fecha de siembra con respecto a la primera; se puede decir que los genotipos se vieron afectados por variaciones en las condiciones ambientales en las cuales se evaluaron y en el último caso también se vio afectado por la presencia del hongo *A. flavus* en los granos.

4.3. Porcentaje de Granos de Maíz Infectados por *Aspergillus flavus*

Los resultados de los análisis de varianza para esta variable muestran que no hubo diferencias significativas entre fecha de siembra, variedades y la interacción variedades por fechas de siembras (Cuadro 6).

La Figura 11 muestra que el efecto de las condiciones ambientales presentes en las dos fecha de siembra sobre la manifestación de la presente variable, fueron similares ya que la diferencia entre fechas de siembra fueron de solamente 3.3 %. Los valores porcentuales para la primera fecha de siembra fue de 52.9 % y 56.2 % para la segunda fecha de siembra.

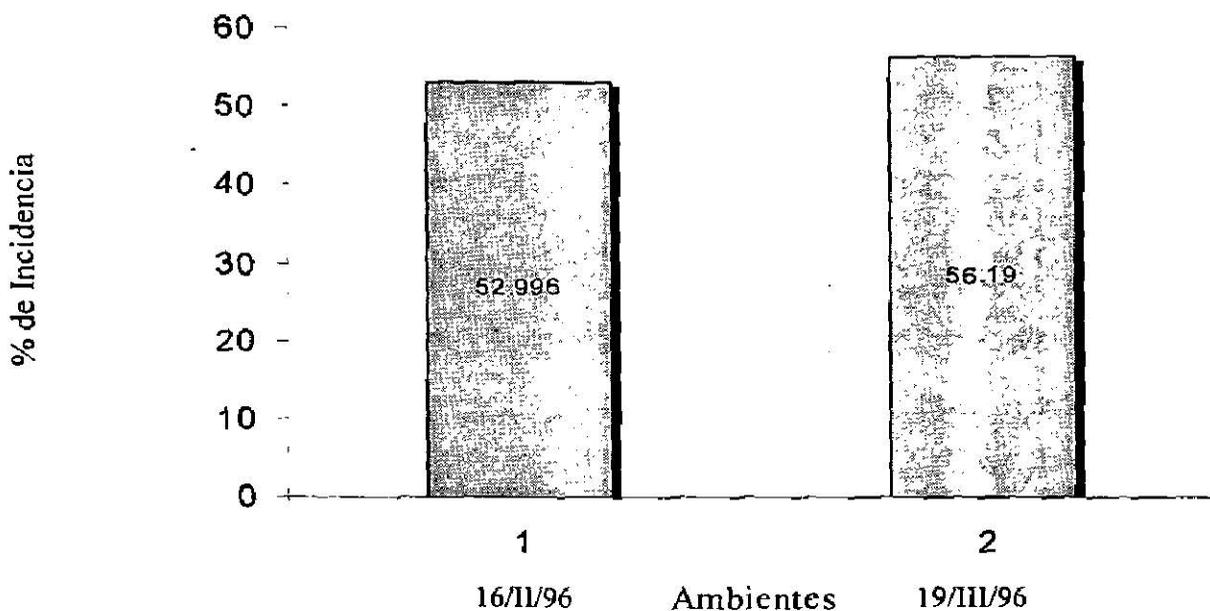


Figura 11. Promedio del porcentajes de granos de maíz infectados por *Aspergillus flavus* para valores del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-Verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

En lo que respecta al comportamiento de los genotipos en el Cuadro 10, se observa que numéricamente Pob'30 fue el más infectado por el hongo con un valor promedio de 67.8 %, el menos afectado con la presencia del hongo fue Blanco la Purísima con un valor de 45.7 %.

En el mismo Cuadro 10, presenta que en la primera fecha de siembra, los genotipos que presentaron la menor incidencia de *A. flavus* fueron UAAAN-2 y NL-U-127 con valores porcentuales de 36.1 y 37.1 %, respectivamente. Los genotipos con una tendencia mayor en el porcentaje de incidencia o más susceptibles al hongo fueron NL-VS-02, UAAAN-3 y Pinto Amarillo con valores porcentuales de 76.2, 70.5 y 67.6 %, respectivamente.

En la segunda fecha de siembra, los genotipos que mostraron menor susceptibilidad al ataque del hongo fueron UAAAN-3, Pinto Amarillo y Blanco la Purísima con valores de 40.7, 43.8 y 45.0 % de granos infectados. Los genotipos que presentaron una tendencia a mayor infección del hongo fueron Pob'30, Ranchero, Blanco Hualahuises, P-3428 y NL-VS-02 con valores de 77.1, 64.3, 60.0, 59.6 y 58.6 %, respectivamente. En el mismo Cuadro 10, se observa que numéricamente (no hubo diferencia significativa) ocho genotipos presentaron mayor grado de infección de *A. flavus* en la segunda fecha de siembra con respecto a la primera, variando los valores de las diferencias entre ambientes dentro de genotipos desde 2.9 % (UAAAN-1) hasta 22 % (Pob'30). Los cuatro genotipos restantes presentaron una relación inversa a lo anterior. Blanco la Purísima presenta prácticamente valores iguales entre fechas de siembra (46.7 y 45 %, respectivamente); en

los otros tres casos, las diferencias entre fechas de siembra fluctuaron en 17.6 % (NL-VS-02) hasta 29.7 % (UAAAN-3).

Cuadro 10. Comparación de promedios de porcentaje de granos infectados por *Aspergillus flavus* para genotipos e interacción (F.S. x G.). Ciclo primavera-verano, 1996. Facultad de agronomía, UANL. Marín N.L. Comparación de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Variedad	Tratamiento.	Genotipos	(F. S. x G.)	
			Fecha de Siembra 1	Fecha de Siembra 2
UAAAN-1	1	54.3	52.8	55.7
UAAAN-2	2	48.7	36.1	55.7
UAAAN-3	3	53.5	70.5	40.7
NL-U-127	4	47.3	37.1	55.0
Pob'30	5	67.8	55.2	77.1
Ranchero	6	61.4	55.7	64.3
Pinto amarillo	7	55.7	67.6	43.8
Blanco la Purísima	8	45.7	46.6	45.0
Blanco Hualahuises	9	53.9	45.7	60.0
H-433	10	50.5	43.5	55.7
P-3428	11	53.6	45.7	59.6
NL-VS-02	12	66.1	76.2	58.6

* Los genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales en la prueba de comparación de medias de Duncan al 0.05.

Considerando los valores promedio registrados en cada una de las fechas de siembra, se puede inferir que las condiciones ambientales que se presentaron durante los períodos de llenado de grano de los genotipos en ambas fechas de siembra, fueron las adecuadas para el desarrollo e infección del hongo *A. flavus*.

Relacionando los resultados obtenidos para cada uno de los 12 genotipos promedio de las dos fechas de siembra, con la clasificación de resistencia o susceptibilidad de genotipos de maíz, de Scott y Zummo (1988), quienes consideran como genotipos susceptibles a la infección de *A. flavus*, cuando presentan por ciento de granos infectados mayores a 36 %; se puede señalar que, todos los genotipos evaluados en las dos fechas de siembra, se pueden clasificar, como susceptibles al ataque del hongo.

Lo hasta aquí indicado, demuestra que la técnica de inoculación artificial empleada fue adecuada para promover y evaluar la infección de *A. flavus* en los granos de genotipos de maíz estudiados.

Es importante recordar que la cantidad del inóculo empleado fue propuesto por Scott y Zummo (1988), quienes usaron una concentración de 2×10^7 , dicha concentración empleada en un período de tres años fue la adecuada para la determinación de materiales de maíz resistentes o susceptibles, ya que la infección del hongo en forma natural no dio resultados positivos en el experimento debido a la influencia de las condiciones ambientales.

¿se inyecta en pinbor?
El testigo sin inóculo OK. daño físico.

La tendencia a una mayor incidencia de *A. flavus* de los genotipos en la segunda fecha de siembra, pudiera ser explicada porque en los períodos de llenado de grano, se registraron mayores diferencias entre temperaturas mínimas que entre temperaturas máximas; ya que la variación de estas últimas, en ambas fechas de siembra fueron muy similares, mientras que las temperaturas mínimas en la segunda fecha de siembra fueron mayores que en la primera fecha de siembra (Figura 5) y por arriba de los 22 °C ;de

acuerdo con Rodríguez *et. al.* (1995), temperaturas nocturnas mayores de 22 °C favorecen el crecimiento y desarrollo del hongo.

De acuerdo con los resultados, se considera que las condiciones ambientales que se presentaron en ambos períodos de evaluación fueron propicias para el desarrollo e infección del hongo *A. flavus*, y que por lo tanto fue posible conjuntar los tres elementos fundamentales que según Díaz 1994, son necesarios para que ocurra el desarrollo de una enfermedad infecciosa y las cuales son: presencia del hongo, hospedero susceptible y ambiente adecuado. Así mismo, es necesario señalar que debido a que no se contó con un tratamiento testigo sin inocular artificialmente, no se puede afirmar o negar en forma categórica la presencia del hongo en esta localidad; por lo tanto, se sugiere que en estudios posteriores, se consideren tratamientos sin inoculación, con la finalidad de observar el grado de infección natural que puede ocurrir e inferir con precisión si existe o no el hongo en el ambiente de forma natural.

La resistencia genética a la infección del hongo y a la producción de **aflatoxinas** debe ser considerada para obtener mejores cosechas en los lugares donde se presente el problema. Crear materiales genéticos con características de buena cobertura de las mazorcas, resistencia a daños por insectos, ausencia de **aflatoxinas** en los granos después de la infección, retraso de la senectud del jilote después de la polinización y resistencia de la planta a temperaturas altas y sequía, son factores que se deben tomar en cuenta para tal fin.

4.4. Contenido de Aflatoxinas en Granos de Maíz

El análisis de varianza para esta variable (Cuadro 6) indica que, estadísticamente no hubo efecto significativo de fechas de siembra, variedades y la interacción variedades por fecha de siembra.

Al realizar un análisis gráfico de los resultados numéricos obtenidos, se observa entre fechas de siembra (Figura 12), que la primera presentó un valor promedio de 101 ppb de aflatoxinas, mientras que la segunda un valor promedio de 95.7 ppb de aflatoxinas.

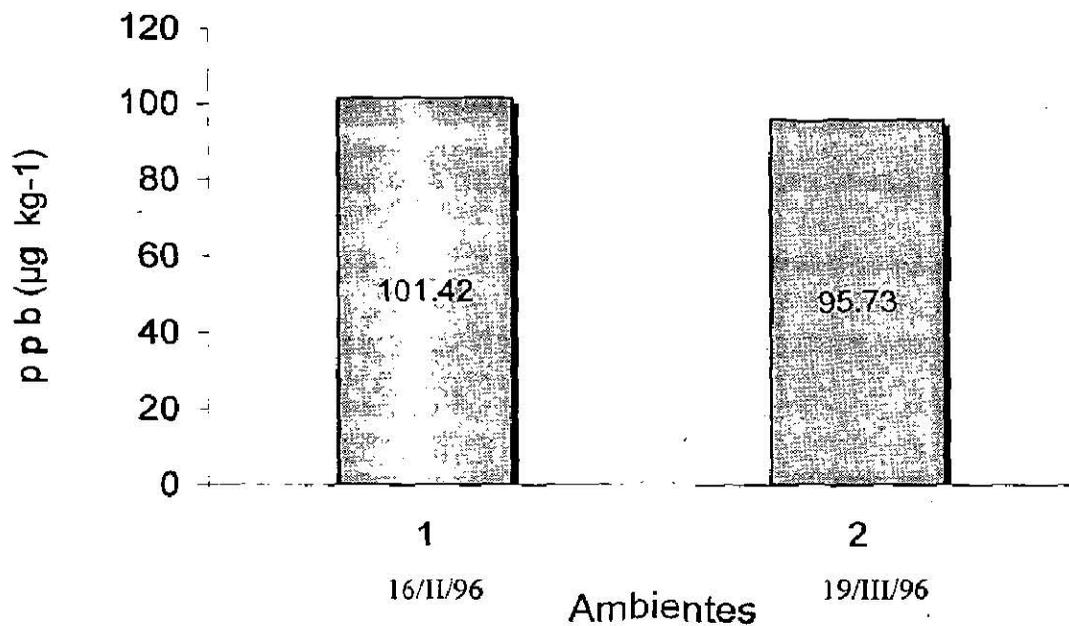


Figura 12. Promedio de contenido de aflatoxinas (ppb) en granos de maíz para valores del factor fechas de siembra (F.S.). Marín N.L. Primavera-Verano 1996. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *Aspergillus flavus* en dos fechas de siembra.

En cuanto al comportamiento de los genotipos, se observa en el Cuadro 11, NL-VS-02 fue el material que presentó la menor concentración de **aflatoxinas** en los granos con un valor promedio de 63.4 ppb. El genotipo que tuvo la mayor proporción de **aflatoxinas** en los granos fue AUN-3 con un valor promedio de 128.7 ppb.

Con respecto al efecto de la interacción fechas de siembra y genotipos, en el mismo Cuadro 11 se indica que en la primera fecha de siembra el genotipo que registró la menor concentración de **aflatoxinas** fue P-3428 con un valor de 32.6 ppb; AUN-3 fue el material que presentó los mayores valores promedio de **aflatoxinas** en los granos con 154.5 ppb.

Para la segunda fecha de siembra, se muestra que el material que resultó con menor cantidad de **aflatoxinas** en los granos fue NL-VS-02 con un valor de 53.1 ppb; mientras que el genotipo con mayor cantidad de **aflatoxinas** en los granos resultó ser NL-U-127 con un valor de 134.2 ppb. En la mayoría de los genotipos, se observó una tendencia a un mayor contenido de **aflatoxinas** al ser establecidos en la primera fecha de siembra con respecto a la segunda.

Cuadro 11. Comparación de promedios de contenido de aflatoxinas en grano para genotipos (G) e interacción (F.S. x G.). Ciclo Primavera-Verano, 1996. Facultad de agronomía, UANL. Marín N.L. Comparación de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Genotipos	Tratamiento	Genotipos	(F. S. x G.)	
			Fecha de Siembra 1	Fecha de Siembra 2
UAAAN-1	1	104.7	92.8	116.7
UAAAN-2	2	96.8	122.3	71.3
UAAAN-3	3	128.7	154.5	102.8
NL-U-127	4	105.5	76.9	134.2
Pob'30	5	108.3	128.1	88.6
Ranchero	6	80.8	70.5	91.1
Pinto amarillo	7	102.7	151.3	54.2
Blanco la Purísima	8	111.7	117.1	106.3
Blanco Hualahuises	9	98.0	116.1	80.0
H-433	10	101.9	81.4	122.4
P-3428	11	80.4	32.6	128.3
NL-VS-02	12	63.4	73.8	53.1

* Los genotipos con la misma letra son estadísticamente iguales en la prueba de comparación de medias de Duncan al 0.05.

¿TESTIGOS? (S)

Los valores obtenidos en promedio para cada una de las dos fechas de siembra, resultaron ser muy elevados en comparación con lo permitido en México por la Secretaría de Salud y Asistencia que es el organismo responsable de verificar la calidad de los alimentos para consumo humano y lo cual estipula que los productos para tal fin no deberán presentar una concentración de **aflatoxinas** mayor de 20 ppb (Villarreal 1992, Acosta 1994 y Torres 1996). Así mismo, la anterior información permite confirmar que la cepa del hongo *A. flavus* utilizada en la presente investigación, efectivamente era productora de

aflatoxinas y que las condiciones ambientales que se presentaron el las fechas de siembra fueron adecuadas para la síntesis de ellas. Por otro lado, ya que estos valores son productos de la inoculación artificial, es posible que estas altas concentraciones de **aflatoxinas** no pudieran haberse presentado en los materiales genéticos de maíz de forma natural, por lo que deben reunirse ciertas condiciones ambientales y características fisiológicas de los maíces.

Los resultados obtenidos para cada uno de los 12 genotipos indican que los granos de éstos no presentan calidad para consumo humano y se podrá recomendar el uso del producto para alimento de ganado, ya que para ello el uso del grano tolera concentraciones hasta 200 ppb (Villarreal 1992, Acosta 1994 y Torres 1996). Así mismo, los resultados indican que las variedades consideradas, son susceptibles a ser altamente contaminadas con **aflatoxinas**, por lo cual se sugiere que al establecerse estas variedades en forma extensiva, se deben tomar muestras de grano rutinariamente y ser sometidas a análisis de evaluación de contenido de **aflatoxinas**.

Los efectos de interacción de fechas de siembra y genotipos no resultaron significativas, no obstante existe una amplia variación entre el mínimo y máximo valor promedio en cada fecha de siembra (32.5 y 151.2 ppb en la primera y 53.1 y 134.2 ppb para la segunda). La no significancia de efectos de interacción podría ser explicado porque la cantidad de repeticiones que se utilizó para estimar esta variable fue de solamente 2. Lo anterior, tuvo como consecuencia que los grados de libertad del error del ANAVA sean menores que con la utilización de un mayor número de repeticiones, lo cual, posiblemente provocó que el valor del cuadrado medio del error proporcionalmente fuera mayor y pudo

evitar detectar diferencias significativas entre los niveles de los factores de variación de interés. La utilización de una baja cantidad de repeticiones, se debió a la aplicación del método analítico tipo ELISA denominado Veratox (Neogen Corp., 1996) cuyos resultados son de alta confiabilidad, pero de alto costo económico.

Los mayores valores promedio de contenido de **aflatoxinas** en la mayoría de los genotipos en la fecha de siembra 1 (UAAAN-2, UAAAN-3 Pob'30, Pinto Amarillo, Blanco la Purísima, Blanco Hualahuises, NL-VS-02) con respecto a la segunda fecha de siembra, puede ser explicado en parte, por el hecho de que posiblemente el hongo parasitó por un lapso mayor de tiempo los granos de mazorca cosechados en la fecha de siembra 1 y en consecuencia haya liberado en ellos una mayor cantidad de residuos metabólicos (**aflatoxinas**). El mayor tiempo de parasitismo pudo haber sido como consecuencia probablemente, de una mayor duración del período de llenado de grano, debido a que las temperaturas mínimas fueron menores que en la fecha de siembra 2, lo cual como ya se mencionó tiene como consecuencia mayor duración de las etapas fenológica. Sin embargo, también pudo haber influido el tiempo transcurrido desde la cosecha hasta la fecha de realización de los análisis químicos de las muestras de grano, que fueron para la fecha de siembra 1, de cuatro meses y para la fecha de siembra 2 de tres meses.

Con respecto a la variación mostrada de los otros cinco genotipos (AUN-1, NL-U-127, Ranchero, H-433 y P-3428), que fue diferente a lo mostrado anteriormente, cabe mencionar que esto pudiera ser consecuencia del hecho de que posiblemente los granos muestreados para el caso de la primera fecha de siembra no fueron realmente representativos de la contaminación en sus respectivas mazorcas, como resultado de la

distribución aleatoria de los granos de las mazorcas de maíz. contaminados por **aflatoxinas** (Dunlap, 1994), lo cual puede tener como consecuencia demasiada variación en las concentraciones de cada muestra evaluada. Es por esto que Garza (1994) recomendó tomar muestras de 5 kg de granos de maíz del lote a evaluar, con el fin de contar con mayor precisión en la detección de **aflatoxinas**.

Los valores registrados de contenido de **aflatoxinas** en todos los casos estudiados son considerados como altos (> 20 ppb), lo cual sugiere en principio, que al menos en la localidad de prueba y con los genotipos evaluados; se debe considerar en forma rutinaria llevar a cabo análisis de **aflatoxinas** en las muestras de granos, aun y cuando no se inocule artificialmente al hongo, ya que como se mencionó las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo del hongo. Sin embargo, dado que los presentes resultados son de un año de evaluación y con inoculación artificial del hongo, se recomienda continuar el estudio por varios años más con la presencia e infección de *A. flavus* y contenido de **aflatoxinas**, considerando además de la inoculación artificial, tratamientos testigos con cero inoculación; para verificar la existencia de infección natural del hongo en la región estudiada y considerando en los tratamientos testigo el análisis de infección por el hongo y contenido de **aflatoxinas**. Así mismo, se sugiere que se mida con mayor precisión las variaciones climáticas en las áreas de estudio para caracterizar mejor el ambiente de prueba. De igual forma y con el fin de tener información que explique mejor las variaciones entre y dentro de genotipos en su respuesta a la incidencia de *A. flavus* y contenido de **aflatoxinas**, se sugiere considerar otras variables de planta y grano tales como son días a madurez fisiológica y contenido de humedad del grano al momento de la cosecha.

V. CONCLUSIONES

Considerando que el presente estudio corresponde a un solo ciclo de evaluación con dos fechas de siembra y para las condiciones ambientales y de manejo de cultivo a que estuvieron sometidos los genotipos, en base a los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1.- La sensibilidad de los genotipos en cuanto a la duración de las etapas fenológicas en respuesta a las variaciones de temperatura inducidas por dos fechas de siembra, esta directamente relacionado con la amplitud de su ciclo biológico. En los casos de días a floración masculina y días a floración femenina en las dos fechas de siembra los genotipos más precoz y más tardío resultaron ser respectivamente UAAAN-1 y Pinto Amarillo. Así mismo ambas variables mostraron menor expresión en la segunda fecha de siembra con respecto a la primera.

2.- El rendimiento de grano de los genotipos fue afectado por las variaciones en las condiciones ambientales en los cuales se evaluaron, observandose mayor rendimiento de grano en la primera fecha de siembra con respecto a la segunda. El genotipo con mayor rendimiento de grano resultó ser Ranchero; en tanto que el de menor rendimiento fue Pinto Amarillo.

3.- Las variaciones de las condiciones ambientales entre fechas de siembra afectó numéricamente la infección de granos por *A. flavus*; los genotipos mostraron mayores valores numéricos en la segunda fecha de siembra. Existe variación numérica entre genotipos en el grado de infección de *A. flavus* clasificándose todos como susceptibles.

4.- Los granos de los 12 genotipos de maíz en las dos fechas de siembra resultaron con contenidos de aflatoxinas que sobrepasan las normas establecidas para consumo humano y fue afectado numéricamente por las variaciones de las condiciones ambientales entre fechas de siembra, mostrando mayor contenido en la primera.

VI. LITERATURA CITADA

- Acosta N., S. 1994. Antecedentes Históricos E Importancia de la Contaminación con Aflatoxinas. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 3-8.
- Aguirre R., J. I. 1976. Determinación de aflatoxinas en alimentos balanceados para puercos y conejos en el área de Monterrey, N.L. Tesina de Licenciatura, Facultad de Agronomía, UANL. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. Méx. 11 P.
- Arroyo T., G. A. 1995. Cuantificación de Aflatoxinas e Identificación del Hongo *Aspergillus* spp. Productor, en el Maíz Contaminado del Estado de Tamaulipas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas. UNAM, México D.F. 83 p.
- Castrellón S., J. L. 1996. Metabolismo de las Aflatoxinas. In: Memorias del Curso Teórico-Práctico: Aflatoxinas y otros Factores Etiológicos, Diagnóstico y Tratamiento del Carcinoma Hepatocelular. L.E. Muños E., E. Torres de N. y L. Naccha de C. (Comps.). Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L. Méx. p.p. 17-26.
- De la Garza, J. L. 1994. Biología y Ecología de *Aspergillus flavus*. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (Eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 9-14.
- De la Garza J. L. 1996. Fitopatología General. Cd. Universitaria, UANL. San Nicolás de los Garza, N.L. Méx. p.p. 321-330.

- Díaz F., A. 1994. Biosíntesis de Aflatoxinas. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (Eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 15-18.
- Dunlap., J. R. 1994. Fisiología del Maíz y Efecto del Clima sobre la Presencia de Aflatoxinas. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (Eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 19-32.
- El Norte, Diario 1995. Capta CONASUPO maíz contaminado. Sección de Agronegocios. Monterrey N.L. Méx.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Universidad Autónoma de México. 246 p.
- Garza C., I. 1994. Análisis de Muestras en el Laboratorio para Detectar Aflatoxinas. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (Eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 63-66.
- INEGI. 1996. Anuario Estadístico del Estado de Nuevo León, 1994-1995. Aguascalientes Ags. Méx. p.p. 253-255.
- Larcher, W. 1977. Ecofisiología Vegetal. J. Lalucat. (Trad.). Ediciones Omega S.A., Barcelona. 305 p.
- Loredo C., I. 1978. Determinación de aflatoxinas en sorgo y maíz almacenados en el área de Monterrey, N.L. Tesina de Licenciatura. Facultad de Agronomía, UANL. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. Méx. 16 p.

- Macías R., J. R. 1992. Evaluación del Paquete Tecnológico para Maíz Bajo Riego en el Norte de Tamaulipas con Respecto a la Incidencia de Aflatoxinas. Tesina. Fac. de Agronomía, UANL. Marín N.L. Méx. 38 p.
- Martínez R., M., C. G. S. Valdés, y W. M. Hernández A. 1997. Factores Responsables de las Cosechas Contrastantes de Maíz en Control, Tamaulipas, Durante 1991 y 1992. Ciencia Agropecuaria. FAUANL. 7(2):3-14.
- Martínez J. 1996. Recuento por Dilución de Glóbulos Rojos. Práctica N° 7, Manual de Prácticas del Laboratorio de Micología Médica. Fac. de Biología, UANL. San Nicolás de los G. N.L. Méx. p.p. 74-76.
- Monárrez, J. L. C. 1994. Evaluación de Aflatoxinas en Maíz (*Zea mays*) Centro Norte del Estado de Tamaulipas. Tesis de Licenciatura. U.A. Chapingo. Bermejillo Dgo. 67 p.
- Montoya O. R. 1996. Identificación y Cuantificación de las Aflatoxinas. In: Memorias del Curso Teórico-Práctico: Aflatoxinas y otros Factores Etiológicos, Diagnóstico y Tratamiento del Carcinoma Hepatocelular. L.E. Muños E., E. Torres de N. y L. Naccha de C. (Comps.). Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L. Méx. p.p. 47-54.
- Mora C., G. F. 1978. Determinación de aflatoxinas en 25 colectas de maíz *Zea mays* L. en Marín N.L. Ciclo Primavera-verano 1977. Tesina de Licenciatura. Facultad de Agronomía, UANL. Monterrey N.L. 13 p.
- Moreno, M. E. 1994. Manejo de Cosecha y Poscosecha del Maíz para Reducir el Riesgo de Aflatoxinas. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (Eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 38-51.

- Naccha T., L. 1996. Toxicidad de las Aflatoxinas. In: Memorias del Curso Teórico-Práctico: Aflatoxinas y otros Factores Etiológicos, Diagnóstico y Tratamiento del Carcinoma Hepatocelular. L.E. Muños E., E. Torres de N. y L. Naccha de C. (Comps.). Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L. Méx. p.p. 27-46.
- Neogen Corp. 1996. VERATOX Agri-Screen Cuantitativo para la Determinación de Aflatoxinas. Neogen Corp. Lansing, MI. U.S.A. 6 p.
- Olivares S. E. 1995. Diseños Experimentales con Aplicación a la Experimentación Agrícola. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Méx. 291 p.
- Poehlman, J. L. 1965. Mejoramiento Genético de las Cosechas. N. Sanchez D. (Trad.). Ed. LIMUSA, México D.F. p.p. 22-95.
- Reyes M., C., L. A. Rodríguez del B., R. Sanchez de la C., R. García V., R. Girón C., A. Rodríguez C., I. Garza C., y J. A. Morales H. 1991. Centro de Investigaciones Regional del Noreste, Campo Experimental Río Bravo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos. Río Bravo Tamps. Méx. Informe Técnico 1991.12 p.
- Reyes M., C. 1994. El Mejoramiento Genético como Herramienta para Reducir las Aflatoxinas en Maíz. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 33-38.
- Rodríguez del B., L. A. 1994. El Impacto de los Insectos y Prácticas Culturales sobre la Contaminación del Maíz con Aflatoxinas. In: Memorias. I Curso-Taller sobre Aflatoxinas en Maíz. L.A. Rodríguez del B. y H. Gámez T. (eds.) INIFAP-SARH. Río Bravo, Tamps. Mex. p.p. 24-32.

- Rodríguez del B. L. A., C. A. Reyes M., S. Acosta N., J. R. Girón C., I. Garza C., y R. García V. 1995. Control de Aflatoxinas en Maíz en Tamaulipas. INIFAP-SARH. Río Bravo. Tamps. Méx. Folleto Técnico N° 17 19 p.
- S.A.G.A.R. 1996. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola en México, 1995. Centro de Estadística Agropecuario Méx. D.F.
- Scott, G.E., and N. Zummo, 1988. Sources of Resistance in Maize to Kernel Infection by *Aspergillus flavus* in the Field. *Crop. Sci.* 28:504-507.
- Torres N.,E. 1996. Aspectos Generales de las Aflatoxinas. In: Memorias del Curso Teórico-Práctico: Aflatoxinas y otros Factores Etiológicos, Diagnóstico y tratamiento del Carcinoma Hepatocelular. L.E. Muñoz E., E. Torres de N. y L. Naccha de C. (Comps.). Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L. Méx. p.p. 6-16.
- Vicam Co. 1996. Aflatest. Micotoxin Testing Sistem. Vicam Co. 50 p. U.S.A.
- Villarreal H., M. 1992. Las Aflatoxinas en Maíz y su Incidencia en el Área de Riego del Norte de Tamaulipas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Agronomía, UANL. Marín N.L. México. 53 p.

APENDICE

Cuadro 1A. Comparación entre fechas de siembra de los días a floración masculina y femenina de 12 genotipos de maíz ordenados en forma ascendente. Ciclo Primavera-Verano, 1996. Facultad de Agronomía, UANL. Marín N.L. Comparación de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Genotipos	Floración masculina				Floración femenina			
	Fecha de Siembra 1	Fecha de Siembra 2	Diferencia.	Fecha de Siembra 1	Fecha de Siembra 2	Diferencia.		
UAN-1	82.7	74.8	07.9	84.6	80.0	04.6		
Ranchero	85.0	75.5	09.5	86.6	80.2	06.4		
UAN-3	85.6	75.2	10.4	85.6	80.0	05.6		
Blanco Hualahuises	86.0	74.5	11.5	88.6	81.2	07.4		
P-3428	87.0	75.5	11.5	89.3	81.5	07.8		
NL-U-127	87.0	74.7	12.3	89.0	80.7	08.3		
Blanco la Purísima	87.3	74.5	12.8	90.0	80.2	09.8		
H-433	88.0	75.5	12.5	90.3	81.7	08.6		
Pob'30	89.6	77.0	12.6	92.0	82.7	09.3		
UAN-2	90.3	75.7	14.6	92.3	81.5	10.8		
NL-VS-02	91.0	75.2	15.8	93.0	81.5	11.5		
Pinto Amarillo	93.6	77.5	16.2	96.6	83.0	13.6		
Promedio	87.8	75.5	12.3	89.8	81.1	8.5		

Cuadro 2A. Sincronía de los días a floración masculina y femenina de los 12 genotipos de maíz, ordenados de acuerdo al rendimiento (de mayor a menor) en dos fechas de siembra. Ciclo Primavera-Verano, 1996. Facultad de agronomía, UANL. Marín N.L. Comportamiento de 12 genotipos de maíz y su respuesta a la inoculación artificial de *A. flavus* en dos fechas de siembra.

Genotipos	Fecha de siembra 1				Fecha de siembra 2				
	Flor. Masculina	Flor. Femenina	Sincronía	Flor. Masculina	Flor. Femenina	Sincronía	Flor. Masculina	Flor. Femenina	Sincronía
NL-U-127	87.0	89.0	2.0	74.7	80.7	6.0			
H-433	88.0	90.3	2.3	75.5	81.7	6.2			
Rancho	85.0	86.6	1.6	75.5	80.2	4.7			
Blanco la Purísima	87.3	90.0	1.7	74.5	80.2	5.7			
UAN-1	82.6	84.6	2.0	74.7	82.0	7.3			
Blanco Huatahuises	86.0	88.6	2.6	74.5	81.2	6.3			
P-3428	87.0	89.3	2.3	75.5	81.5	6.0			
UAN-3	85.6	85.6	0.0	75.2	80.0	4.8			
NL-VS-02	91.0	93.0	2.0	75.2	81.5	6.3			
Pob'30	89.6	92.0	3.6	77.0	82.7	5.7			
UAN-2	90.3	92.3	2.3	75.7	81.5	5.8			
Pinto amarillo	93.7	96.6	2.9	77.5	83.0	5.5			
Promedio	87.8	89.8	2.1	75.5	81.4	5.9			

