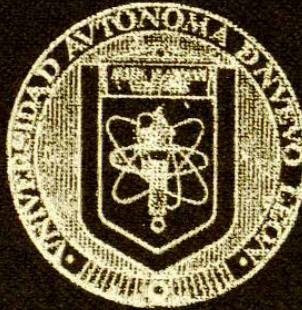


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PREVALENCIA DE *Aspergillus sp.* y AFLATOXINAS
EN EL MAIZ CULTIVADO POR LABRANZA
CONVENCIONAL Y DE CONSERVACION

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR

Q.F.B. ENRIQUETA MARTINEZ ROJAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. MAYO DE 1999

TM

SB608

.M2

M3

1999

c.1



1080092558

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PREVALENCIA DE *Aspergillus sp.* y AFLATOXINAS EN EL MAÍZ
CULTIVADO POR LABRANZA CONVENCIONAL Y DE
CONSERVACIÓN.

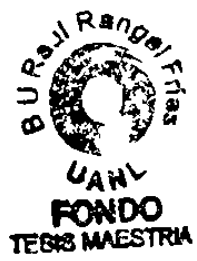
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA
POR

QFB ENRIQUETA MARTINEZ ROJAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

MAYO DE 1999



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



PREVALENCIA DE *Aspergillus sp.* y AFLATOXINAS EN EL MAÍZ
CULTIVADO POR LABRANZA CONVENCIONAL Y DE
CONSERVACIÓN,

POR

QFB ENRIQUETA MARTINEZ ROJAS

APROBADA

COMISIÓN DE TESIS

Dr, José Santos García Alvarado
Presidente

Dra, Norma Laura Heredia Rojas
Secretario

Dr, Rafael Castro Franco
Vocal

PREVALENCIA DE *Aspergillus sp* Y AFLATOXINAS EN EL MAÍZ CULTIVADO POR LABRANZA CONVENCIONAL Y DE CONSERVACIÓN.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría de la Dra. María de los Angeles Peña del Río, la Dra. Norma Laura Heredia y del Dr. Rafael Castro Franco.

Esta investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental General Terán, N.L.

"Querer es un gran poder.....Porque la actividad y el trabajo proceden generalmente de la Voluntad, y el trabajo casi siempre va acompañado del éxito. Trabajo, Voluntad y éxito llenan la vida de un hombre. La voluntad abre las puertas del éxito, brillante y feliz; el trabajo traspone estas puertas, y al final del viaje el éxito corona los esfuerzos realizado.

Louis Pasteur. (1837)

Dedicatoria.

Insuficiente es el espacio para dedicar y agradecer a algien, que en su paso por la tierra solo proclamó el amor, tan grande y misericordioso es, que dió su vida para redimirnos. Nos has otorgado innumerables cosas, dones grandiosos que nadie mas puede dar, pero lo más hermoso que hemos tenido de tí "JESUCRISTO" es la vida, gracias por otorgarme un nuevo logro profesional, mismo que comparto con todo mi cariño, respeto y admiración a mis adorados padres: LUCY y J. GUADALUPE, por ser lo mejor que Dios puso en mi destino y por estar siempre a mi lado, como ejemplo vivo de amor desinteresado y libertad incondicional. A mis hermanos: LUPITA, JUAN RAMÓN, NAPOLEÓN y LUCY, por los pocos, pero substanciosos momentos que hemos vivido, esperando que los genes que tenemos en común sean eternos e indestructibles. También a los nuevos integrantes de mi familia: LORE, porque contigo se marca una nueva etapa en la familia. En especial y con todas la fuerzas que un ser puede amar, a ti pequeño PABLO, por que con tu llegada, traes un motín colmado de bendiciones y unidad familiar. A mis incontables amistades, por demostrarme, que aún en tiempos tempestuosos, siempre hay algo por el cual debemos luchar incansablemente



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo brindado, para realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. José Santos García, Dra. Norma Laura Heredia Rojas y el Dr. Rafael Castro, por sus asesorías, y participar activamente en el seguimiento de este trabajo.

A la Dra. María de los Angeles Peña del Río y el Dr. Luciano Vázquez Palacios (INIFAP), por todo el apoyo otorgado, por los consejos agronómicos que enriquecieron el presente trabajo de investigación

A la M.C. Graciela García Díaz y el Q.C.B. Juan Pedro Castellón Santana por compartir toda su amplia experiencia cromatográfica, pero más que nada por su apoyo desinteresado y su honesta amistad que permanecerán por toda la eternidad a mi lado.

A mis únicos amigos y compañeros de laboratorio: Geno, Jehù, Rubén, Licet, Faby y Adrián por mostrarse siempre sinceros, por todo los momentos agradables que pasamos juntos

A la I. A. Ma. Guadalupe Rojas Verde, compartir su experiencia estadística, pero más que nada por la oportunidad de reanudar nuestros lazos amistosos.

A mi eterna maestra GELA (Ma. de los Angeles V.M.), por ser del grupo privilegiado en donde se encuentran las personas que más han dejado huella en mi vida personal y profesional, por creer en mí, por invitarme a probar las delicias de la superación personal.

A mi adorada UASLP, y en especial al personal del lab. de Micología, por darme el mejor regalo que un hombre puede dar: su apoyo moral y ayuda incondicional, "esta meta concluida también lo es de ustedes".

A mis compañeros de maestría, que de alguna manera influyeron en mi persona para ser cada vez mejor, simplemente gracia: Daniel Molina, Gerardo de Jesús Sosa y Ninfa Rosas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|----------------------------|------|
| Dedicatoria..... | I |
| Agradecimientos..... | III |
| Índice de contenido..... | IV |
| Lista de tablas..... | V |
| Lista de figuras..... | VII |
| Lista de abreviaturas..... | X |
| Abstract..... | XI |
| Resumen..... | XIII |
| Introducción..... | 1 |
| Antecedentes..... | 4 |
| Hipotesis..... | 19 |
| Objetivos..... | 20 |
| Material y Métodos..... | 21 |
| Resultados..... | 28 |
| Discusión..... | 87 |
| Conclusion..... | 93 |
| Literatura citada..... | 94 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1.- Especies fúngicas y sus toxinas..... | 9 |
| Tabla 2.- Híbridos de maíz utilizados en labranza de conservación y tradicional en General Terán, N. L. 1997..... | 21 |
| Tabla 3.- Presencia de hongos en 208 muestras tratadas bajo dos procedimientos de aislamiento..... | 29 |
| Tabla 4.- Cepas presentes en muestras de maíz aisladas por dos tratamientos diferentes..... | 30 |
| Tabla 5.- Número más probable de esporas/g de maíz en tres diferentes muestreos y en dos tipos de labranza..... | 31 |
| Tabla 6.- Muestras tomadas en diferentes períodos de tiempo..... | 37 |
| Tabla 7.- Número de esclerocios/g en dos diferentes profundidades de suelo tratado con labranza convencional y en conservación..... | 44 |
| Tabla 8.- Identificación de cepas aisladas a partir de esclerocios de muestras de suelo en diferentes épocas del año..... | 45 |
| Tabla 9.- Porcentaje de viabilidad de los esclerocios aislados de suelo a dos profundidades en dos métodos de labranza.... | 46 |
| Tabla 10.- Porcentaje de viabilidad de esclerocios y su relación con la temperatura ambiental media..... | 47 |

| | |
|--|----|
| Tabla 11.- Concentración (ppb) de aflatoxinas en maíz muestreado en el primer período..... | 68 |
| Tabla 12.- Concentración (ppb) de aflatoxinas en maíz muestreado en el segundo período..... | 70 |
| Tabla 13.- Concentración (ppb) de aflatoxinas en maíz muestreado en el tercer período..... | 72 |
| Tabla 14.- Determinación de la concentración de aflatoxina (ppb/mg de micelio), sintetizadas por las cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> | 82 |
| Tabla 15.- Concentración de las aflatoxina (ppb/mg de micelio) encontradas en las diferentes cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> | 83 |
| Tabla 16.- Concentración de aflatoxinas (ppb/mg de micelio) en cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> aisladas de esclerocios.. | 84 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1.- Determinación de la flora fúngica presente en muestras de maíz con dos tipo de labranza en el período de Primavera de 1997..... | 33 |
| Fig. 2.- Presencia de flora fúngica en maíz cultivado por medio de labranza en conservación y convencional en el período de Otoño de 1997. | 34 |
| Fig. 3.- Presencia de flora fúngica en muestras de maíz por labranza en conservación y convencional en el período de Invierna de 1997... | 35 |
| Fig. 4.- Flora fúngica en muestras de maíz por medio de labranza en conservación y convencional en tres períodos de muestreo (Verano, Otoño e Invierno de 1997)..... | 36 |
| Fig. 5.- Determinación de esclerocios a 10 cm de profundidad de suelo en labranza convencional..... | 40 |
| Fig. 6.- Determinación de esclerocios a 10 cm de profundidad de suelo en labranza conservación..... | 41 |
| Fig. 7.- Determinación de esclerocios a 20 cm de profundidad de suelo en labranza convencional..... | 42 |
| Fig. 8.- Determinación de esclerocios a 20 cm de profundidad de suelo en labranza conservación..... | 43 |
| Fig. 9.- Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los esclerocios 10 y 20 cm. de profundidad de suelo con labranza convencional.. | 50 |

| | |
|--|----|
| Fig. 10.- Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de los esclerocios 10 y 20 cm. de profundidad de suelo con labranza conservación.. | 51 |
| Fig. 11.- Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esclerocios a 10 cm de profundidad de suelo con labranza en conservación y convencional..... | 52 |
| Fig. 12.- Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esclerocios a 20 cm de profundidad de suelo con labranza en conservación y convencional..... | 53 |
| Fig. 13.- Cromatograma con una mezcla de aflatoxinas..... | 56 |
| 10 | |
| Fig. 14.- Cromatograma de la solución derivatizante..... | 57 |
| Fig. 15.- Cromatograma de la curva de calibración..... | 58 |
| Fig. 16.- Cromatograma de un extracto de maíz resistente al ataque por hongos aflatoxigénicos..... | 59 |
| Fig. 17.- Cromatograma del medio de cultivo (A&M) utilizado para el crecimiento de cepas aflatoxigénicas..... | 60 |
| Fig. 18.- Curva de calibración del estándar de AFB ₁ | 63 |
| Fig. 19.- Curva de calibración del estándar de AFB ₂ | 64 |
| Fig. 20.- Curva de calibración del estándar de AFG ₁ | 65 |
| Fig. 21.- Curva de calibración del estándar de AFG ₂ | 66 |
| Fig. 22.- Distribución de aflatoxina G ₁ en maíz con labranza en conservación..... | 75 |

| | |
|---|----|
| Fig. 23.- Distribución de aflatoxina B ₂ en maíz con labranza en conservación..... | 76 |
| Fig. 24.- Distribución de aflatoxina B ₂ en maíz con labranza convencional..... | 77 |
| Fig. 25.- Distribución de aflatoxina B ₁ en maíz con labranza en conservación..... | 78 |
| Fig. 26.- Distribución de aflatoxina B ₁ en maíz con labranza convencional..... | 79 |
| Fig. 27.- - Distribución de aflatoxina G ₂ en maíz con labranza en conservación..... | 80 |
| Fig. 28.- - Distribución de aflatoxina G ₂ en maíz con labranza en convencional..... | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| AFB ₁ | aflatoxina b1 |
| AFB ₂ | aflatoxina b2 |
| AFG ₁ | aflatoxina g1 |
| AFG ₂ | aflatoxina g2 |
| ANOVA | análisis de varianza |
| cm | centímetro |
| CLAR | cromatografía de líquidos de alta resolución |
| °C | grados centígrados |
| g | gramo |
| h | hora |
| mts | metros |
| µL | microlitros |
| mL | mililitro |
| min | minutos |
| PDA | agar papa dextrosa |
| Psi | Libras por pulgada |
| % | porciento |
| sp. | Especies |

ABSTRACT

Corn is the main agricultural product in several countries. However, this crop is frequently attacked by mycotoxigenic fungi such as *Aspergillus* and *Fusarium*. The implications of preharvest aflatoxin contamination in maize have led to evaluate cultural practices to reduce the problem. Since the environmental factors also play an important role in fungi contamination, it is important to determine their influence in the presence of the fungal flora in and their infective forms. In particular sclerotia could represent a principal source of overwintering inoculum in cereal agroecosystems. In this work we determined the fungi present in corn, and sclerotia of *Aspergillus* in soil, in two different seasons (first season July-Aug, second Nov-Dec 1997) and in two different tilling methods (conservative and traditional). For the experiments the corn hybrid Blanco Hualauises was used. Fungal spores were determined from corn by plate count. Sclerotia were detected by sieving samples of soil, then they were inoculated in PDA and identified. Fungi were identified by colony appearance. The Fuskey software was used to identify the *Fusarium* isolates. Results showed that *Aspergillus* predominate in the fungal flora of the first season, *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.* were ranked in the next places. In the second season *Penicillium sp.* was the fungi mostly found, although other species such as *A. flavus*, *A. terreus*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* and *F.*

solani were present. No significant differences were present in the fungal population between the two tilling methods. Isolates from sclerotia were identified as *A. niger* (40%), *A. terreus* (30%) and *A. flavus* (20%), however the numbers were higher in the second season. These results indicate that the fungal flora and the numbers of sclerotia present in corn and soil are dependants on the season. It is also important to note the predominance of *Aspergillus* in the first season and the presence of *Fusarium*.

RESUMEN

El maíz es el principal producto agrícola de consumo en diversos países, el cual está sujeto a gran variabilidad de condiciones ambientales, tratamiento del suelo y procedimientos de cultivos. Los hongos al igual que otros microorganismos pueden contaminar el grano y provocan severas pérdidas de la cosecha, sin dejar aún lado la producción de cantidades considerables de toxinas, que dañan tanto al hombre como a los animales una vez que estos las ingieren. Existen estructuras fúngicas cuya función es proporcionar resistencia a condiciones ambientales adversas, dentro de ellas tenemos al esclerocio que es una masa de micelio fuertemente compacto, se localiza en la tierra o bien en partes aéreas de la planta, y tiene un papel importante en el ciclo de vida de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* principalmente.

Determinamos la incidencia de hongos en muestras de maíz cultivado por medio de la labranza en conservación y convencional, obtenidos en tres muestreos (Verano, Otoño e Invierno de 1997), además obtuvimos la distribución de esclerocios en la tierra y cuantificamos por medio de HPLC la cantidad de aflatoxinas presentes en maíz. Los géneros que predominaron en diferente proporción durante los tres muestreos como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*,. En lo que respecta a la identificación de cepas fúngicas a partir de

esclerocios, se encontró principalmente a *A. niger*, *A. terreus* y *A. flavus* con un 40%, 30% y 20% respectivamente.

Con todo lo anterior podemos decir que las practicas agrícolas influyeron de manera significativa en la presencia de hongos en las muestras de maíz.

En lo que respecta a la viabilidad de los esclerocios, estuvo influenciada por la profundidad de la tierra, así como por el tipo de labranza empleado. Además se cuantificó en mayor proporción AFG₂ y AFB₂, en las muestras de maíz, y en las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, aisladas en el presente estudio.

INTRODUCCION

Los hongos han estado en íntimo contacto con el hombre desde su origen mismo. Algunos de los géneros más importantes desde el punto de vista industrial y salud pública son: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* y *Rhizopus sp.*, entre otros. Algunas de estas cepas dan lugar a micotoxinas, entre las que destacan las aflatoxinas y fumonisinas, sintetizadas por *A. flavus* y *F. moniliforme* respectivamente. El maíz es el principal producto agrícola de consumo en diversos países, el cual está sujeto a gran variabilidad de condiciones ambientales, tratamiento del suelo y procedimiento de cultivo. Debido a las ventajas de la labranza de conservación, es importante determinar y compararla con la práctica convencional, respecto a la contaminación con hongos presentes en el maíz. En base a lo antes mencionado nos hemos propuesto en este trabajo determinar la incidencia de hongos en muestras de maíz cultivado por medio de la labranza en conservación y rotación de cultivos, obtenidos en tres muestreos. Con la finalidad de cumplir nuestro objetivos, se utilizaron híbridos de maíz con diferente manejo agronómico (labranza de conservación y tradicional), se colocaron 10 g de maíz en un matraz Erlenmeyer de 150 mL con 90 mL de solución salina al 0.85% estéril. Se agitó manualmente y del sobrenadante se efectuaron diluciones decimales,

se agregó agar papa dextrosa (PDA, DIFCO) fundido y se incubó por 10-15 días a 20-25°C. Las colonias formadas fueron tipificadas mediante la observación, producción de pigmento en el micelio basal, crecimiento, textura y diámetro de la misma. Se observó al microscopio para identificar y clasificar el género. Posteriormente se procedió al conteo de esclerocios en dos diferentes profundidades de suelo en ambos tipos de labranza, después se determinó el porcentaje de sobrevivencia de los mismos. Por último, se realizó la cuantificación de aflatoxinas en las muestras de maíz así como en las cepas aisladas, esto se efectuó por medio de cromatografía líquida de alta resolución, con la metodología propuesta por la AOAC; para la extracción y cuantificación de las mismas. Los resultados obtenidos correspondientes al aislamiento de diversos géneros fúngicos a partir de muestras de maíz, el género *Aspergillus* fue el que se encontró con mayor incidencia en el primer muestreo tanto en maíz cultivado por labranza convencional como en labranza por conservación. En segundo lugar tenemos cepas de *Fusarium sp.*, le sigue el género *Penicillium sp.*, y otros de poco interés fitopatológico. En el muestreo tenemos que el género *Penicillium sp.*, se encuentra en mayor proporción con respecto a *Fusarium sp.* y *Aspergillus* (se tipificaron *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. niger*), en el caso del tercer muestreo, se presentó mayor incidencia de hongos del grupo de los Mucorales, después le siguió el género *Penicillium sp.* *Fusarium sp.*, y escasas cepas *Aspergillus sp.*

Los esclerocios se localizaron en forma muy disgregada en el terreno, pero se tipificaron cepas que no están asociadas con la producción de aflatoxinas como *A. niger*, *A. carbonarius* etc. La viabilidad de ellos no se vio afectada por la temperatura, ya que solo la profundidad a la que fue tomada la muestra y el tipo de labranza, afectan al aumento o la disminución de ellos. En cuanto a las aflatoxinas, las cantidades determinadas fueron bajas, además el tipo de labranza afectó significativamente ($p < 0.05$) la presencia de ellas en los tres distintos muestreos. Las prácticas agrícolas influyeron significativamente en la presencia de hongos en las muestras de maíz, reduciendo la cantidad de cepas micotoxigénicas en los tres muestreos.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE LOS HONGOS

Los hongos han estado en contacto con el hombre desde su origen mismo. La importancia de estos microorganismos no solo repercute en el área industrial como buenos productores de antibióticos (Bonifaz A., 1992) y de ácidos orgánicos (Smith G., 1992), también se han asociado a cuadros clínicos severos en el hombre, animales (Rippon J. W., 1990) y plantas. Por tanto esto afecta la disminución de la calidad de diversos productos y la actividad socioeconómica de una población (S.S.M. El -Maraghy, 1996).

Algunos géneros importantes desde el punto de vista industrial y salud pública son: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.* y *Rhizopus sp.* entre otros. Varios de estos géneros fúngicos se asocian a cuadros clínicos severos en pacientes inmunosuprimidos. Por último, tenemos hongos que dan lugar a metabolitos denominados micotoxinas, entre las que destacan las aflatoxinas producidas por *Aspergillus sp.*, (principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*), y las fumonisinas que son sintetizadas por *Fusarium moniliforme* (Arenas R., 1992).

CARACTERÍSTICAS GNERALES DE HONGOS TOXIGÉNICOS.

Desde principios del siglo XVIII algunos investigadores se abocaron a la tarea de ubicar taxonómicamente a estos hongos (Rappel T. H., *et al* 1974). Sin embargo con la continua evolución de la biología molecular se han clasificado filogenéticamente gracias a la comparación de secuencias de RNA ribosomal (Taylor J. W., 1995). Los hongos pertenecen a la división de los Eumicetos, dentro de las familias de los Ascomycetes y Dueteromycetes, se encuentran la gran parte de los hongos productores de toxinas; tales como diversas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en el primer caso; además de *Alternaria sp.* y *Fusarium sp.* en el segunda familia (Quintero R. R., 1990). Las necesidades nutricionales son muy simples, pueden crecer en cualquier sustrato sin importar la fuente de carbono o de nitrógeno, además proliferan en amplios rangos de temperatura (Sclegel H. G., 1991).

a).- *A. flavus*

Se considera un hongo de crecimiento rápido, ya que en Agar Czapek después de 3 días de incubación se obtienen colonias blancas, que conforme al paso del tiempo se tornan verde olivo, de consistencia granular y en ocasiones surcada. Al reverso la colonia es incolora, pero se pueden presentar tonalidades de gris rosado o más oscuro (Rappel T. H., *et al*

1974). En condiciones adversas da lugar a esclerocios, los cuales son estructuras de resistencia hechas a base de micelio en su gran mayoría de color marrón, que se perciben a simple vista. El medio diferencial para *Aspergillus sp* es el MDA (Medio para diferenciar *Aspergillus sp.*), que es usado para una rápida detección de especies aflatoxigénicas, contiene citrato férrico que induce una coloración amarilla-naranja en el reverso de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Diener V. L., *et al* 1987a; Diener V. L., *et al* 1987b).

Su micromorfología es a base de micelio, incoloro, con conidióforos de pared gruesa, no pigmentados, burdos, largos y rugosos de 10 a 20 μm de diámetro, las vesículas son globosas o subglobosas de 10-65 μm de diámetro y muy fértiles (producen fiálides) en casi toda el área. Las fiálides se encuentran en disposición de dos series (biseriadas) o en una serie (uniseriadas); los conidios son globosos que en ocasiones presentan ligeras equinulaciones (Barnett H. L., 1985).

b).- A. parasiticus.

Es una especie que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, de crecimiento rápido, pueden obtenerse colonias después de 3 días de incubación a 25 °C. Las colonias formadas son muy blancas al inicio de su germinación, pero al paso del tiempo se torna a verde olivo, de consistencia polvosa, debido a que sus cabezas conidiales se encuentran muy compactas. En ocasiones presentan pigmentos al reverso de la colonia

y de acuerdo a las condiciones de crecimiento da lugar a esclerocios (López M. R., 1995). Al microscopio podemos observar gran cantidad de micelio hialino, septado de paredes gruesas. Los conidióforos miden 10-20 μm de diámetro, su cabeza conidial es ligeramente radiada, de la cual emergen una serie de fiálides uniseriados (Rappel T. H., *et al* 1974). En esta estructura se originan los conidios que son redondos o bien ovalados dependiendo de la cepa. Al igual que *A. flavus*, es un buen productor de micotoxinas, por tanto, se asocia a los mismos cuadros clínicos.

MECANISMOS DE INFECCIÓN DE *A. flavus* y *A. parasiticus*.

La relación entre la infección fúngica y la producción de aflatoxinas es mayor en algunos productos vegetales, cereales etc. Una de las estrategias para el control de este problema es la identificación de genes y proteínas que están involucrados en esa relación. Existen algunas esterasas que contribuyen de manera significativa en la biosíntesis de aflatoxinas (Kusumoto K., 1996). Existen otros compuestos como la quitinasa, glucanasa y otras hidrolasas que son enzimas que pueden actuar como antibióticos en plantas. Estos compuestos no atacan moléculas endógenas, pero pueden proteger a las plantas de hongos patógenos gracias a su acción lítica sobre la pared celular fúngica, cuya estructura es rica en β -1,3-glucanos y quitina, mismas que son digeridas por las quitinasas y glucanasas.

En estudios realizados por Neurcere (1995) se comprobó la actividad de las enzimas glucanasas (G_1 y G_2), obtenidas de extractos acuosos de granos de diversas variedades de maíz. Se demostró que la presencia de ésta hacía más resistente al ataque de hongos al cultivo (Duvick J. P., *et al* 1992). Además, se logró comprobar la influencia que tienen estas enzimas sobre la germinación y el desarrollo de *A. flavus*.

También se ha estudiado la producción de enzimas de *Aspergillus sp.*, con capacidad de degradar la cutícula del maíz como un posible factor de infección del grano. Se han logrado purificar las proteínas por medio de electroforesis denominándoseles C_1 y C_2 con peso de 36 kDa y 22-23 kDa respectivamente y que posiblemente están asociadas a la producción de aflatoxinas (Guo B. Z., *et al* 1996).

MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico que pueden estar presentes contaminando algunos alimentos. Algunas micotoxinas se asocian a cuadros tóxicos severos en animales y el hombre, ya que afectan a un considerable número de órganos blanco, como el pulmón, hígado, riñón, a los sistemas nervioso, endócrino e incluso al inmune. Estos compuestos pueden propiciar cuadros clínicos graves y a muchas se les considera como potentes carcinógenos ó hepatotóxicos (Kuiper G., 1995).

Algunas de las micotoxinas presentes en diversos alimentos son: aflatoxinas, ocratoxina A, zeralononas, tricotecenos, patulina, alcaloides de ergosterol así como las fumonisinas (Tabla 1). Otros compuestos que se sintetizan en menor cantidad son los ácidos kójico y ciclopiazónico. Este último es producido por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. tamarii* que utilizada en algunos alimentos fermentados de origen oriental. (Goto T., *et al* 1996).

Tabla 1.- Especies fúngicas y sus toxinas

| Especie fúngica | Micotoxina |
|-----------------------------|---|
| <i>Aspergillus flavus</i> | Aflatoxinas Esterigmatocistina Ac. aspergílico Ac. kójico Aspertoxina |
| <i>A. fumigatus</i> | Gliotoxina |
| <i>A. niger</i> | Ac. oxálico |
| <i>A. ochraceus</i> | Ocratoxina Ac. penicilicum |
| <i>A. versicolor</i> | Esterigmatocistina |
| <i>Penicillium citrinum</i> | Citrina |
| <i>P. expansum</i> | Patulina |
| <i>P. patulum</i> | Patulina |
| <i>P. viridicatum</i> | Ocratoxina Citrina |

GENERALIDADES DE LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Químicamente las aflatoxinas son derivados de las difuranocumarinas en las cuales existen 18 tipos pero hasta el momento solo se han estudiado las siguientes: Aflatoxina B₁ (AFB₁) y Aflatoxina B₂ (AFB₂), que son sintetizadas por *A. flavus*; *A. parasiticus* además produce aflatoxina G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂). Adicionalmente existen las aflatoxinas M₁ y M₂ que son productos hidrolizados de las AFB₁ y AFB₂ respectivamente y que se encuentran principalmente en productos lácteos (Diener L. U., 1985b).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS AFLATOXINAS

Debido a que los hongos que las producen son de amplia distribución geográfica, las aflatoxinas también son denominadas contaminación natural. Estas se producen y persisten cuando las condiciones climáticas de almacenamiento de los alimentos son inadecuadas. Los factores más importantes que influyen en la formación de tales toxinas durante el almacenamiento de granos son la humedad relativa en un rango de 88 a 95% (Guo B. Z., *et al* 1995) y una temperatura de 25 a 30 °C (Ellis W. O., 1991).

PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN DIVERSOS ALIMENTOS

Actualmente se han realizado un sinnúmero de publicaciones respecto a los problemas que ocasionan los hongos y algunos de sus metabolitos que, depositados en alimentos pueden provocar grandes pérdidas económicas.

En más de 50 países se tiene el propósito de la regularización de aflatoxinas presentes en un alimento. Desde 1965 la administración de drogas y alimentos de E.U.A. (FDA) en coordinación con el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y la industria, ha propuesto un programa de calidad en alimentos, mismo que ha disminuido los niveles de aflatoxinas presentes en esos productos.

Dentro de los frutos, las almendras también se encuentran expuestas al ataque de hongos. En 1993 se determinó la cantidad de aflatoxinas presentes en muestras provenientes del estado de California. Sin embargo, la concentración fue mínima, posiblemente debido a que la estructura fisiológica de la almendra es muy diferente a la presentada en el maíz (Schatzki T. F., 1996).

Las especias empleadas como condimentos, entre las que destacan la pimienta negra (*Piper nigrum*), blanca y algunas variedades de chile (*Capsicum sp*), son otros ejemplos de vegetales que no están exentos del ataque de hongos principalmente de *Aspergillus sp.*, en donde se ha

demostrado la presencia de 80 µg/g de aflatoxinas en extractos de estas plantas (Scoot P.M., *et al* 1973).

Otros productos vegetales donde se ha detectado la presencia de aflatoxinas son hierbas y plantas medicinales, (Reif K., *et al* 1995; Selim I.M., *et al* 1996), cacahuete (Schatzki T., *et al* 1996), pistachos (Neucere J., *et al* 1995), nuez (DiProssimo V., *et al* 1996), extracto de *Yucca sp.* (Barrios G. J., *et al* 1992), entre otros.

En algunos alimentos derivados del maíz se presentan estas toxinas aún después de la nixtamalización, que es el proceso preparatorio para la realización de la tortilla (Illescas R., 1995; Vasanth S., *et al* 1997). Esto probablemente se deba a que el hongo tiene la propiedad de ser resistente al calor y a muchas sustancias químicas (Bazúa D. C., 1979; Guzman D., 1995; Smith G., 1992).

MÉTODOS DE CONTROL DE LA FORMACIÓN DE AFLATOXINAS

Algunos fungistáticos como la Iprodiona, que inhibe el crecimiento micelial de los hongos así como la formación de aflatoxinas, se ha empleado a dosis de 5 µg/ml para *A. ochraceus* y de 20 µg/mL para *A. flavus*, mismas que retardan el crecimiento y la síntesis de ácido ciclopiazónico (Munimbazi C., *et al* 1996). Otros compuestos químicos como el alcohol pentaclorobenzílico, ftaldehído (Wheeler M. H., *et al* 1995), glucósidos triterpenoides (Kirmizigül S., 1996; Jones F. T., *et al* 1996) y algunos alcanos

de 6 a 12 carbonos (Zeringue H.L., *et al* 1996). Principalmente, presentaron un ligera reducción en las concentraciones de aflatoxinas presentes en maíz. Además, en estudios recientes se han reportado compuestos de origen vegetal que a diversas concentraciones podrían inhibir la biosíntesis de aflatoxinas (Goodrich T. M., 1995; López M. A., *et al* 1997).

Se han implementado estrategias para el almacenamiento efectivo de granos; por ejemplo el control del crecimiento y la producción de aflatoxinas en cacahuates bajo condiciones atmosféricas especiales como la mezcla de bióxido de carbono con oxígeno, que combinados con una temperatura óptima aumentan el tiempo de preservación (Ellis O. W., 1993; 1994a y 1994b).

Existen nuevas estrategias para el control y la reducción de la contaminación en los procesos de precosecha. Entre estos se han reportado la utilización de agentes biológicos capaces de inhibir la producción de aflatoxinas (Dorner J. W., *et al* 1992). En particular, se buscan aquellos que bloquean el punto exacto de síntesis de aflatoxinas, es decir la inhibición de los genes que dan lugar a estos compuestos (Payne G.A., *et al* 1992).

Se han estudiado diferentes extractos de diversos genotipos de maíz resistentes y susceptibles al ataque de *A. flavus* (Guo B.Z., 1998). Por medio de electroforesis en poliacrilamida se demostró la presencia de algunas proteínas presentes en el maíz que conferirían protección al ataque

de *A. flavus*. Estas podrían utilizarse en ingeniería genética para el mejoramiento de cepas toxigénicas.

Otros procesos de biocontrol son aquellos en donde se implica la participación de cepas de *A. flavus* atoxigénicas, que al interactuar con el cultivo compiten en crecimiento con el de cepas toxigénicas (Shubha P. K., *et al* 1996). También existen reportes en donde algunas cepas de hongos como *Fusarium sp.* y *A. niger* inhiben el crecimiento del género *Aspergillus* por competitividad biológica (Wicklowsky, D. T., *et al* 1987).

FACTORES ABIOTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS

Algunos de los factores abióticos que participan en la propagación de esporas de diversos hongos principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus* son:

1.- Transporte de esporas por acción mecánica del viento y de insectos

En este último caso, la propagación de esporas se puede realizar gracias a que se adhieren al insecto y se depositan en otros lugares, y cuando el animal provoca heridas a la planta favoreciendo el proceso de infección (McMillan W. W., 1986).

2.- Distribución geográfica de los esclerocios.- Se ha estudiado la germinación de *A. flavus* a partir de esclerocios enterrados en suelo arenoso a 10 y 12 cm por 36 meses; y se demostró que dichas estructuras permanecían viables hasta por tres años, aunque el número de ellos varía de acuerdo a la cepa y localidad geográfica (Wicklowsky D. T., *et al* 1993).

Aunque varios factores en el campo pueden contribuir a las altas concentraciones de aflatoxinas, el estrés por agua parece ser el factor que mayormente incide sobre la producción de estos metabolitos (Payne G. A., *et al* 1985;1986).

3.- Tratamiento de la tierra para cultivares.- Se tiene información que la contaminación microbiana de ciertos cultivos como el maíz, se inicia en precosecha. Esto es debido a que desde la preparación de la tierra se tiene la presencia de esclerocios que se instalan (primer inoculo) en el suelo y en la planta, en donde comienzan su ciclo reproductivo. A pesar de los cambios bruscos de temperatura y de pH, las formas viables de los hongos principalmente *A. flavus* no se alteran en tales situaciones, por lo que estos puede dañar la planta entera y posteriormente a el grano (Mc Gee D. C., *et al* 1996).

La época de sequía, las altas temperaturas, etc., pueden ocasionar el establecimiento de diversos microorganismos que proliferen y algunos tienen la capacidad de sintetizar metabolitos tóxicos, por ejemplo *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Penicillium sp*, entre otros (Sisson P. F., 1986; Hussein A. M., 1986). Existen algunos factores físicos de defensa por parte de la planta que pudieran hacer más difícil la entrada del hongo, entre estas tenemos: a) grosor del pericardio que no es fácilmente penetrable, b) factores químicos en los esterigmas y c) cubierta de las brácteas.

La tierra en donde se siembra el maíz, juega un papel muy importante sobre la presencia de ciertos microorganismos que dañan los productos agrícolas. Se debe preparar el suelo con la finalidad de tener condiciones ideales para la siembra y germinación, y realizar una cosecha de alta calidad. Los expertos indican que algunas de las prácticas anteriores pueden ser eliminadas o aplicarse con menor frecuencia e intensidad (Jones R. K., 1986).

Antes del establecimiento de cultivos, la práctica de rotación del suelo permite la disgregación del mismo, de tal forma que no presente obstáculos para el mejoramiento de siembras y permiten la exposición a la interperie de semillas y raíces de la maleza. También se logra la eliminación o disminución de algunas plagas del suelo, ciertos hongos, bacterias, artrópodos y parásitos, los que mueren al quedar expuestos al sol, al aire y a otros factores climatológicos (Hughes H. D., 1970).

Los tipos de labranza se clasifican en:

A).- **Labranza primaria**, esta subdividida en: labranza tradicional, en la cual se trabaja todo el terreno por medio de arados de vertedera o discos, cinceles y rastras, que remueven la totalidad de la superficie del suelo. Otro subgrupo es la labranza en franjas, que puede ser en franjas anchas o bien en franjas angostas; la primera se trabaja de 20 a 30 cm de superficie,

dejando la mayoría del residuo de la cosecha anterior. Posteriormente se puede cultivar para dar origen a nuevos surcos. En lo que respecta a la labranza angosta se trabaja solamente de 5 a 10 surcos. Algunos nombres comunes para denominar este sistema son: no labranza, cero labranza y siembra en hendiduras (Jones R .K., 1986).

B).- **Labranza en conservación.** Existen cinco modalidades que son: no labranza, labranza reducida, labranza-acolchado, labranza en surcos y labranza en franjas. El factor que ha dado a la utilización de tal práctica de cultivo es el potencial para la reducción de costos, sin que con ello exista una merma significativa en el rendimiento. Esto se vuelve indispensable ante el peligro de erosión del suelo provocada por vientos o agua; además reduce la pérdida de la humedad en el suelo, hay menor desgaste de la maquinaria, menor combustible y menor compactación de la tierra (Jones R., 1986; Hughes H. D., 1970).

La agricultura es una actividad socioeconómica que se efectúa en nuestro país en gran proporción, misma que ha disminuido en los últimos años, debido a los altos costos y bajos rendimientos de producción. Además, si se agrega la elevada presencia de plagas provocadas por diversos organismos entre ellos hongos y bacterias, que ocasionan la pérdida parcial o total de la cosecha, así como la baja disponibilidad de agua con que cuentan varios estados de la República Mexicana, se tiene como consecuencia una reducción en la productividad económica de la población.

Debido a las ventajas que proporciona la labranza en conservación es importante determinar y comparar esta práctica con la convencional con respecto a la contaminación con *Aspergillus sp.* y sus toxinas. Así como buscar algunas estructuras fúngicas que participan activamente en la patogenicidad del hongo (esclerocios).

La variabilidad espacial de diversas poblaciones fúngicas en el campo, pueden actuar como controladores biológicos del hongo (Line J. F., 1995; Gourama H., 1995; 1997), por ello que deseamos estudiar la posible relación que existe entre las especies de hongos presentes en el maíz y suelo, en dos sistemas de labranza diferentes. Además, se pretende determinar el efecto de esos procedimientos de labranza sobre la contaminación por *Asperillus sp.* y sus aflatoxinas (Taylor J. W., *et al* 1995).

HIPÓTESIS

El método de labranza de conservación y labranza convencional, influye en la flora fúngica presente y en la contaminación de los cultivos de maíz con *A. flavus* y *A. parasiticus*, así como en la producción de sus aflatoxinas.

OBJETIVO

Determinar la influencia de los procesos del tratado de la tierra (labranza en conservación y labranza convencional), utilizada para el cultivo del maíz sobre la presencia de diversos géneros fúngicos y de aflatoxinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de referencia:

En el presente trabajo se utilizaron las siguientes cepas de referencia para la determinación de aflatoxinas: *A. flavus* NRRC 1059, 1299 y *A. parasiticus* NRRC Su-1 y 148, mismas que fueron conservadas en agar papa dextrosa (PDA, DIFCO) en refrigeración, efectúandose resiembras cada 6 meses.

Muestras de maíz:

Para este ensayo se utilizó un plantío de maíz crecido en el Campo Experimental General Terán, del municipio de Gral. Terán, N.L.; sembrado en diferentes épocas del año (Tabla 2).

Tabla 2.- Híbridos de maíz utilizados en labranza de conservación y tradicional en General Terán, N.L. 1997.

| Fecha de Siembra | Híbridos |
|----------------------|---|
| 18-24 Marzo de 1997 | Blanco Hualahuises H-433 H-422 H-435 Nuevo León VS-II |
| 18-20 Agosto de 1997 | HV-1 |

El criterios de selección de muestras que se utilizó fue: el manejo agronómico (labranza de conservación y tradicional). Se realizaron tres muestreos, de los cuales el primero fue aleatorio y los dos restantes fueron sistemáticos, con la finalidad de determinar la densidad poblacional de esclerocios del género *Aspergillus*.

DETERMINACIÓN DE LA FLORA FÚNGICA EN GRANOS DE MAÍZ POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y VACIADO EN PLACA:

Se colocaron 10 g de maíz en matraces Erlenmeyer de 150 mL y se agregaron 90 mL de solución salina al 0.85% estéril (dilución 10^{-1}), se agitó manualmente por espacio de 30 seg. Después se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-3} . De estas diluciones se tomaron 200 μ L y se colocaron en cajas petri, y se vació medio de cultivo fundido (PDA), se dejó solidificar a temperatura ambiente. Por último, las placas fueron incubadas a 20-25 °C por 3 a 4 días. Posteriormente se identificaron las colonias aisladas: las cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se guardaron para determinar la producción de aflatoxinas.

DENSIDAD Y SOBREVIVENCIA DE ESCLEROCIOS DE *A. flavus*:

a).- Cuantificación.

Con ayuda de una barrena se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 0-10 y de 11-20 cm. y se colocaron en frascos de vidrio

estériles. En el laboratorio se tomó 1 g de tierra y se adicionaron 9 mL de solución salina estéril al 0.85%. Se agitó por espacio de 30 seg. con ayuda de un agitador mecánico. La suspensión se pasó por tamices de malla 100 y con ayuda de un microscopio de disección se contaron los esclerocios presentes.

b).- Determinación de la viabilidad:

Los esclerocios se lavaron con hipoclorito de sodio al 1% por 5 min., posteriormente con una solución salina al 0.85% estéril a temperatura ambiente, por último, se colocaron en PDA y se incubaron por 7 días a 28-30 °C. Se determinó la presencia de *A. flavus* por su morfología colonial.

TIPIFICACIÓN DE LAS COLONIAS OBTENIDAS DE ESCLEROCIOS Y DEL MAÍZ:

Después de terminado el periodo de incubación, se procedió a la tipificación de la colonia; para esto se tomó en cuenta: color, producción de pigmento en el micelio basal, crecimiento, borde, textura, zonación, olor y diámetro de la colonia. El diagnóstico presuntivo fue confirmado con la visualización de la colonia al microscopio. Este último se realizó como sigue: con ayuda de un trozo de cinta Scotch se tomó una porción del centro y de la periferia de la colonia. Este se colocó en un portaobjetos con una gota de azul algodón de lactofenol. La colonia se examinó bajo el microscopio óptico

para observar las estructuras de reproducción del hongo llegando a identificar y clasificar el género. Para las cepas pertenecientes al género *Fusarium* se empleó el software "Fuskey" que nos permitió identificar hasta especie (Booth P., 1979).

PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Aspergillus*:

Para la identificación presuntiva de *Aspergillus sp*, se tomó una porción de la colonia y se colocó en un tubo de ensaye de 13X100 mm, con 1.9 mL de solución salina al 0.85% estéril (dilución 10^{-1}). Se agregó al tubo 0.1 mL de ácido tartárico al 10% para eliminar la flora bacteriana acompañante. Se efectuaron diluciones decimales hasta 10^{-5} . De esta última se tomaron 100 μ L y se colocaron en una caja Petri. Posteriormente, se agregó PDA fundido a una temperatura de 45-50 °C. Después de solidificar, las placas se incubaron por 7-10 días a un temperatura de 20-25 °C. Las cepas obtenidas se volvieron a tipificar hasta especie, se guardaron en tubos de ensayo con agar papa dextrosa y se realizaron resiembras cada 6 meses para conservar la viabilidad de las cepas.

DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

Se realizó mediante HPLC, siguiendo la metodología propuesta por la AOAC: (Scott P.M., 1995).

a).- Curva de calibración para la determinación de aflatoxinas:

A partir de una mezcla de aflatoxinas cuyas concentraciones son las siguientes: 5, 1.5, 5, y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ respectivamente, se tomaron con una microjeringa de 50 μL la cantidad de 27, 18, 9, 6 y 3 μL , colocándose en un tubo ependorf de 1 mL. Después se agregó solución derivatizante y se introdujo en el cromatógrafo de líquidos, para realizar la cuantificación de aflatoxina presente en el estándar. Se realizó por triplicado para someter nuestros resultados a un análisis estadístico.

b).- Extracción de aflatoxinas a partir de muestras de maíz:

Se tomaron 50 g de maíz y se colocaron en 100 mL de solvente de extracción (acetonitrilo-agua, 9:1). Se mezcló en licuadora por 2 min. y posteriormente se dejó en reposo 1 h en oscuridad y con agitación manual cada 10 min. Después se tomó un alícuota de 10 mL y se pasó por un filtro hecho a base de algodón estéril. El extracto obtenido se filtró en membranas de poro de 0.45 μm (Millipore). Del filtrado se tomaron 5 mL y se hicieron pasar por una columna limpiadora y concentradora de fase reversa que contenía carbono 18. La columna fué activada con 2 mL de metanol y 2 mL de agua con una presión de 5 Psi.

c).- Extracción de aflatoxinas a partir de cultivos:

Las cepas tipificadas como *A. flavus* y *A. parasiticus*, se sembraron en 5 mL de medio de cultivo hecho a base de sales inorgánicas (Cotty H., 1996), con la finalidad de inducir la biosíntesis de aflatoxinas. Los cultivos estáticos se incubaron 4 días a 28 °C y en oscuridad. Para la extracción de aflatoxinas, se agregó 2 mL de solvente de extracción, se agitó y se dejó en reposo por espacio de 1 h en la oscuridad. El procedimiento posterior fue el mismo que el especificado en el inciso b.

d).- Cuantificación de la aflatoxinas en CLAR:

Del extracto obtenido de la columna limpiadora se tomaron 200 µL y se pasaron a un tubo de ensayo con 700 µL de solución derivatizante (ác. trifluoroacético:ác. acético glacial:agua, 10:5:35), se calentó en un baño a 65 °C por espacio de 10 min. Después se tomaron 20 µL y se inyectaron en el cromatógrafo (para cuantificar la cantidad de aflatoxinas B₁, G₁, B₂ y G₂ presentes en las muestras (Sott P.M., 1995). Los tiempos de retención de cada toxina son de 3, 5, 8 y 14 min., con una fase móvil (agua, metanol y acetonitrilo, 400, 100,100 mL).

Las determinaciones se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Shimadzu, Rf-10AXL, con un detector de fluorescencia Shimadzu LC-10ADVP, y una columna (Waters) de fase reversa rellena de C₁₈ Nova-Pack 3.9X150 mm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

Se realizaron varios métodos estadísticos para evaluar de una forma global todos nuestros resultados. Dentro de las metodologías, tenemos un ANOVA de una sola vía; además se realizó una regresión multifactorial, para inferir acerca de los efectos que pudieran tener los procedimientos de labranza sobre la flora fúngica, número más probable de esporas por gramo de muestra, así como la presencia de cuatro aflatoxinas tanto en maíz como en cepas aisladas del mismo. También se realizaron patrones de densidad microbiológica o densidad poblacional, haciendo énfasis en la determinación de esclerocios en tierra tomada a diferentes profundidades del suelo y la distribución espacial de las aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*.

RESULTADOS

En el presente trabajo se procesaron 208 muestras de maíz obtenidas en tres periodos diferentes que corresponden a primavera 1997, Otoño 1997 e Invierno 1998. De estos se obtuvieron diversas especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y otros de menor interés, ya que no están asociados con la producción de micotoxinas (Tabla 3). Con la finalidad de aislar cepas toxigénicas localizadas fuera del maíz y dentro del mismo, se siguieron dos procedimientos, que fueron diluciones directas para obtener en número más probable de esporas (Tratamiento No. 1) y muestras de maíz lavadas con hipoclorito de sodio al 5% (Tratamiento No. 2).

En lo que respecta a los géneros tipificados en el tratamiento No. 1, todas las muestras presentaron al menos un género fúngico, ya que en algunas se observó el crecimiento de hasta 3 cepas diferentes. Esto mismo se presentó en las muestras con el tratamiento No. 2, solo que en esta ocasión se tuvieron al menos 61 muestras negativas para hongos. *Fusarium* sp. fue el género que en mayor proporción se encontró en todas las muestras tanto del tratamiento 1 como del tratamiento 2, le siguieron los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y por último otras cepas cuya incidencia fue poca comparadas con los géneros antes mencionados (Tabla No. 3).

Tabla 3.- Presencia de hongos en 208 muestras tratadas bajo dos procedimientos de aislamiento

| Número de muestras con aislados | | |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Género | Tratamiento No. 1 ^a | Tratamiento No. 2 ^b |
| <i>Aspergillus sp</i> | 94 | 61 |
| <i>Penicillium sp</i> | 90 | 73 |
| <i>Fusarium sp</i> | 105 | 84 |
| Otros géneros | 39 | 21 |
| Muestras negativas | 0 | 61 |

^a Cepas aisladas por medio de diluciones decimales

^b Cepas aisladas a partir de granos lavados con hipoclorito de sodio al 5%

Fusarium moniliforme, *F. oxysporum* así como *F. solanii* fueron las cepas con mayor presencia tanto en el tratamiento No. 1 como en el Tratamiento No. 2. Para el caso del género *Aspergillus*, se identificó *A. niger* y *A. terreus* en igual proporción en ambos tratamientos. Sin embargo, *A. flavus* se presentó en mayor número en muestras del tratamiento No. 1. Por otro lado, fructificaron en menor proporción aquellas cepas denominadas contaminantes comunes del ambiente, que son los hongos demateáceos (*Alternaria sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Nigrospora sp.*, entre otros), mucorales (*Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Syncephalastrum sp.*, etc.) algunos Deuteromicetos (*Geotrichum sp.*) y micelio estéril.

Se observó una ligera reducción en el número de especies del género *Penicillium* y *Aspergillus* sp., solo para el caso de cepas de *Fusarium* sp., la presencia del mismo permaneció muy semejante (Tabla No. 4).

Tabla 4.- Cepas presentes en muestras de maíz aisladas por dos tratamientos diferentes

| Cepa | Tratamiento No. 1 ^a | Tratamiento No. 2 ^b |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 37 | 30 |
| <i>F. moniliforme</i> | 44 | 52 |
| <i>F. solanii</i> | 25 | 15 |
| <i>F. avenaceus</i> | 5 | 0 |
| <i>F. sambicinum</i> | 3 | 1 |
| <i>F. graminearum</i> | 2 | 1 |
| <i>F. xylaroides</i> | 7 | 2 |
| TOTAL | 123 | 101 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 16 | 15 |
| <i>A. terreus</i> | 58 | 17 |
| <i>A. candidus</i> | 6 | 2 |
| <i>A. aureolus</i> | 4 | 0 |
| <i>A. tamaritii</i> | 4 | 0 |
| <i>A. flavus</i> | 7 | 34 |
| <i>A. parasiticus</i> | 3 | 0 |
| <i>A. versicolor</i> | 1 | 0 |
| TOTAL | 99 | 68 |
| <i>Penicillium oxalicum</i> | 43 | 36 |
| <i>P. islandicus</i> | 26 | 21 |
| <i>P. lassenii</i> | 13 | 13 |
| <i>Penicillium</i> sp. | 6 | 6 |
| TOTAL | 88 | 79 |
| <i>Mucor</i> sp | 27 | 7 |
| <i>Getrichum</i> sp | 6 | 0 |
| <i>Syncephalastrum</i> sp | 5 | 3 |
| <i>Rhizopus</i> sp. | 10 | 8 |
| <i>Alternaria</i> sp. | 2 | 4 |
| <i>Nigrospora</i> sp. | 15 | 0 |
| <i>Helmintosporium</i> sp | 0 | 1 |
| Micelio estéril | 0 | 2 |
| TOTAL | 65 | 34 |
| TOTAL | 375 | 270 |

^a Cepas aisladas por medio de diluciones decimales

^b Cepas aisladas a partir de granos lavados con hipoclorito de sodio al 5%

En cuanto al número más probable de esporas, se tuvo una amplia diversidad en cuanto a los conidios presentes en el maíz que fue muestreado en la primera ocasión, ya que en la mayoría de las muestras se encontraron entre 10 y 600 esporas/g de maíz. Conforme al paso del tiempo se registró una elevada cuenta de microorganismos, ya que en el segundo y tercer período, se presentaron valores hasta de 5000 esporas/g de muestra.

Tabla 5.- Número más probable de esporas/g de muestra de maíz en tres diferentes muestreos y en dos tipos de labranza

| | 1er. Muestreo | | 2do Muestreo | | 3er. Muestreo | | TOTAL |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| | Conv. ^a | Cons. ^b | Conv. ^a | Cons. ^b | Conv. ^a | Cons. ^b | |
| 0-99 | 12 | 12 | 2 | 1 | 0 | 0 | 27 |
| 100-199 | 9 | 11 | 5 | 3 | 0 | 0 | 28 |
| 200-299 | 7 | 3 | 4 | 3 | 0 | 1 | 18 |
| 300-399 | 5 | 2 | 1 | 3 | 0 | 0 | 11 |
| 400-499 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 500-599 | 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 600-699 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 700-799 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 800-899 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 900-999 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 1000- x | 10 | 10 | 20 | 35 | 12 | 11 | 98 |
| TOTAL | 51 | 45 | 34 | 45 | 12 | 12 | 199 |

a Labranza convencional

b Labranza en conservación

En cuanto a la obtención de cepas de acuerdo al tipo de labranza, tenemos que *Aspergillus sp.* se encontró en el primer ciclo agrícola con mayor incidencia, tanto en las muestras de maíz cultivado en labranza convencional como en labranza de conservación (Fig. 1). En segundo lugar, se aislaron cepas de *Fusarium sp.*, después el género *Penicillium sp* y por último otras cepas de poco interés como los correspondientes a mucorales, entre los que destacan el género *Mucor sp.* y *Syncephalastrum sp.* En el segundo ciclo agrícola, el género *Penicillium sp*, se presentó en mayor proporción con respecto a *Fusarium sp* y *Aspergillus sp.* (Fig. 2). Dentro de este último género, se identificaron cepas como *A. flavus* y *A. terreus* que son responsables de la producción de aflatoxinas y otras toxinas. También se identificaron cepas de *F. moniliforme*.

Por último, en el tercer periodo se identificaron algunas especies de *Fusarium*, como *F. oxisporum* y *F. moniliforme* en ambos tipos de labranza. No se encontraron cepas correspondientes al género *Aspergillus* en la labranza en conservación, solo en labranza convencional. Además, en ambos tipos de labranza se presentaron con menor frecuencia los hongos correspondientes a los mucorales en ambos tipos de manejo del suelo (Fig. 3).

Fig. 1.- Determinación de la flora fúngica presente en muestras de maíz con dos tipo de labranza en el periodo de primavera de 1997

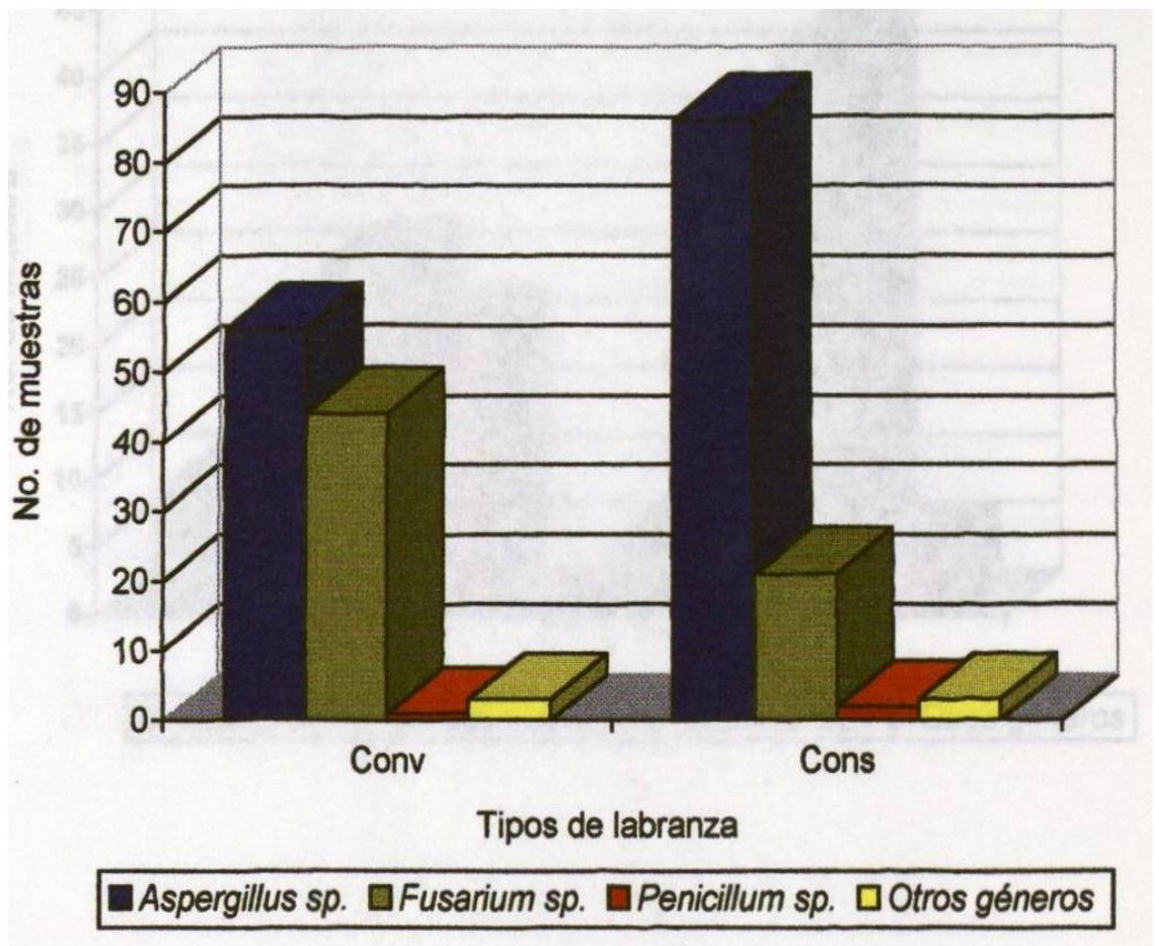


Fig. 2.- Determinación de flora fúngica a partir de maíz cultivado por medio de labranza en conservación y convencional en el periodo de Otoño de 1997.

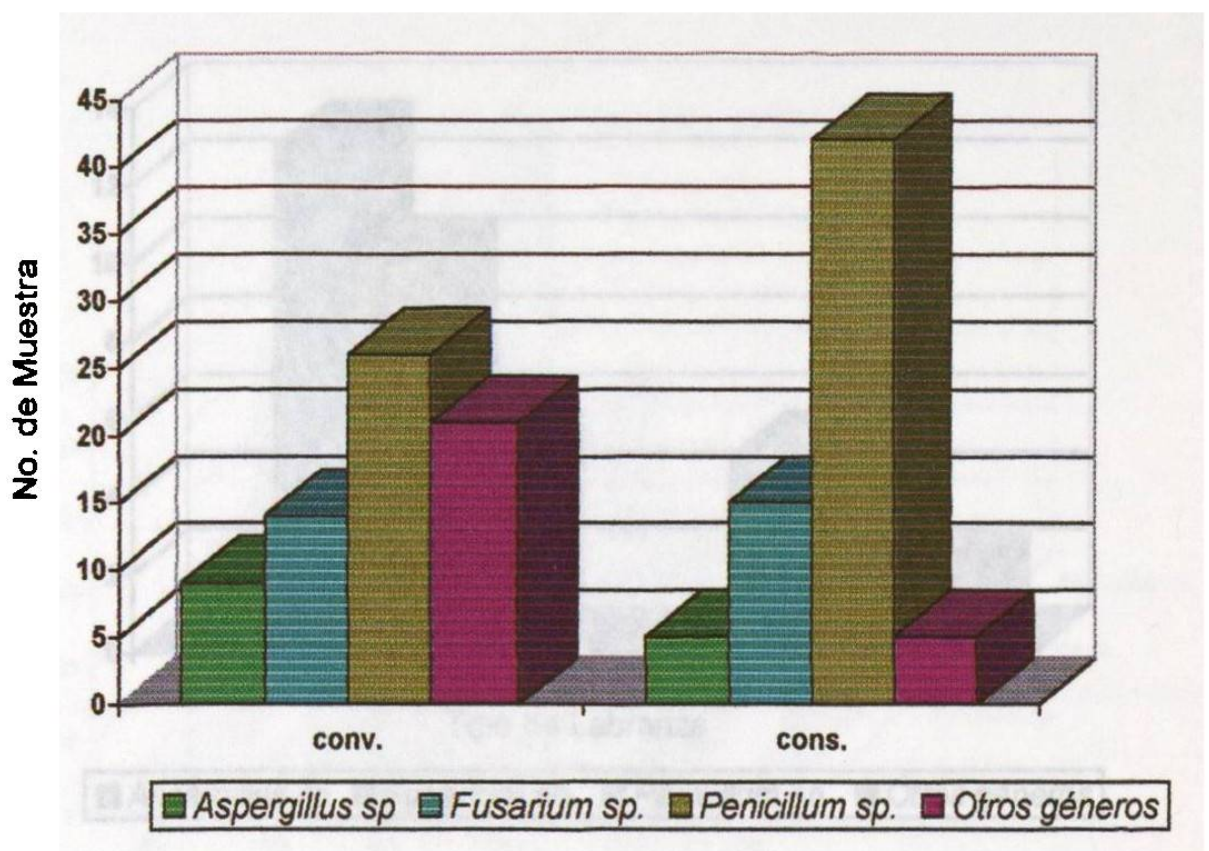


Fig. 3.- Determinación de flora fúngica en muestras de maíz por medio de labranza en conservación y convencional en el periodo de Invierno de 1997

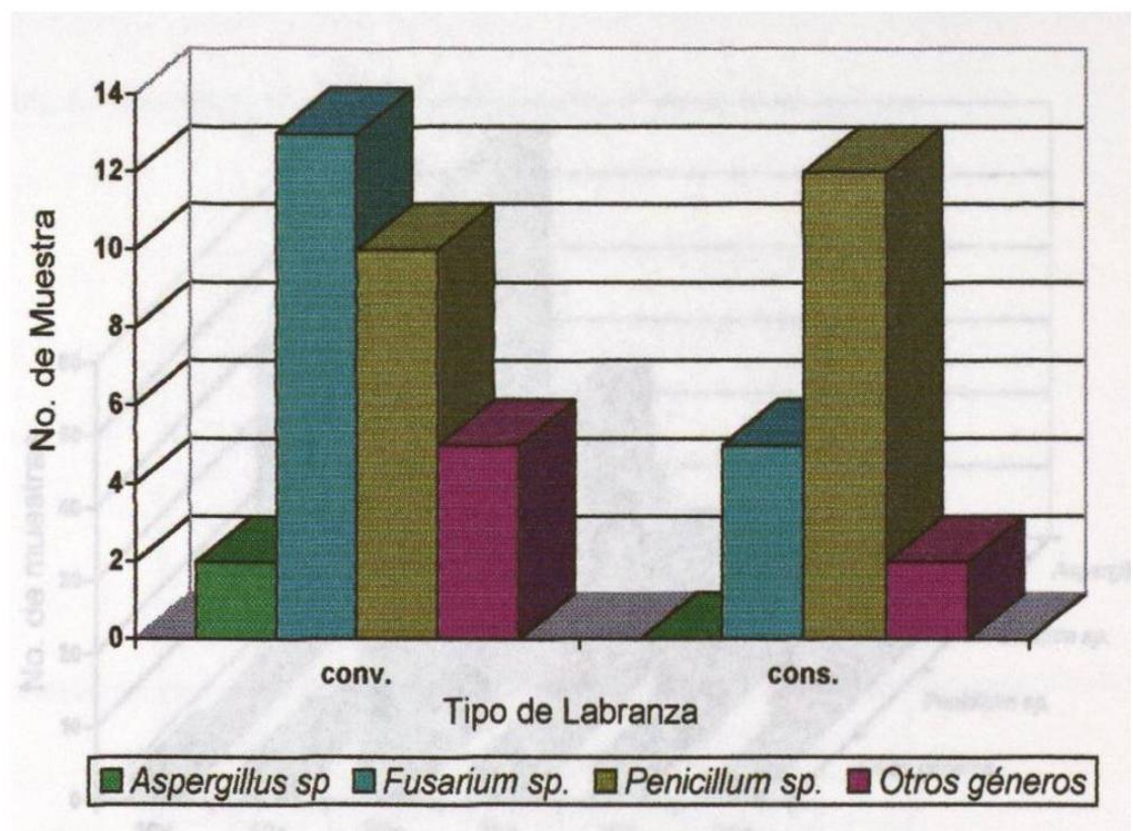
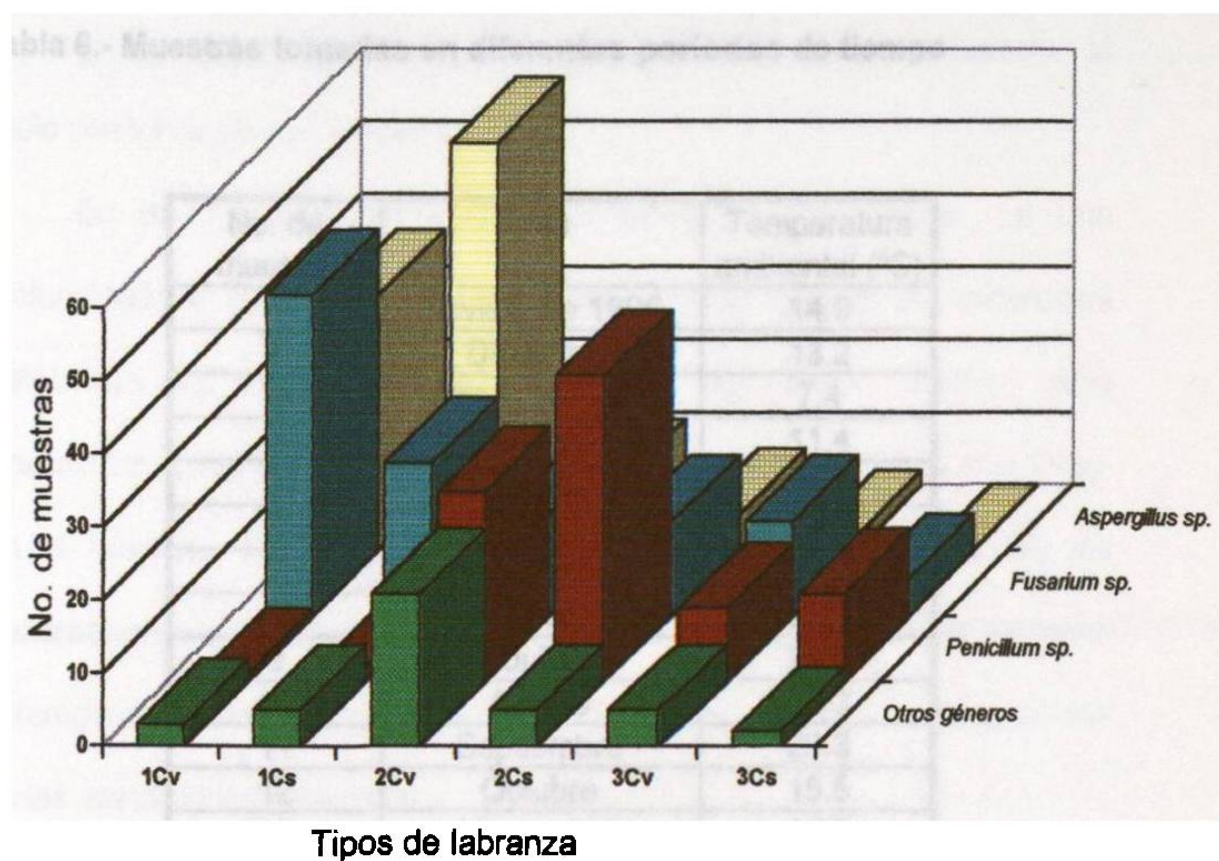


Fig. 4.- Flora fúngica en muestras de maíz por medio de labranza en conservación y convencional en tres periodos de muestreo diferente (Verano, Otoño e Invierno de 1997).



Para la determinación de esclerocios presentes en muestras de suelo, éste fue muestreado a partir del 1 de enero de 1997 (muestra No. 1) y después se tomaron mensualmente 100 g tierra para después ser analizada, a la vez fueron analizados datos correspondientes al estado del tiempo como lo es la temperatura ambiental y humedad relativa del ambiente (tabla 6). La última toma de muestra fue en Abril de 1998.

Tabla 6.- Muestras tomadas en diferentes periodos de tiempo

| No. de muestra | Mes | Temperatura ambiental (°C) |
|----------------|----------------|----------------------------|
| 1 | Noviembre 1996 | 14.9 |
| 2 | Diciembre | 13.2 |
| 3 | Enero de 1997 | 7.4 |
| 4 | Febrero | 11.4 |
| 5 | Marzo | 14.8 |
| 6 | Abril | 15.3 |
| 7 | Mayo | 18.7 |
| 8 | Junio | 23.8 |
| 9 | Julio | 24.6 |
| 10 | Agosto | 23.3 |
| 11 | Septiembre | 20.3 |
| 12 | Octubre | 15.5 |
| 13 | Noviembre | 17.5 |
| 14 | Diciembre | 9.8 |
| 15 | Enero 1998 | 13.2 |
| 16 | Febrero | 9.4 |
| 17 | Marzo | 14.5 |
| 18 | Abril | 22.6 |

En lo que respecta a la determinación de la densidad poblacional de los esclerocios, se encontró que este no se encuentra distribuido uniformemente en las muestras de suelo con labranza convencional a una profundidad de 10 cm (Fig. 5). Se demostró que existen regiones donde el número de estas estructuras es mayor que otras.

Con respecto a los esclerocios aislados de suelo con labranza en conservación (Fig. 6), se observó que éstas estructuras se encontraban en una región muy específica del suelo y en menor número con respecto al suelo con labranza convencional.

En las muestras de suelo con labranza convencional a una profundidad de 20 cm (Fig. 7), se obtuvo menor número de esclerocios distribuidos en regiones muy específicas del suelo. Existen otras localidades en las que no se aislaron ninguna de las estructuras anteriores. En la labranza en conservación a la misma profundidad (Fig. 8), los esclerocios se encontraron dispersos en toda el área de siembra de forma heterogénea, aunque la cantidad de los mismos es mayor a los encontrados en las condiciones anteriores.

También se determinó la cantidad de esclerocios presentes en la tierra utilizada para el crecimiento del maíz en 18 muestreos en diferentes períodos de tiempo, mismos que anteriormente mencionamos la forma de distribución que tiene a diferentes profundidades de la tierra. En forma muy

general, se contaron desde 10 a 120 esclerocios/g de suelo, solo que se presentaron muestras en las cuales no se encontraron estas estructuras. Además como se muestra en la tabla 7, al inicio del muestreo de suelo se contaron mayor cantidad de esclerocios y conforme al paso del tiempo la cantidad de estas estructuras es menor. Este aumento se presentó en ambos tipos de labranza y profundidades de la muestra.

Fig. 5.- Determinación de esclerocios a 10 cm de profundidad de suelo en labranza convencional

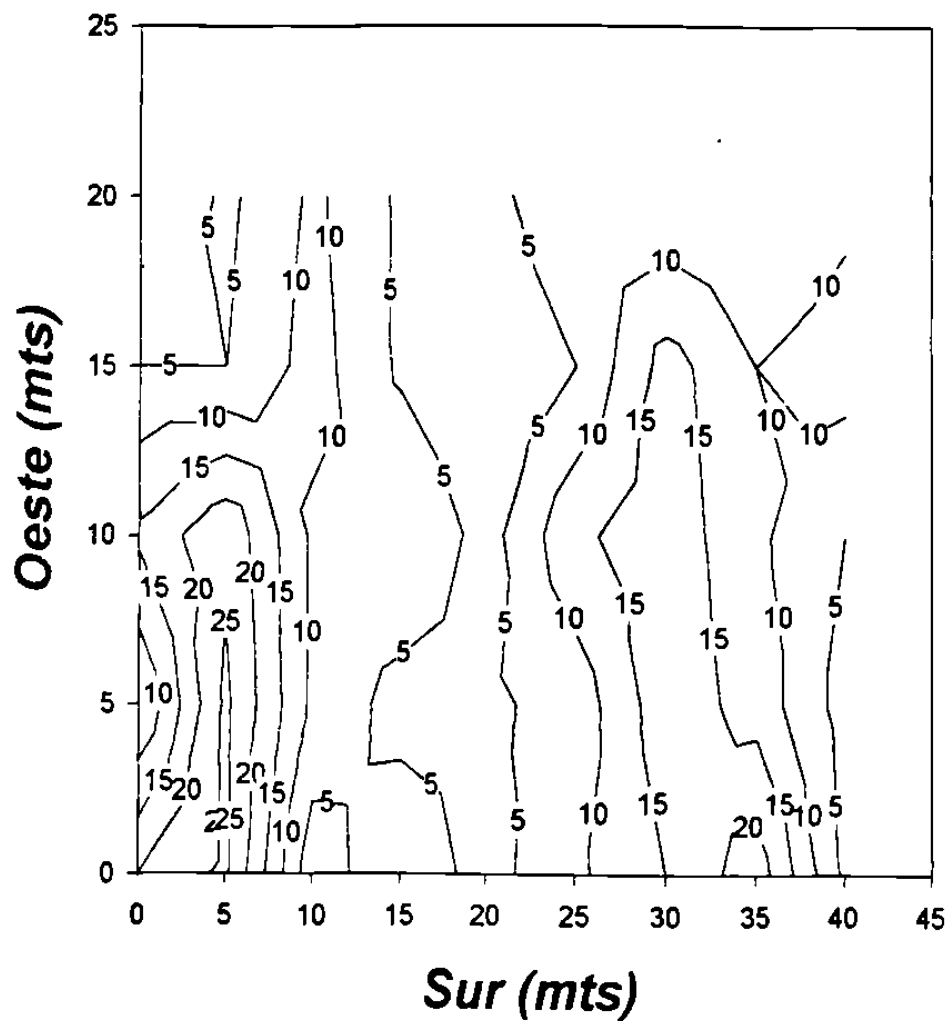


Fig. 6.- Determinación de esclerocios a 10 cm de profundidad en suelo con labranza en conservación

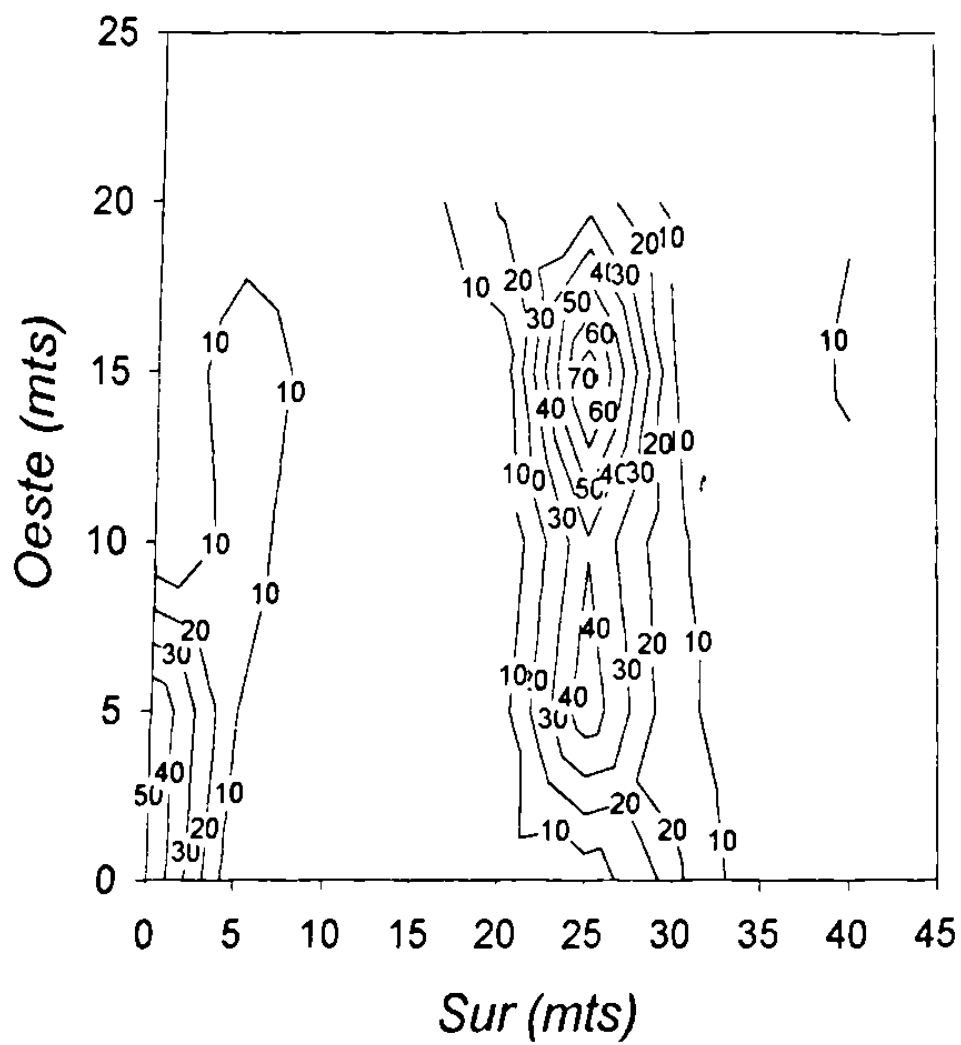


Fig. 7.- Determinación de esclerocios a 20 cm de profundidad de suelo en labranza convencional

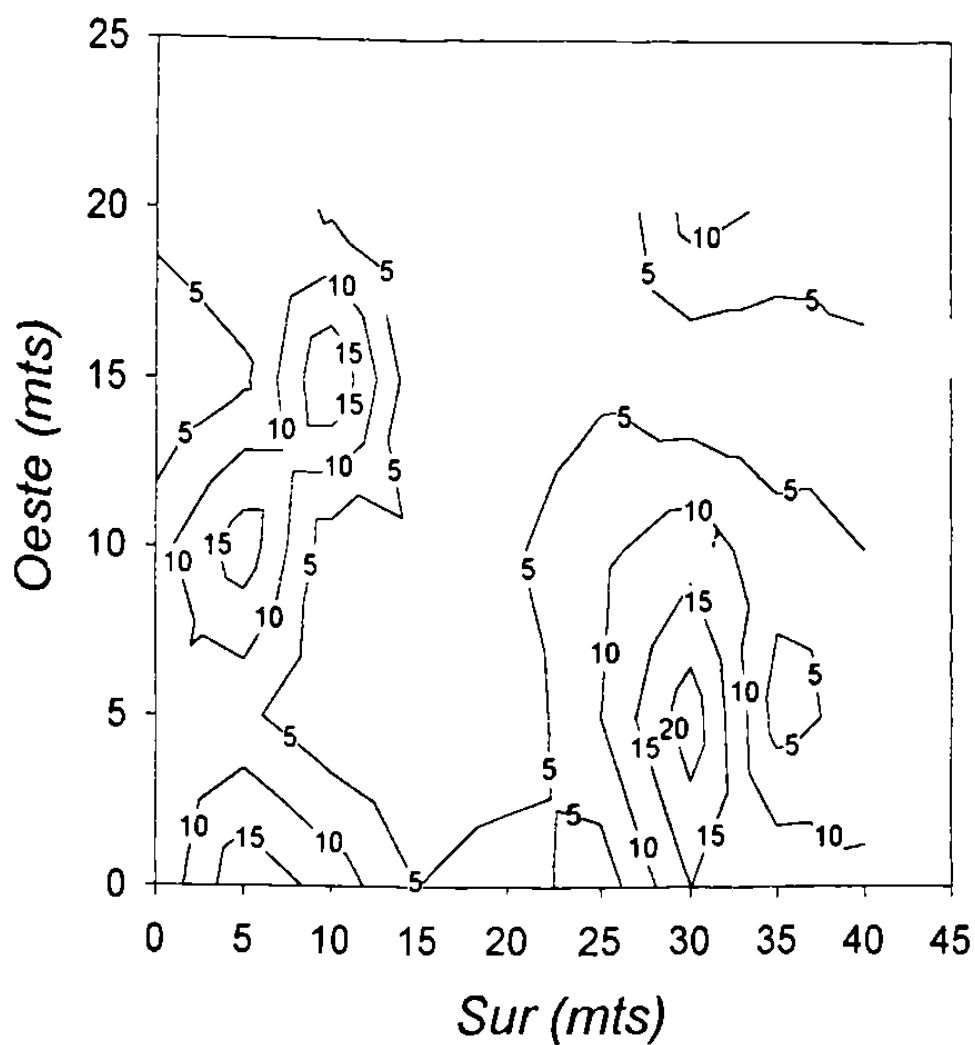
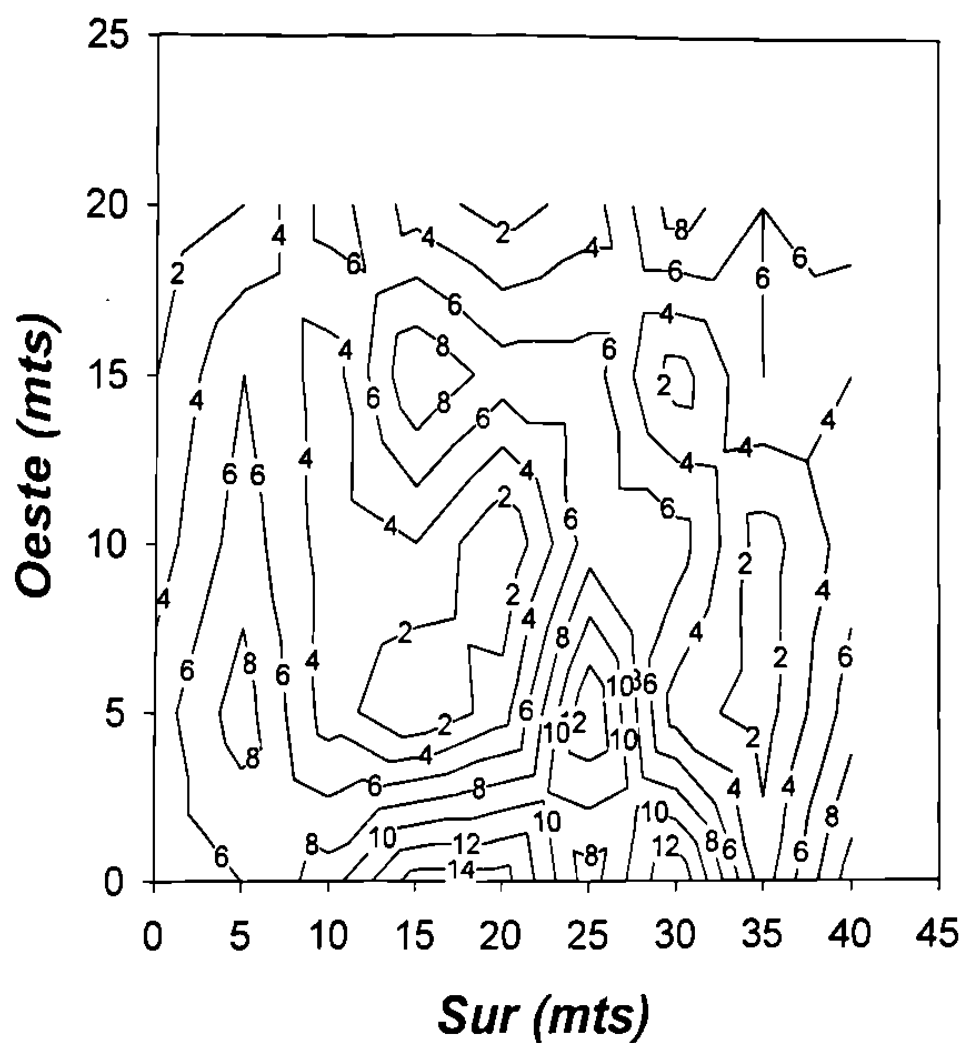


Fig. 8 Determinación de esclerocios a 20 cm de profundidad en suelo con labranza en conservación



Se demostró que existe diferencia significativa entre el número de ellos, ya que hay menor cantidad en la tierra labrada en forma convencional contabilizándose 694 y 585 esclerocios en total, para las profundidades de 10 y 20 cm respectivamente, en cambio en las muestras con labranza convencional se contaron 905 y 676 esclerocios a una profundidad de 10 y 20 cm respectivamente.

Tabla 7.- Número de esclerocios/g en dos diferentes profundidades de suelo tratado con labranza convencional y en conservación

| No. de muestra | Conservación | | Convencional | |
|----------------|--------------|------------|--------------|------------|
| | 10 cm | 20 cm | 10 cm | 20 cm |
| 1 | 95 | 97 | 113 | 116 |
| 2 | 115 | 74 | 79 | 56 |
| 3 | 80 | 73 | 65 | 54 |
| 4 | 77 | 104 | 73 | 59 |
| 5 | 109 | 75 | 52 | 55 |
| 6 | 100 | 66 | 94 | 104 |
| 7 | 99 | 63 | 60 | 67 |
| 8 | 13 | 0 | 26 | 0 |
| 9 | 18 | 16 | 4 | 2 |
| 10 | 10 | 3 | 13 | 7 |
| 11 | 11 | 15 | 0 | 7 |
| 12 | 13 | 6 | 12 | 7 |
| 13 | 60 | 27 | 50 | 36 |
| 14 | 18 | 10 | 6 | 9 |
| 15 | 4 | 11 | 8 | 8 |
| 16 | 14 | 22 | 11 | 4 |
| 17 | 11 | 14 | 0 | 0 |
| 18 | 57 | 0 | 28 | 0 |
| Total | 905 | 676 | 694 | 585 |

Del total de los esclerocios enumerados se procedió a determinar la viabilidad y se identificaron en mayor proporción especies que corresponden al género *Aspergillus*. Las especies con mayor incidencia fueron: *A. terreus*, *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. aureolus*, entre otras. Además se mostró gran cantidad de esclerocios de *Penicillium*, sin embargo también crecieron hongos que no poseen la capacidad de formar esclerocios.

Tabla 8.- Identificación de cepas aisladas a partir de esclerocios de muestras de suelo en diferentes épocas del año

| Especie fúngica | Profundidad del suelo | |
|---|-----------------------|-------|
| | 10 cm | 20 cm |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 40 | 32 |
| <i>A. aureolus</i> | 10 | 9 |
| <i>A. tamarii</i> | 1 | 1 |
| <i>A. niger</i> | 31 | 32 |
| <i>A. flavus</i> | 20 | 17 |
| <i>A. ochraceus</i> | 1 | 1 |
| <i>A. niger</i> | 9 | 2 |
| <i>A. carbonarius</i> | 20 | 15 |
| <i>A. glaucus</i> | 1 | 4 |
| <i>A. candidus</i> | 4 | 5 |
| <i>A. arenarius</i> | 5 | 2 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 36 | 22 |
| <i>Stachibotrys sp.</i> | 2 | 2 |
| Hongos Demateaceos ¹ | 8 | 4 |
| Hongos Mucorales (<i>Rhizopus sp.</i>) | 2 | 1 |
| otros Géneros ² | 15 | 10 |
| Micelio estéril | 6 | 1 |

¹ *Curvularia sp.*, *Phoma sp.*, *Nigrospora sp.*, *Helmintosporium sp.*, *Alternaria sp.* y *Cladosporium sp.*

² *Fusarium sp.*, *Scopulariopsis sp.*, *Verticillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Epicoccum sp.* y *Geotrichum sp.*

El rango de porcentaje de viabilidad de esclerocios fluctuó entre 75 y 10 %, aunque hubo algunas muestras en donde existía un 100% de viabilidad. Sin embargo en otras el crecimiento fue nulo (Tabla 9).

Tabla 9.- Porcentaje de viabilidad de los esclerocios aislados de suelo a dos profundidades diferentes en dos métodos de labranza

| No. de muestra | L. Convencional | | L. Conservación | |
|----------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | 10 cm | 20 cm | 10 cm | 20 cm |
| 1 | 14.2 | 17.2 | 16.8 | 13.4 |
| 2 | 39.2 | 48 | 20.9 | 25.7 |
| 3 | 30.8 | 29.6 | 13.7 | 11 |
| 4 | 15.1 | 16.9 | 7.8 | 9.6 |
| 5 | 48 | 52.7 | 22.9 | 20 |
| 6 | 15.9 | 11.5 | 10 | 6.1 |
| 7 | 28.3 | 10.4 | 11.1 | 19.1 |
| 8 | 7.7 | 0 | 30.8 | 0 |
| 9 | 75 | 100 | 16.7 | 12.5 |
| 10 | 15.4 | 14.3 | 30 | 0 |
| 11 | 0 | 71.5 | 10 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 23.1 | 16.7 |
| 13 | 16 | 33 | 4.7 | 25.9 |
| 14 | 33.4 | 44.4 | 22.2 | 20 |
| 15 | 25 | 37.5 | 50 | 9.1 |
| 16 | 0 | 100 | 14.3 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 14.3 |
| 18 | 7.1 | 0 | 0 | 0 |

Para ver el efecto que tiene la temperatura sobre el porcentaje de viabilidad de los esclerocios tipificados, se tomaron lecturas de temperatura ambiental, misma que no excedió de 24.5 °C (Tabla 10)

Tabla 10.- Porcentaje de viabilidad de esclerocios y su relación con la temperatura ambiental media

| No. de muestra | Tem. amb. (°C) | L. Convencional | | L. Conservación | |
|----------------|----------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | | 10 cm | 20 cm | 10 cm | 20 cm |
| 1 | 7.4 | 14.2 | 17.2 | 16.8 | 13.4 |
| 2 | 11.4 | 39.2 | 48 | 20.9 | 25.7 |
| 3 | 14.8 | 30.8 | 29.6 | 13.7 | 11 |
| 4 | 15.3 | 15.1 | 16.9 | 7.8 | 9.6 |
| 5 | 18.7 | 48 | 52.7 | 22.9 | 20 |
| 6 | 23.8 | 15.9 | 11.5 | 10 | 6.1 |
| 7 | 24.6 | 28.3 | 10.4 | 11.1 | 19.1 |
| 8 | 24.3 | 7.7 | 0 | 30.8 | 0 |
| 9 | 21.9 | 75 | 100 | 16.7 | 12.5 |
| 10 | 20.3 | 15.4 | 14.3 | 30 | 0 |
| 11 | 15.5 | 0 | 71.5 | 10 | 0 |
| 12 | 9.8 | 0 | 0 | 23.1 | 16.7 |
| 13 | 13.2 | 16 | 33 | 4.7 | 25.9 |
| 14 | 9.4 | 33.4 | 44.4 | 22.2 | 20 |
| 15 | 12.3 | 25 | 37.5 | 50 | 9.1 |
| 16 | 14.5 | 0 | 100 | 14.3 | 0 |
| 17 | 17.4 | 0 | 0 | 0 | 14.3 |
| 18 | 22.6 | 7.1 | 0 | 0 | 0 |

Comparando la profundidad en la cual se tomaron las muestras, el comportamiento es muy semejante a 10 y 20 cm; ya que podemos apreciar que cuando aumenta la temperatura ambiente se incrementa el porcentaje de viabilidad de los esclerocios con valores hasta de 100%, aunque se tuvieron registros en donde no existe crecimiento alguno de hongos (Fig. 9).

Para el caso de las muestras tomadas de suelo con labranza en conservación, en el primer muestreo se ve un incremento en la temperatura y el porcentaje de viabilidad de los esclerocios. Conforme al paso del tiempo y en las últimas muestras el aumento en la temperatura sigue, pero en el caso de la sobrevivencia de los esclerocios se presenta un ligero descenso, tanto en las muestras tomadas a 10 cm de profundidad como las tomadas a 20 cm. De forma muy general, todas las muestras tomadas durante Enero de 1997 a Marzo de 1998 tienen comportamientos muy similares ya que en ambas profundidades se presenta una relación proporcional entre la temperatura y la viabilidad, solo que los valores encontrados son menores para las muestras tomadas a 20 cm de profundidad, estando más de cuatro muestras con valores nulos de sobrevivencia en los hongos que originan estructuras de resistencia. Además, en solo tres muestras se presentaron valores menores al 50% de esclerocios viables, esto es a una profundidad de 10 cm (Fig. 10).

Ahora, comparando las muestras tomadas a una misma profundidad pero en suelos con labranza convencional y en conservación, son directamente proporcionales los efectos de temperatura con respecto a la sobrevivencia de los esclerocios. Se presentaron en el suelo con labranza en conservación porcentajes elevados de viabilidad de los esclerocios en el presente trabajo, además en los últimos muestreos, se observó que solo en las muestras con labranza convencional disminuye significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de esclerocios fértiles. Por último, en la labranza en conservación el porcentaje de viabilidad es elevado ya que va de 40 hasta un 70%. En cambio, en las muestras con labranza convencional, los valores máximos de sobrevivencia son hasta de 30% (Fig. 11).

En el caso de los esclerocios tomados de suelo con labranza en conservación y convencional a una profundidad de 20 cm, el porcentaje de viabilidad fue relativamente pequeño para el caso de las muestras tomadas del suelo con labranza en conservación, ya que se tienen valores hasta de un 20% como máximo. No sucedió lo mismo en la labranza convencional en donde los valores fueron hasta de 100% en dos muestras, aunque se tuvieron ejemplares con una viabilidad menor al 20% (Fig. 12).

Fig. 9 Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esclerocios
10 y 20 cm. de profundidad de suelo con
labranza convencional.

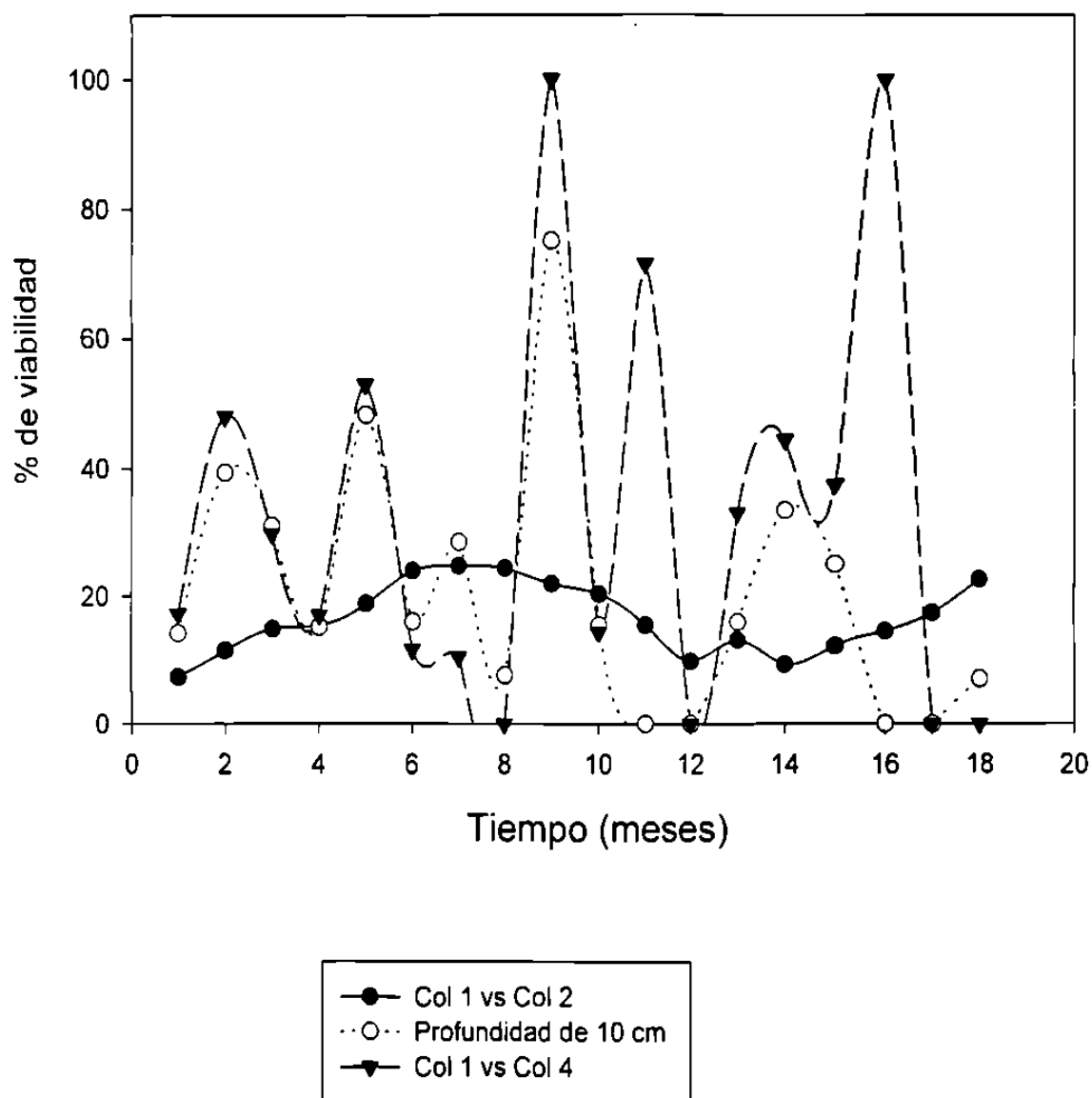


Fig. 10 Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esclerocios a 10 y 20 cm de profundidad de suelo con labranza en conservación

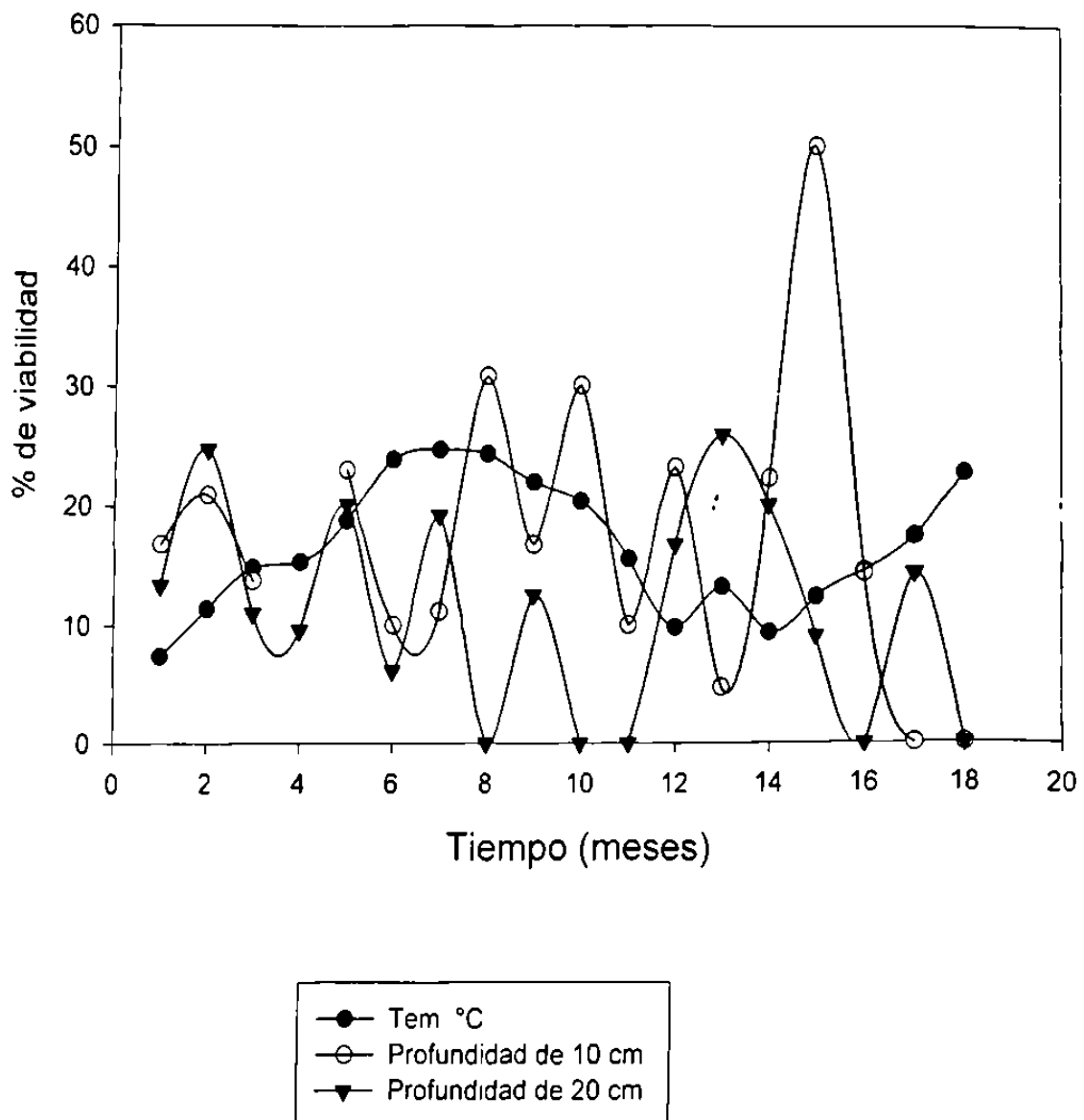


Fig. 11 Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esclerocios a 10 cm de profundidad de suelo con labranza en conservación y convencional

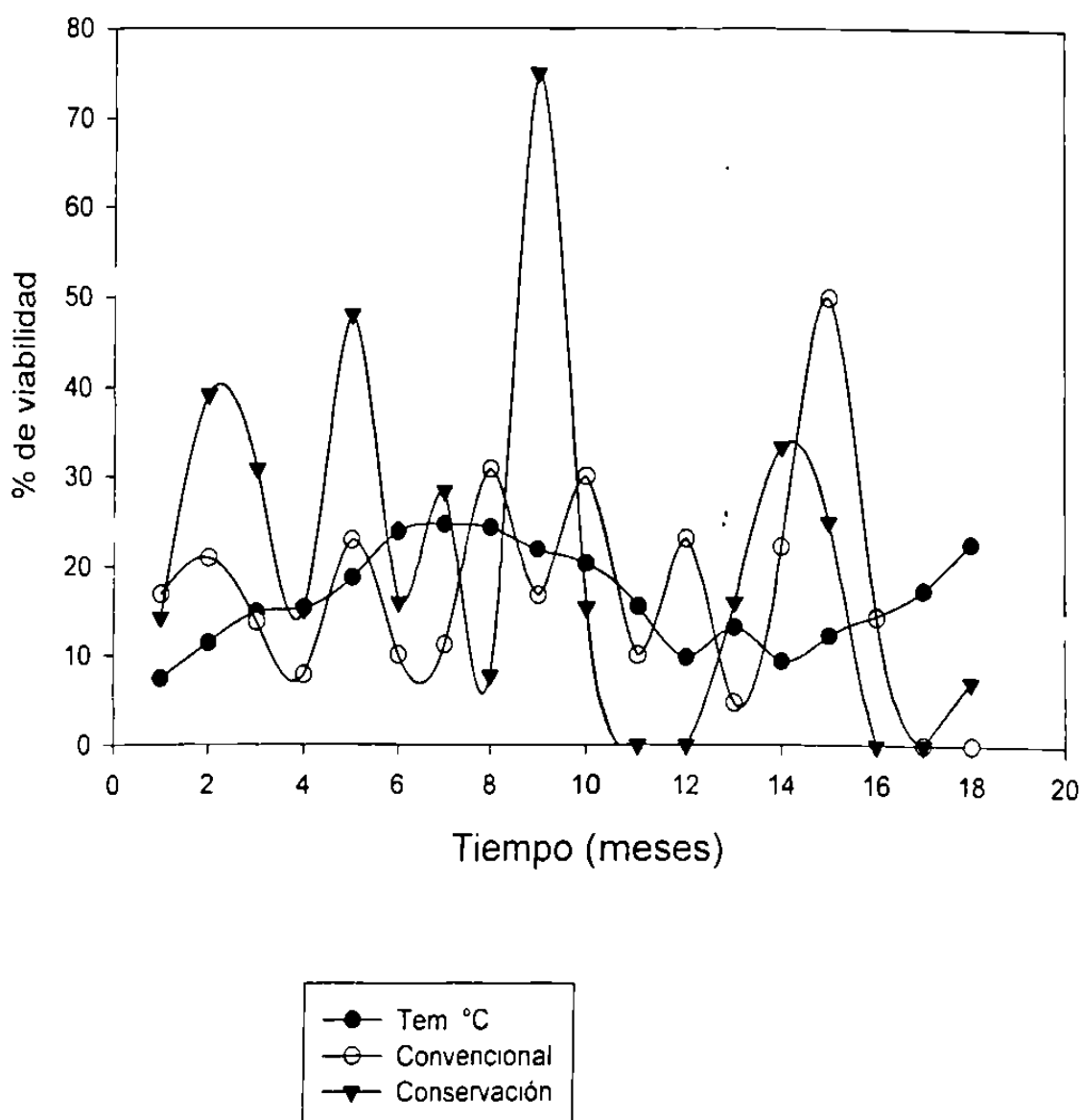
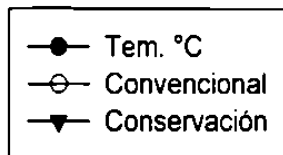
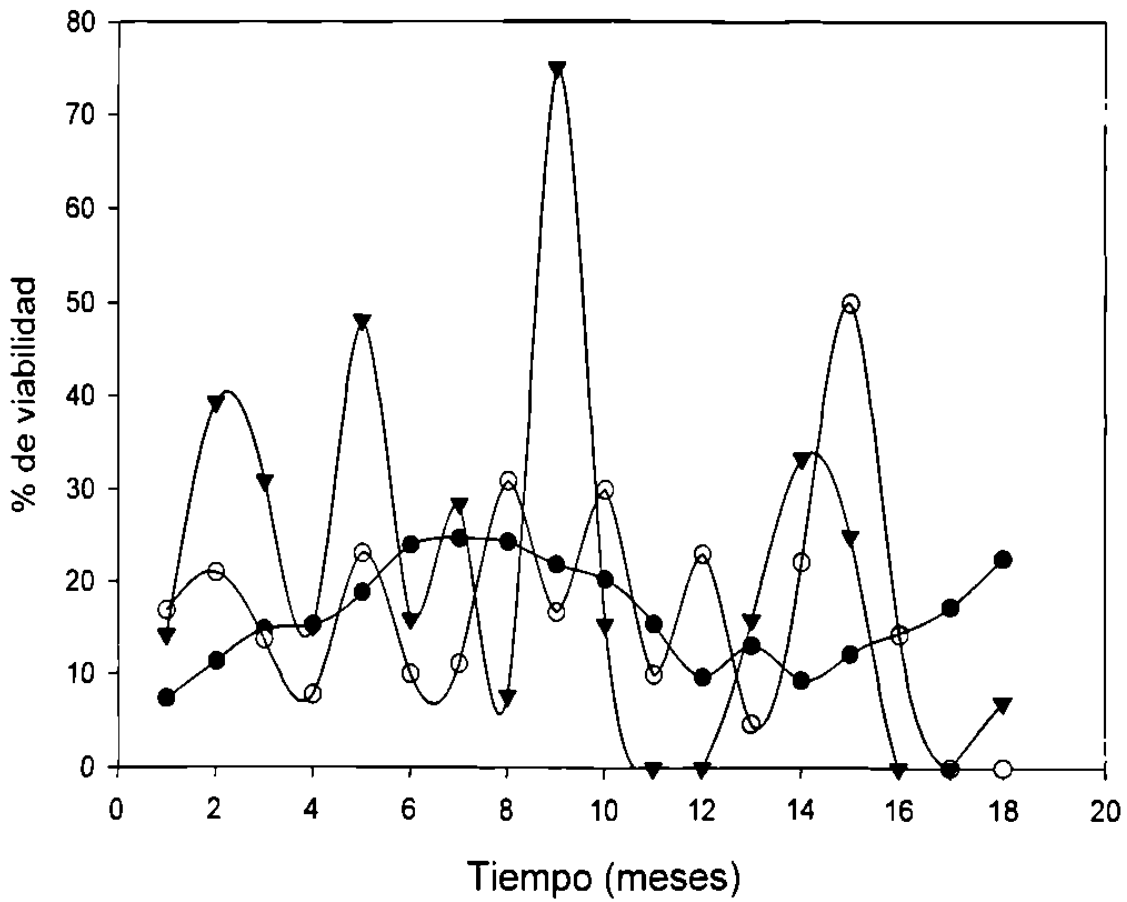


Fig. 11 Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esclerocios a 10 cm de profundidad de suelo con labranza en conservación y convencional



Para la determinación de las aflatoxinas en granos de maíz con dos diferentes técnicas de cultivo, primeramente se procedió a la realización de la curva de calibración para la mezcla de aflatoxinas cuya concentración es de 5 µg/mL para las aflatoxinas G₁ y B₁; y 1.5 µg/mL para las aflatoxinas G₂ y B₂. Una vez terminada la inyección del estándar al cromatógrafo se realizó un análisis cualitativo de las aflatoxinas en base a los tiempos que son: 4 ± 0.8, 6 ± 0.6, 10 ± 0.8 y 12 ± 0.6 min. de la aflatoxina G₁, B₁, G₂ y B₂ respectivamente. El análisis cuantitativo se efectuó por medio de la medición de las áreas totales de los picos que originan estas toxinas. Los volúmenes colocados para la realización de la curva de calibración fueron de 27, 18, 9, 6 y 3 µL de estándar en un ml de fase móvil, cuya concentración de 135, 90, 45, 30 y 15 ng/mL para las aflatoxinas G₁ y B₁; en el caso de las aflatoxinas G₂ y B₂ la concentración fue de 40.5, 27, 13.5, 9 y 4.5 ng/mL.

Al cromatograma que se obtuvo (Fig. 13) se le dió la siguiente interpretación: en un tiempo de 15 min. se tienen 9 picos bien definidos con tiempos de retención de 1.133, 3.758, 4.925, 9.583, 10.917, 11.1, 12.217 y 14.075 min., solo aquellos tiempos de retención de 1.133, 9.583, 10.917 y 11.1 min. son picos correspondientes a compuestos que constituyen la solución derivatizante (9.583, 10.917 y 11.1), esto es en base a cromatogramas obtenidos previamente solo con la mezcla usada para la derivatización de las aflatoxinas G₁ y B₁ (Fig. 14). El resto de los picos

corresponden a cada una de las aflatoxinas que tienen el siguiente orden: G₁, B₁, G₂ y B₂. Conforme aumenta el número de diluciones se disminuye la concentración de las aflatoxinas y por tanto la señal medida en volts. Se realizaron al menos tres repeticiones de la curva de calibración para obtener la cantidad mínima detectable para cada aflatoxina, misma que fue de 1.5 ng/mL (Fig. 15).

Para determinar la cantidad de aflatoxina en muestras de maíz, se realizó un cromatograma con un extracto de maíz resistente al ataque de hongos aflatoxigénicos (Fig. 16) y del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas toxigénicas obtenidas (Fig. 17). En estos diagramas se puede comprobar que no existe interferencia de algún compuesto pueda ser detectado a la longitud de onda utilizada para las aflatoxinas.

Fig. 18 Curva de calibración del estándar de AFB₁

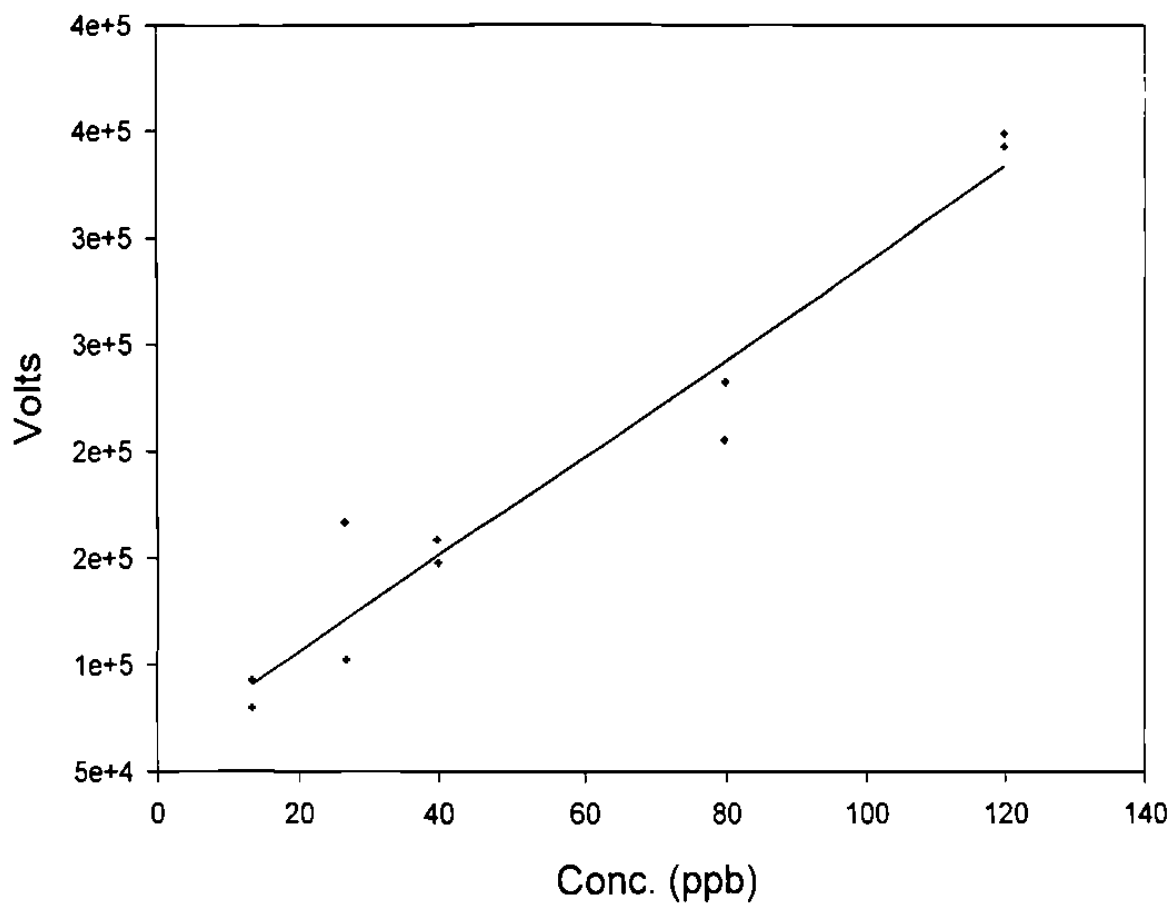


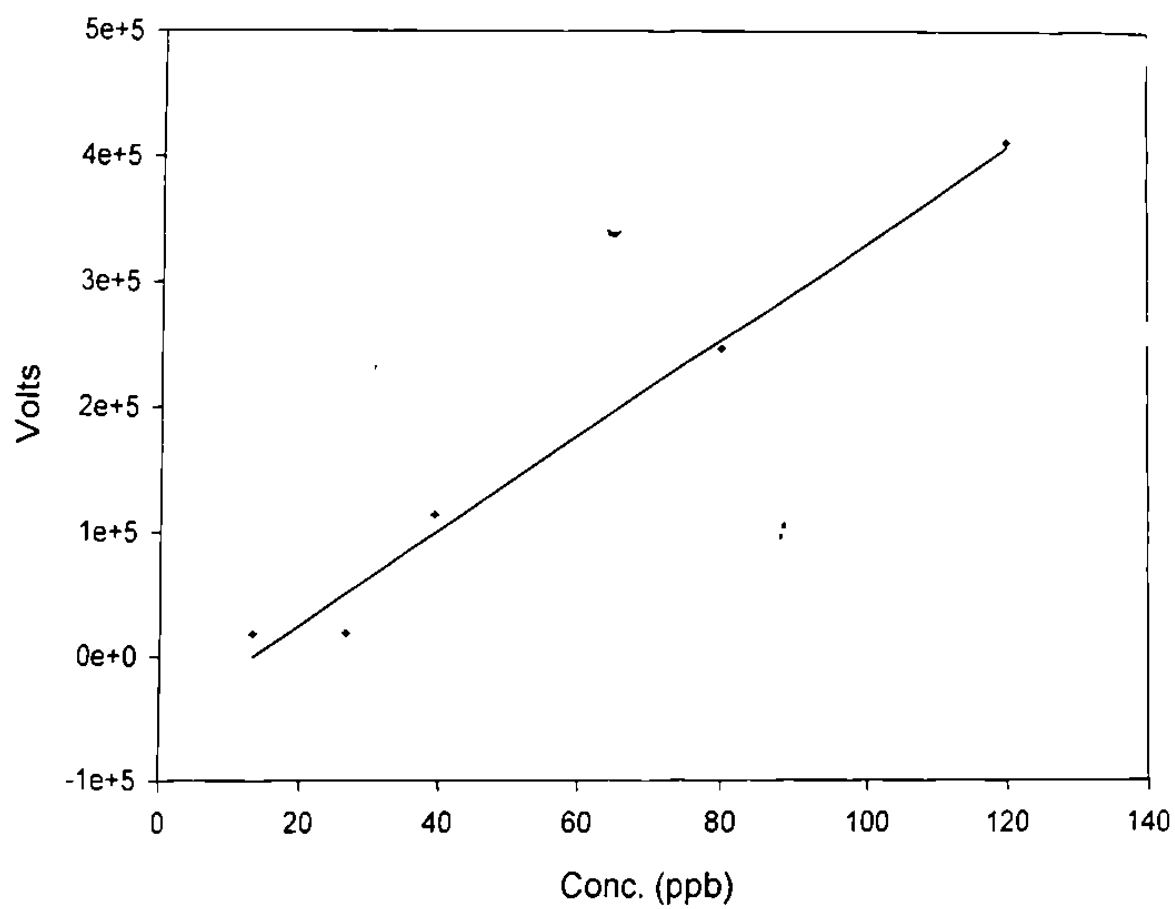
Fig. 19 Curva de calibración del estándar de AFB₂

Fig. 20 Curva de calibracion para la aflatoxina G₁

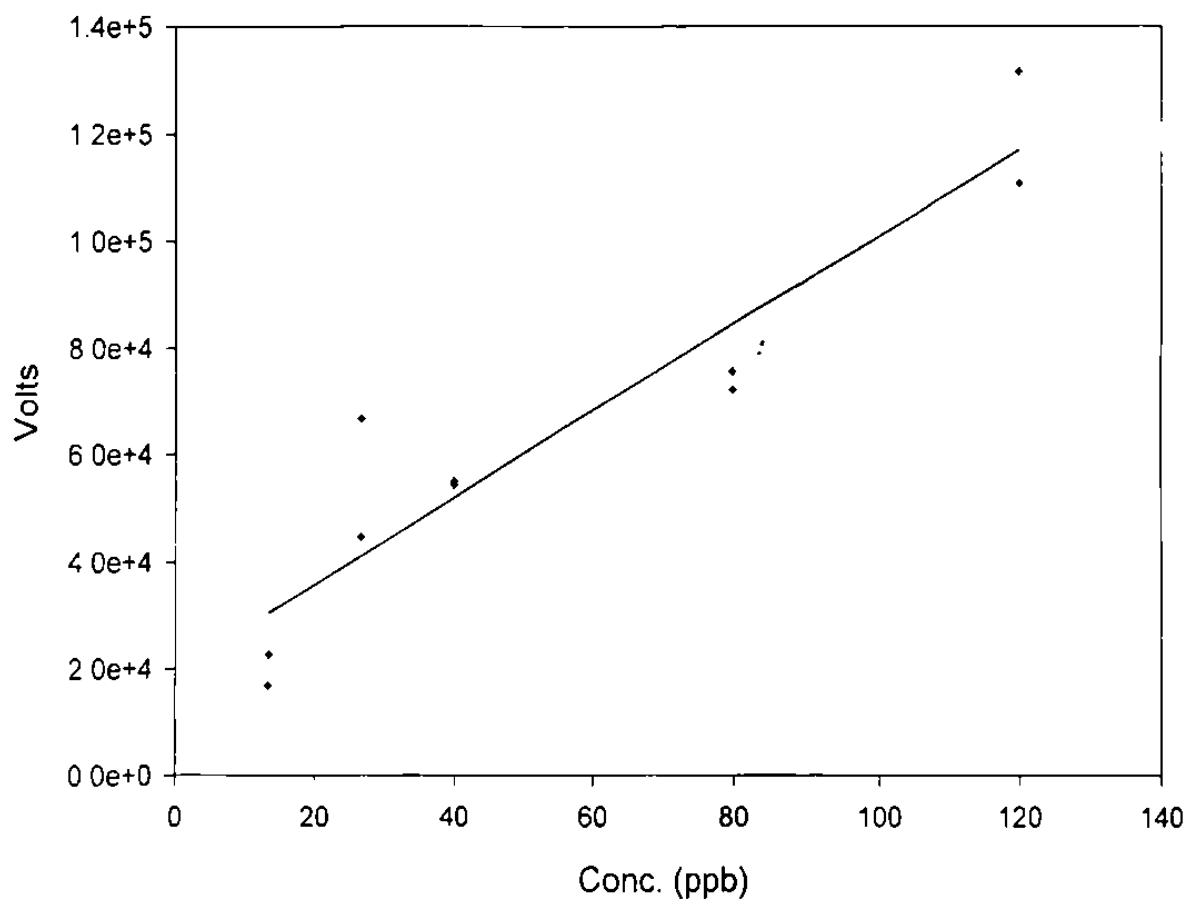
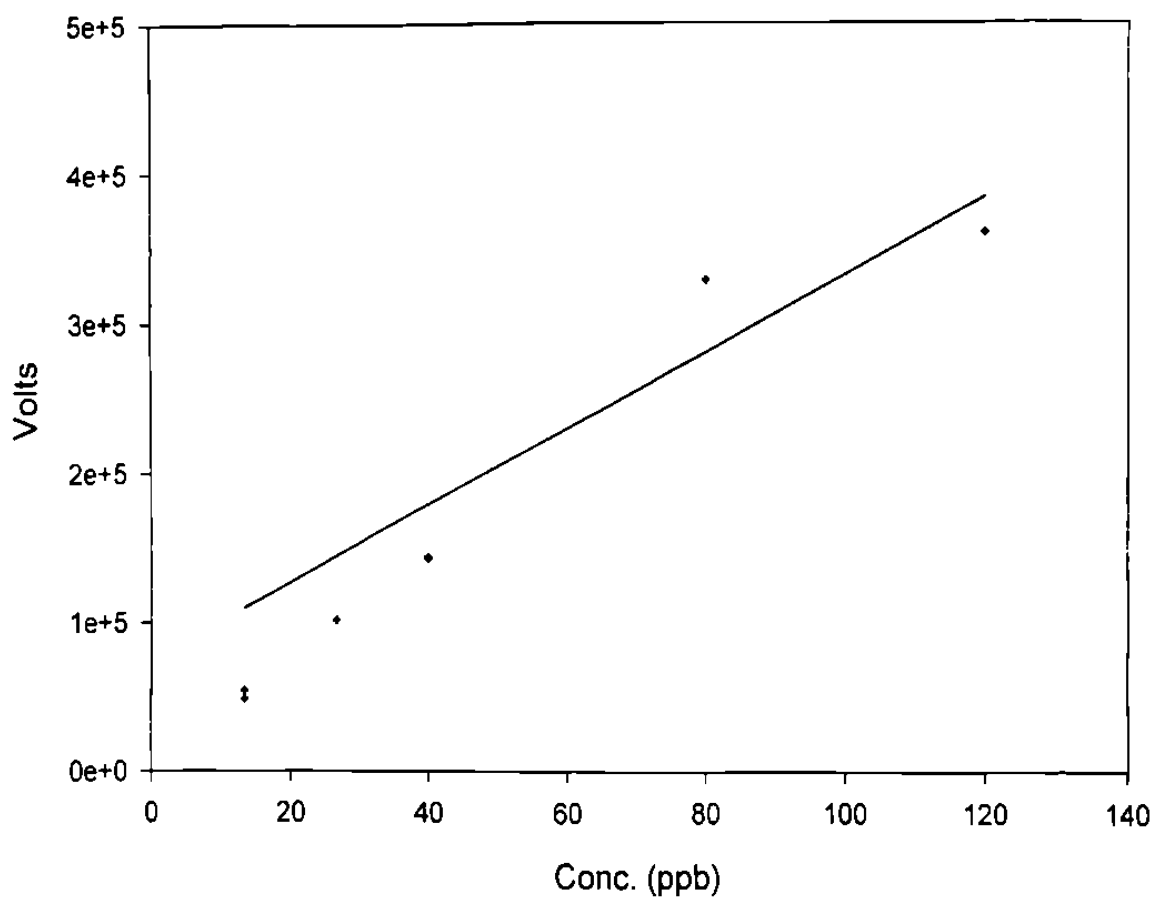


Fig. 21 Curva de calibración del estándar de aflatoxina G₂



Después, se procedió al análisis de los resultado para obtener la curva de calibración en forma lineal, de la cual se obtuvo que la aflatoxina B1, obedece a una ecuación dada por $Y = 2268.95X + 60722.34$, con un coeficiente de correlación de 0.94 (Fig. 18). En base al resultado anterior se tomó como válido tal diagrama para obtener posteriormente las concentraciones en cada muestra de maíz.

En la Fig. 19 se muestra la gráfica correspondiente a la concentración de la aflatoxina B2 en 5 diferentes diluciones, obteniéndose la siguiente ecuación: $Y = 2855.76X - 11126.79$, con un coeficiente de correlación de 0.92. Para la aflatoxina G1, la ecuación que origina la curva de calibración es: $Y = 2811.86 X + 45646.0$, con un coeficiente de correlación de 0.98 (Fig. 20). Por último tenemos la curva de calibración para la aflatoxina G2, la cual esta dada por la siguiente ecuación: $Y = 813.2 X + 19524.33$ con coeficiente de correlación de 0.95 (Fig. 21).

Se cuantificaron AFB₂ y AFG₂ en la mayoría de las muestras obtenidas en el primer muestreo de ambos tipos de labranza. En la labranza convencional de 36 muestras procesadas, 32 tuvieron al menos un tipo de toxina y ninguna presentó los cuatro tipos de micotoxinas a la vez. En el caso de la AFB₁ solo el 12.5% de las muestras la presentaron mientras que en labranza en conservación no se detectó.

Fig. 13.- Cromatograma con una mezcla de aflatoxinas.

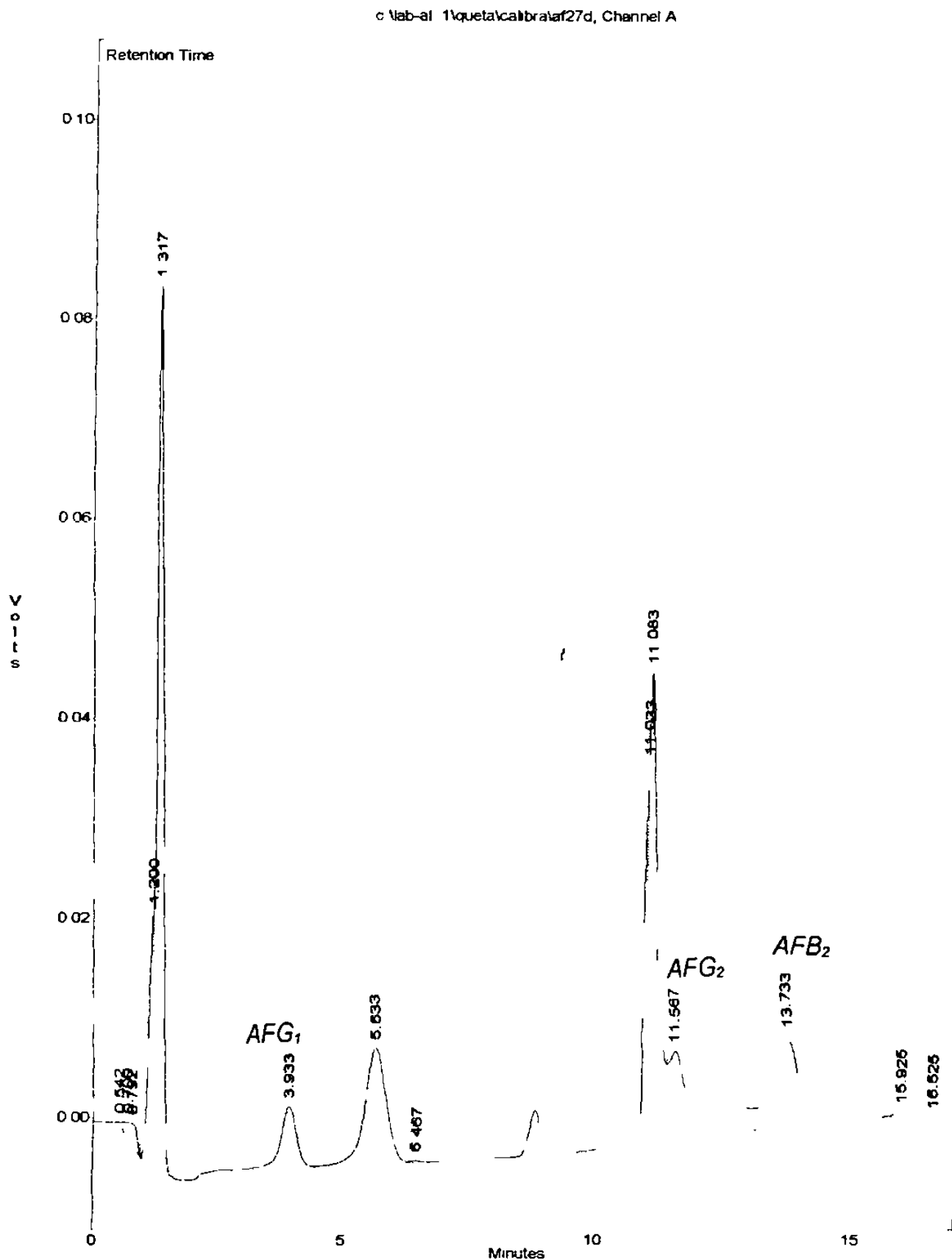


Fig. 14.- Cromatograma de la solución derivatizante.

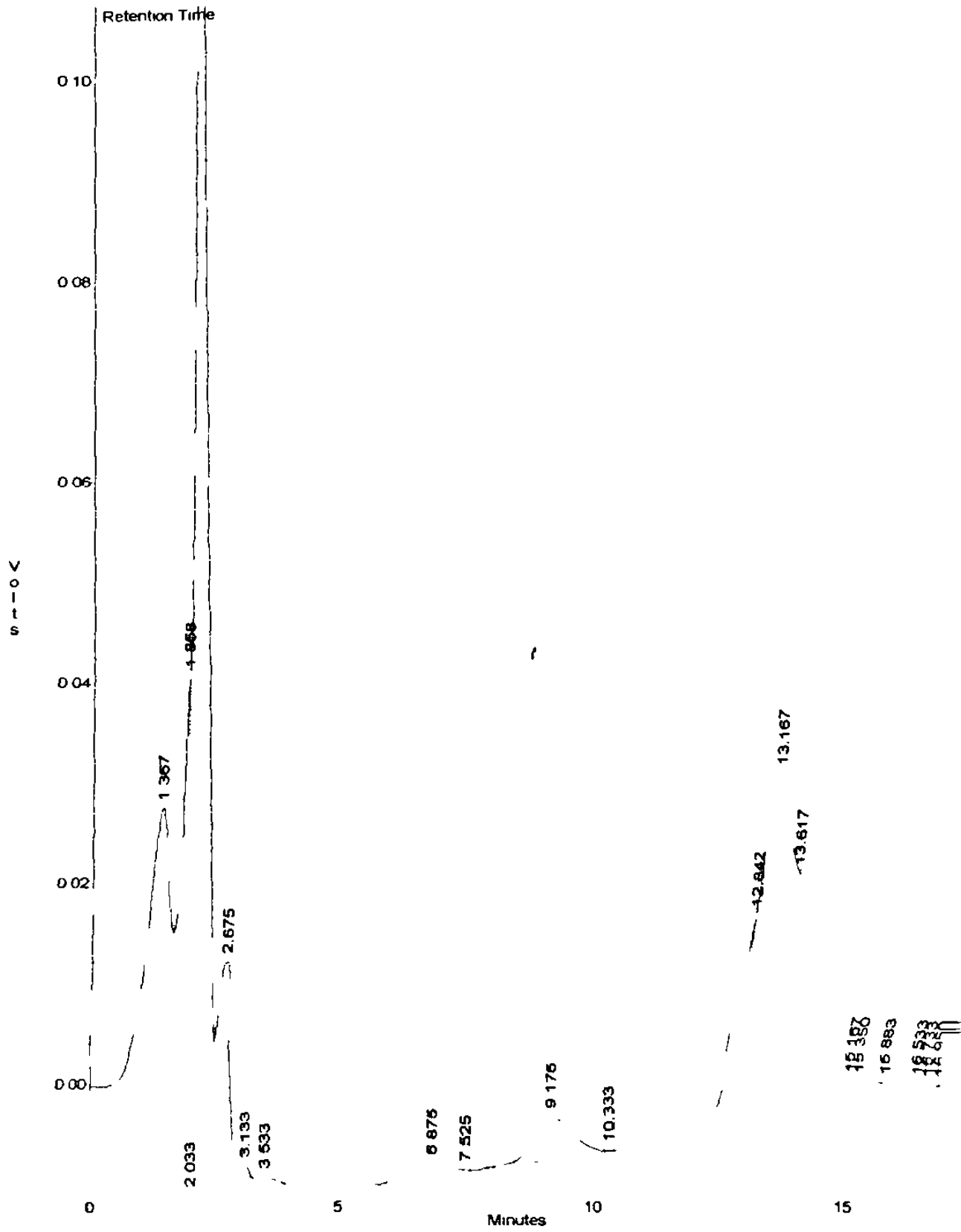


Fig. 15.- Cromatograma de la curva de calibración.

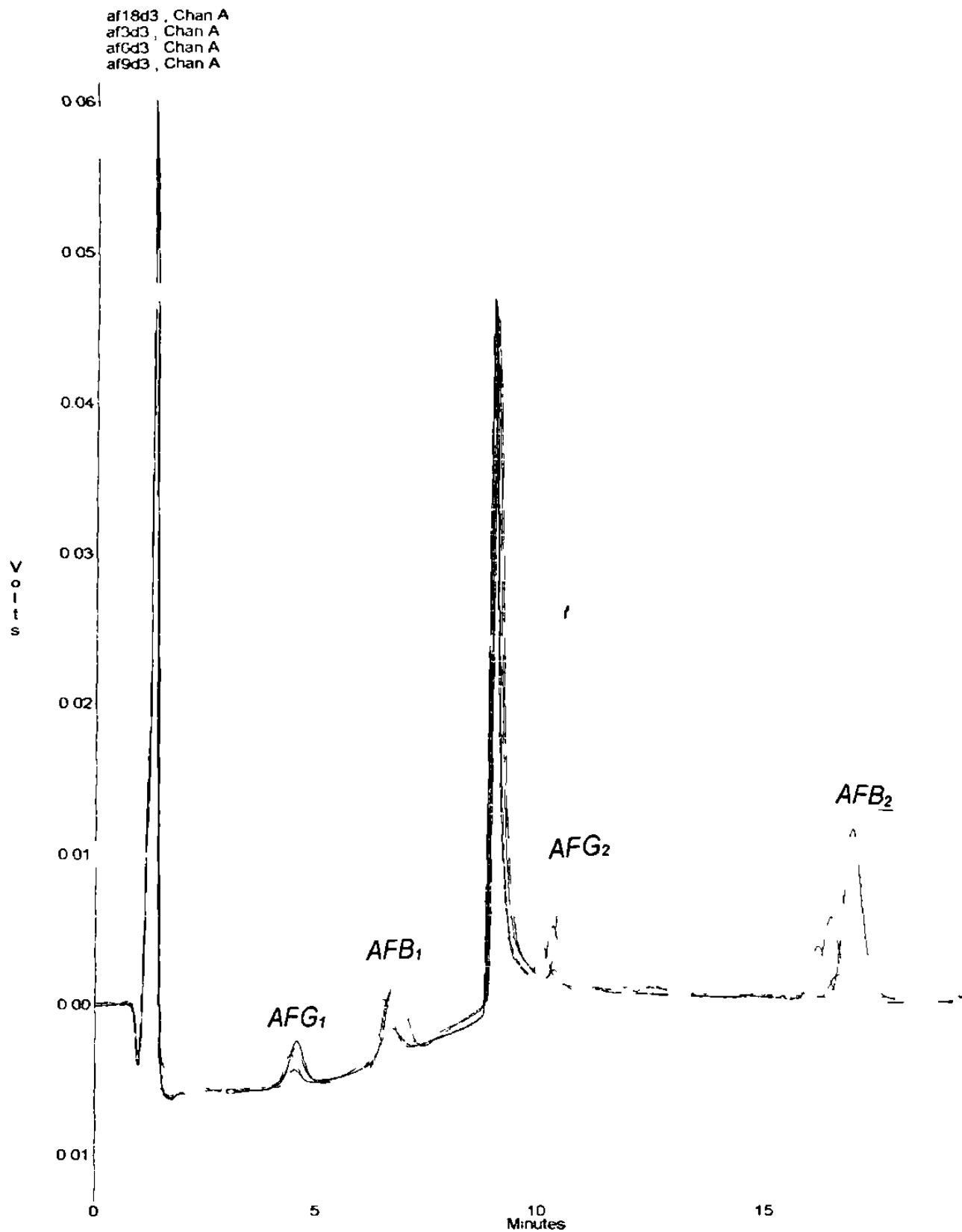


Fig. 16.- Cromatograma de un extracto de maíz resistente al ataque por hongos aflatoxigénicos.

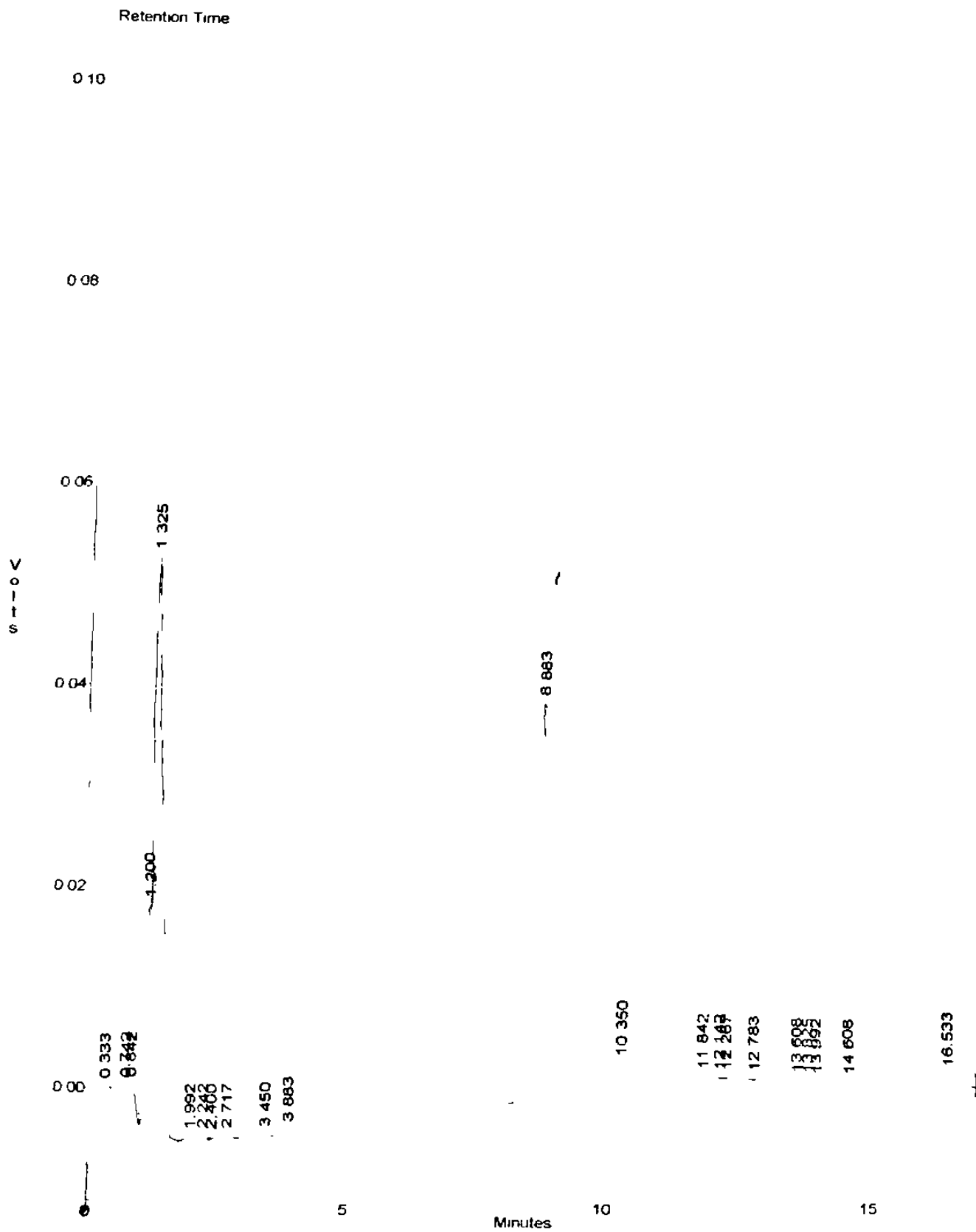
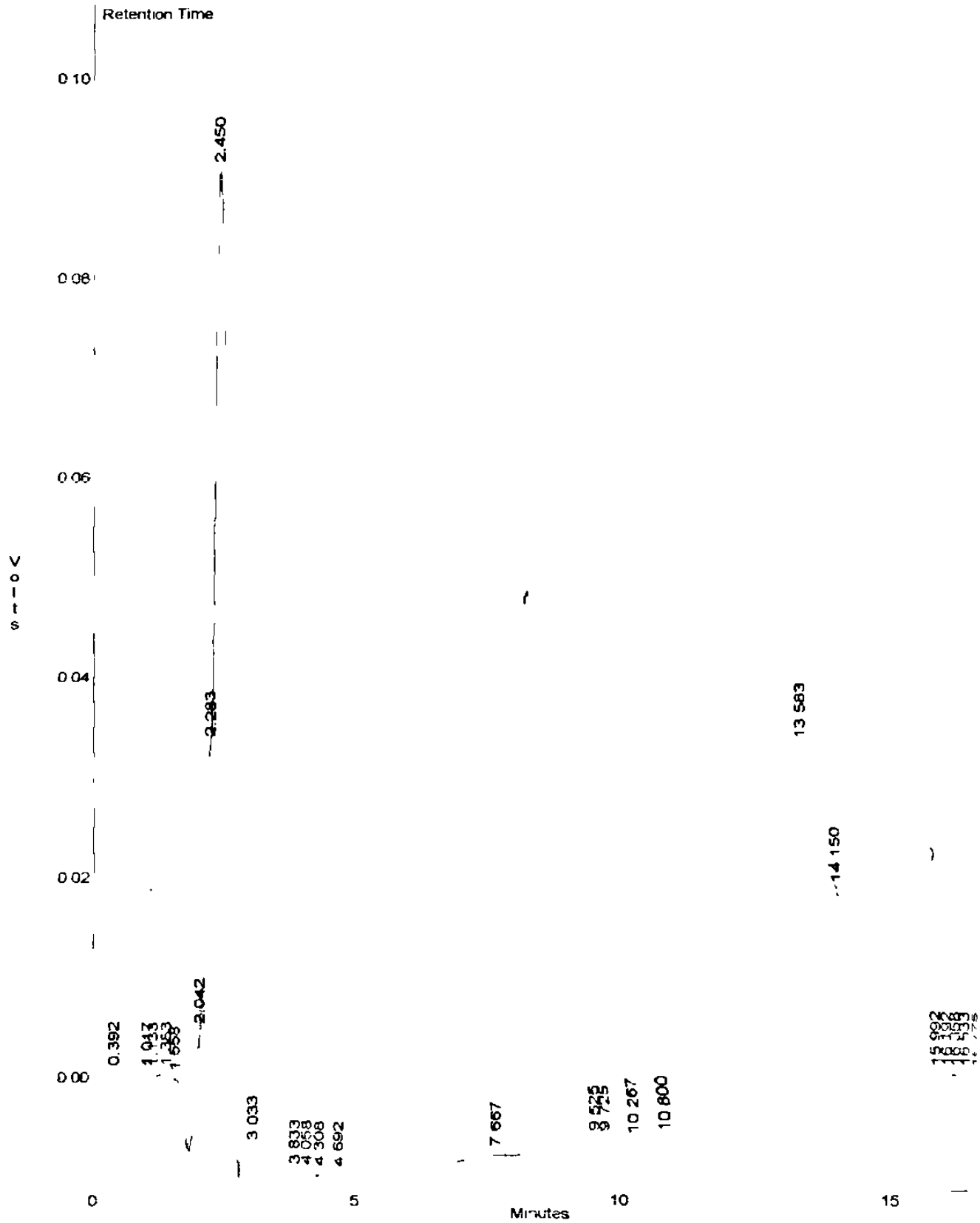


Fig. 17.- Cromatograma del medio de cultivo (A & M) utilizado para el crecimiento de cepas aflatoxigénicas



El 90.5% de las muestras en labranza convencional presentaron AFB₂, en donde la cantidad mínima detectable fue de 29 ppb, con máximo de 348 ppb. Además cuatro muestras presentaron entre 106 y 156 ppb, el resto permaneció por debajo de 70 ppb. En el caso de la aflatoxina G₁, el 62.5% de la muestras no se detectó dicha toxina y el valor mínimo fue de 10 ppb con valores hasta de 69670 y 7062 ppb. El resto tuvo valores menores a 200 ppb. Por último la AFG₂, aproximadamente el 32% de las muestra no se detectó y en el resto presentaron valores de 2 ppb con un máximo de 69 ppb.

Para la labranza en conservación, se procesaron el mismo número de muestras que para la labranza convencional; de las cuales 25 presentaron al menos una de la cuatro micotoxinas; sin embargo, no se detectó AFB₁. En cambio el 92% de las muestras tenía al menos 29 ppb de AFB₂, y en algunas ocasiones se cuantificó hasta 66 ppb. Para el caso de la AFG₁ solo en dos muestras se presentó esta toxina y el 92% contenían AFG₂ aflatoxina en un rango de 0 - 65 ppb.

De forma muy general, en la labranza en conservación se observó una menor cantidad significativa de los niveles de las aflatoxina, ya que los valores máximos no son mayores a 70 ppb. Además tanto en la AFG₁ como la AFB₁ no se detectaron niveles de aflatoxinas. Por último, las muestras de maíz con labranza mostraron valores máximos hasta de 69670 ppb esto es solo para una muestra, mientras que el resto tuvo valores menores a 200 ppb (Tabla 11).

Tabla 11.- Concentración (ppb) de aflatoxinas en maíz muestreado en el primer periodo

| No. | Labranza convencional | | | | Labranza en conservación | | | |
|-----|-----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ |
| 1 | 0 | 39 | 0 | 53 | 0 | 38 | 0 | 39 |
| 2 | 0 | 69 | 0 | 99 | 0 | 47 | 0 | 65 |
| 3 | 3 | 0 | 14 | 0 | 0 | 38 | 2.22 | 24 |
| 4 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 22 | 0 | 0 | 0 | 26 |
| 6 | 0 | 29 | 0 | 2 | 0 | 45 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 30 | 14 | 6 | 0 | 39 | 0 | 8 |
| 8 | 0 | 29 | 0 | 14 | 0 | 34 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 134 | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 49 |
| 10 | 0 | 32 | 0 | 42 | 0 | 29 | 0 | 11 |
| 11 | 0 | 30 | 28 | 47 | 0 | 29 | 1.34 | 23 |
| 12 | 0 | 31 | 0 | 51 | 0 | 29 | 0 | 29 |
| 13 | 0 | 37 | 0 | 15 | 0 | 29 | 0 | 23 |
| 14 | 0 | 33 | 0 | 19 | 0 | 29 | 0 | 17 |
| 15 | 0 | 29 | 0 | 16 | 0 | 29 | 0 | 54 |
| 16 | 0 | 58 | 0 | 13 | 0 | 29 | 0 | 13 |
| 17 | 0 | 29 | 61 | 16 | 0 | 29 | 0 | 13 |
| 18 | 0 | 37 | 0 | 12 | 0 | 29 | 0 | 5 |
| 19 | 0 | 30 | 0 | 4 | 0 | 29 | 0 | 11 |
| 20 | 0 | 156 | 69670 | 16 | 0 | 25 | 0 | 5 |
| 21 | 0 | 148 | 7062 | 2 | 0 | 29 | 0 | 31 |
| 22 | 0 | 61 | 52 | 32 | 0 | 30 | 0 | 0 |
| 23 | 0.64 | 56 | 0 | 36 | 0 | 66 | 0 | 21 |
| 24 | 0 | 69 | 10 | 69 | 0 | 53 | 0 | 36 |
| 25 | 0 | 74 | 28 | 22 | 0 | 30 | 0 | 28 |
| 26 | 0 | 79 | 13 | 0 | | | | |
| 27 | 0 | 43 | 0 | 0 | | | | |
| 28 | 0 | 32 | 0 | 0 | | | | |
| 29 | 0 | 33 | 194 | 0 | | | | |
| 30 | 60 | 31 | 56 | 0 | | | | |
| 31 | 0 | 348 | 0 | 0 | | | | |
| 32 | 4 | 106 | 0 | 0 | | | | |

En el segundo período tenemos que todas las muestras procesadas presentaron al menos una aflatoxina. En el caso de la labranza convencional no se cuantificó AFG₂, teniendo un índice elevado de AFB₂ en donde los valores máximos fueron de 223 y 192 ppb. El resto de las muestras tienen menos de 119 ppb y el mínimo detectable fue de 29 ppb. La AFB₁ el 19.5% de la muestra fueron negativas el resto presentó valores que fluctúan entre 3 y 70 ppb, aunque se tiene muestras que poseen hasta 1111 ppb.

Para las muestras con labranza en conservación, la AFG₂ fue la que se detectó en un número menor de muestras, ya que solo 4 de ellas presentaron esta toxina con valores entre 3 y 233 ppb. Con respecto a la AFG₁, ésta no se detectó en el 47% de las muestras, en tanto que en el resto las concentraciones fueron menores de 8059 ppb. El 100% de las muestras procesadas presentó AFB₂ con valores entre 467.38 y 29.62 ppb, sin dejar aún lado muestras que contenían hasta 1014, 1554 y 2396 ppb. Por último, tenemos la AFB₁ se presentó en un 95% de las muestras con valores muy variables que van desde 11 ppb hasta 483 ppb, nuevamente se tiene cantidades de hasta 1271 y 5864 ppb. Comparada con el resto de las muestras, aquí es en donde se tiene las concentraciones más elevadas en un gran número de muestras provenientes de ambos tipos de labranza (Tabla 12).

Tabla 12.- Concentración (ppb) de aflatoxinas en maíz muestreado en el segundo periodo

| No. | Labranza convencional | | | | Labranza en conservación | | | |
|-----|-----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ |
| 1 | 38 | 35 | 0 | 0 | 81 | 145 | 0 | 0 |
| 2 | 35 | 0 | 0 | 0 | 13 | 53 | 39 | 0 |
| 3 | 53 | 0 | 0 | 0 | 91 | 467 | 0 | 0 |
| 4 | 60 | 34 | 0 | 0 | 70 | 74 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 29 | 0 | 0 | 5 | 134 | 0 | 0 |
| 6 | 70 | 39 | 19 | 0 | 41 | 137 | 67 | 38 |
| 7 | 98 | 34 | 0 | 0 | 11 | 87 | 0 | 3 |
| 8 | 18 | 34 | 21 | 0 | 83 | 210 | 8059 | 233 |
| 9 | 74 | 31 | 85 | 0 | 173 | 30 | 72 | 0 |
| 10 | 31 | 48 | 0 | 0 | 42 | 1014 | 0 | 0 |
| 11 | 100 | 70 | 65 | 00 | 314 | 38 | 0 | 0 |
| 12 | 53 | 41 | 0 | 0 | 348 | 66 | 0 | 0 |
| 13 | 3 | 29 | 285 | 0 | 39 | 44 | 0 | 0 |
| 14 | 51. | 29 | 17. | 0 | 33 | 34 | 0 | 0 |
| 15 | 82 | 192 | 0 | 0 | 0 | 33 | 99 | 0 |
| 16 | 11 | 119 | 0 | 0 | 68 | 158 | 0 | 0 |
| 17 | 17 | 54 | 0 | 0 | 408 | 138 | 0 | 0 |
| 18 | 14 | 31 | 0 | 0 | 359 | 170 | 0 | 0 |
| 19 | 14 | 29 | 0 | 0 | 483 | 1554 | 0 | 0 |
| 20 | 33 | 29 | 0 | 0 | 5864 | 2396 | 868 | 0 |
| 21 | 111 | 30 | 0 | 0 | 129 | 360 | 116 | 0 |
| 22 | 11 | 29 | 0 | 0 | 1271 | 140 | 119 | 0 |
| 23 | 38 | 33 | 0 | 0 | 427 | 29 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 34 | 6 | 0 | 0 | 32 | 4 | 0 |
| 25 | 0 | 29 | 44 | 0 | 134 | 39 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 49 | 0 | 0 | 120 | 29 | 0 | 0 |
| 27 | 0 | 87 | 0 | 0 | 57 | 29 | 56 | 233 |
| 28 | 0 | 47 | 0 | 0 | 0 | 56 | 180 | 52 |
| 29 | 0 | 37 | 0 | 0 | 21 | 206 | 4 | 0 |
| 30 | 16 | 223 | 0 | 0 | 127 | 157 | 94 | 0 |
| 31 | 44 | 38 | 0 | 0 | 59 | 114 | 742 | 0 |
| 32 | 108 | 29 | 0 | 0 | 7 | 135 | 354 | 0 |
| 33 | 2 | 29 | 0 | 0 | 45 | 96 | 128 | 0 |
| 34 | 38 | 38 | 0 | 0 | 110 | 32 | | 0 |
| 35 | 8 | 29 | 0 | 0 | 212 | 262 | 0 | 0 |

El tercer muestreo, se caracterizó del resto porque existe un número menor de muestras con al menos una toxina, ya que de 36 que se procesaron solo en 19 se cuantificaron las aflatoxinas tanto en labranza convencional como en conservación, además los niveles de las micotoxinas no sobrepasaron de 254 ppb con un valor mínimo detectable de 0.92 ppb.

En el caso de la labranza convencional, todas las muestras fueron negativas para la AFB₁, mientras que para el caso de la AFB₂ solo una muestra estuvo carente de ella, los valores encontrados estuvieron entre 29 y 51 ppb, cabe mencionar que no se presentaron niveles superiores 51 ppb. El 59.9% de las muestras contenía AFG₁ con un rango de concentración entre 10 y 30 ppb, aunque se tuvo solo una muestra con 70.39 ppb. Para la AFG₂ solo el 15% de las muestras fueron negativas, los valores máximos obtenidos fueron de 323.56 y 102.3 ppb, pero la mayoría de las muestras se encontraban en un rango de 19 a 91 ppb.

Para labranza en conservación tanto la aflatoxina G₁ como la B₁ fueron las que menor incidencia tuvieron las muestras procesadas con valores de 40 y 86 ppb. La mayoría de los ejemplares tuvieron cantidades considerables de AFB₂ y AFG₂. Para el primer caso, en el 78% aproximadamente, la concentración en las muestras fue de 29 a 58 ppb y solo en la segunda situación se tuvieron 75 y 63 ppb; en la AFG₁ al menos en 17 muestras se determinó cantidades de esta toxina con valores entre

0.97 y 57 ppb y los valores máximo determinados fueron de 254, 251 y 197 ppb.

Tabla 13.- Concentración (ppb) de aflatoxinas en maíz muestreado en el tercer periodo

| No. | Labranza convencional | | | | Labranza en conservación | | | |
|-----|-----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ |
| 1 | 0 | 51 | 14 | 61 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| 2 | 0 | 39 | 0 | 50 | 52 | 0 | 0 | 254 |
| 3 | 0 | 41 | 0 | 69 | 0 | 63 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 1 |
| 5 | 0 | 41 | 0 | 0 | 0 | 58 | 0 | 1 |
| 6 | 0 | 41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 47 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 36 | 0 | 0 | 0 | 33 | 0 | 22 |
| 9 | 0 | 34 | 0 | 323 | 0 | 61 | 0 | 7 |
| 10 | 0 | 35 | 0 | 19 | 0 | 35 | 0 | 18 |
| 11 | 0 | 29 | 28 | 31 | 0 | 0 | 58 | 22 |
| 12 | 0 | 30 | 70 | 102 | 0 | 34 | 0 | 6 |
| 13 | 0 | 29 | 26 | 47 | 0 | 36 | 0 | 19 |
| 14 | 0 | 39 | 0 | 52 | 0 | 47 | 0 | 47 |
| 15 | 0 | 30 | 29 | 46 | 40 | 29 | 86 | 197 |
| 16 | 0 | 36 | 22 | 91 | 0 | 30 | 0 | 251 |
| 17 | 0 | 31 | 0 | 30 | 0 | 30 | 0 | 30 |
| 18 | 0 | 30 | 10 | 25 | 0 | 31 | 0 | 57 |
| 19 | 0 | 31 | 12 | 20 | 0 | 29 | 0 | 30 |

Se determinó la distribución de las aflatoxinas, para observar de manera gráfica como en un determinado momento los hongos toxigénicos pueden invadir las plantas. La aflatoxina G₁ en labranza convencional, no presentó concentraciones detectables en las muestras procesadas; pero para el caso de esta misma toxina, en labranza en conservación se observa

como existen regiones bien localizadas que poseen valores elevados (Fig. 22).

Para la AFB₂ en labranza en conservación, también existió una región donde se encontró en mayor cantidad quedando el resto de las plantas libres de aflatoxina hasta el momento del muestreo (Fig. 23). Sin embargo, en el caso de la labranza convencional, la AFB₂ se encuentra muy dispersa en todas las muestras por lo que existe mayor probabilidad de que aumente su concentración una vez almacenado el grano, aún cuando los valores determinados fueron relativamente pequeños; también podemos apreciar en el mapa de distribución como existen regiones en donde las muestras están exentas de aflatoxina (Fig. 24).

La AFB₁ tiene la característica de que conforme las muestras tomadas están más orientadas hacia la parte Este del terreno, las concentraciones son menores, tal fenómeno se percibe en ambos tipos de labranza, a pesar de que en la labranza en conservación los niveles de toxina detectados son mucho mayores comparados con los de labranza en conservación (Fig. 25 y 26).

Para finalizar tenemos la AFG₂ con mapas de distribución algo diferentes, debido a que en las muestras con labranza en conservación la mayor parte de las muestras tomadas un poco al Este y al Norte del terreno, poseen cantidades considerables de esta micotoxina (Fig. 27), mientras que en la labranza convencional, las concentraciones presentes en las muestra

están un poco dispersas, ya que hay mayor cantidad de toxina hacia el Norte, misma que va disminuyendo a la altura de 15 m aproximadamente y después de 8 m la concentración se vuelve a incrementar (Fig. 28).

Fig. 22 Distribución de la aflatoxina G_1 en maíz con labranza en conservación

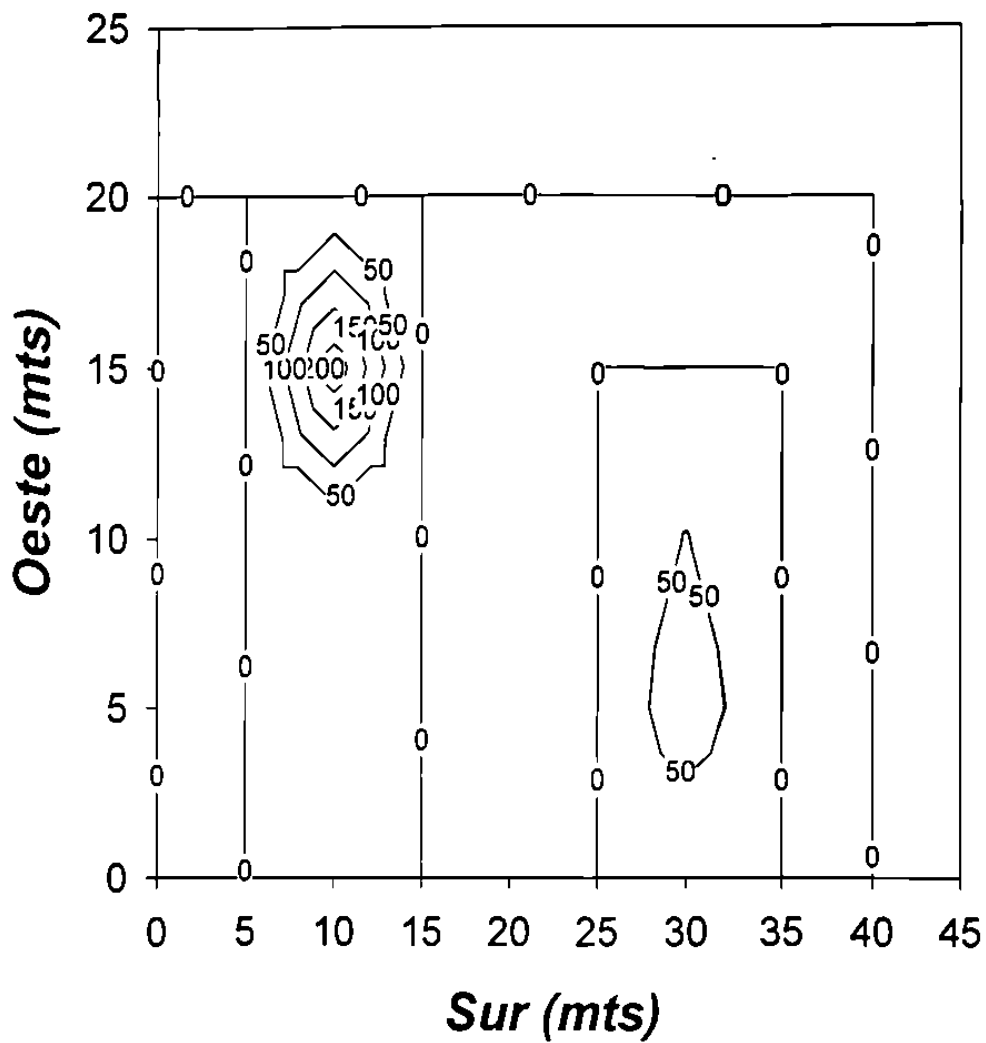


Fig. 23 Distribución de la aflatoxina B₂ en maíz con labranza en conservación

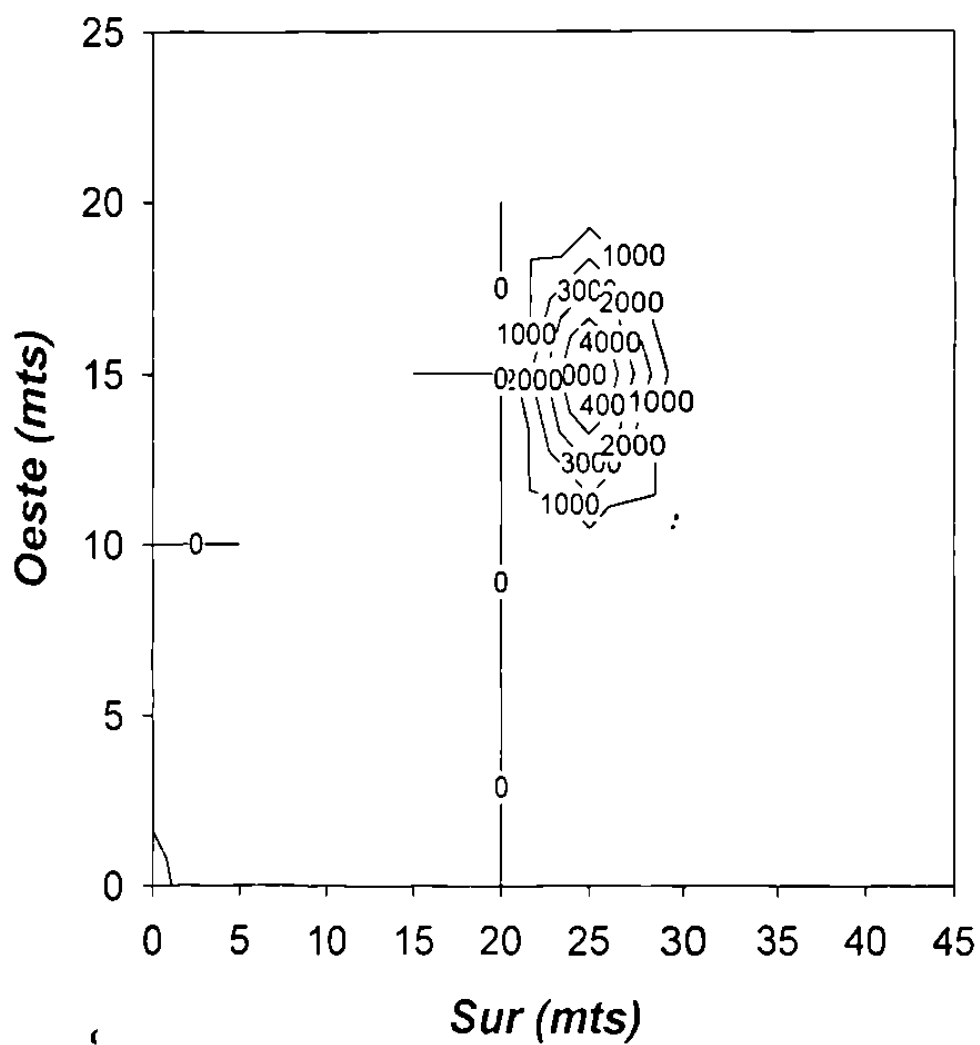


Fig. 24 Distribución de la aflatoxina B₂ en maíz con labranza en convencional

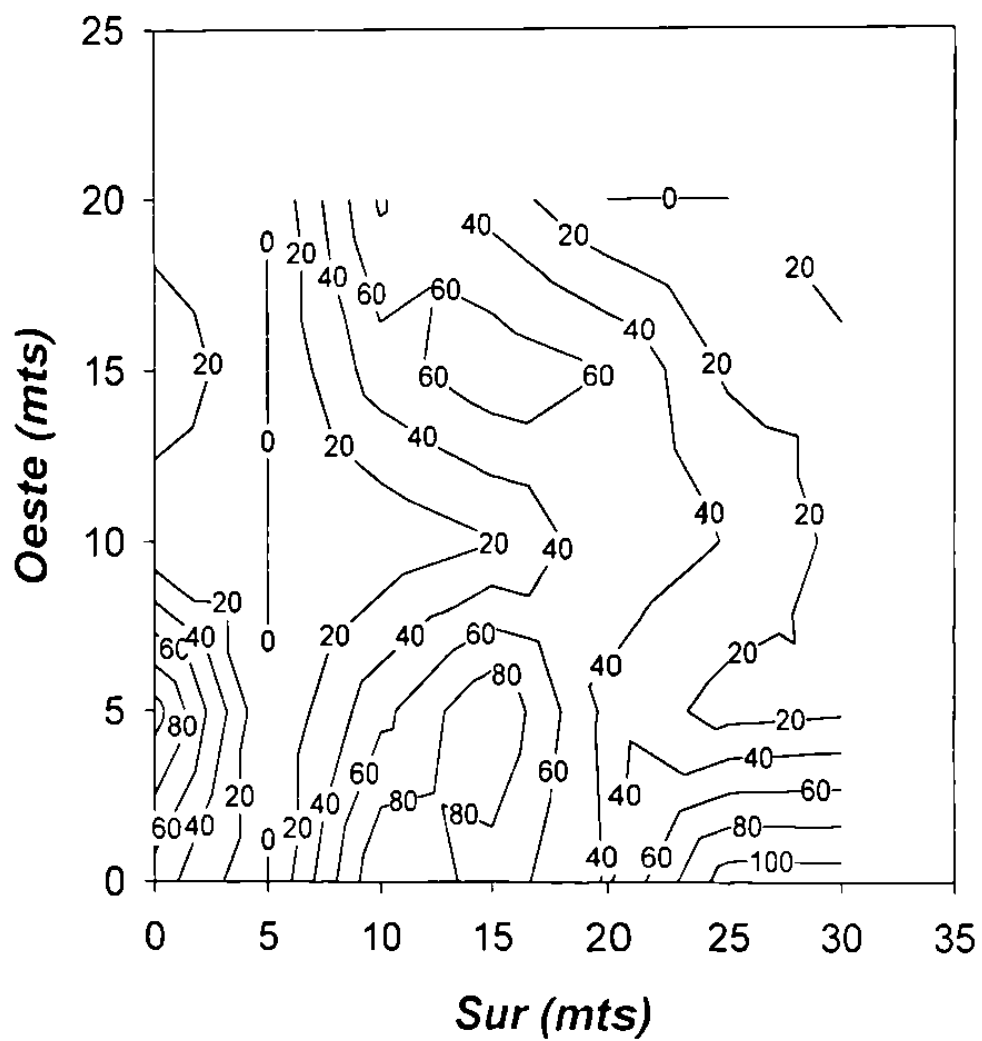


Fig. 25 Distribución de la aflatoxina B₁ en maíz con labranza en conservación.

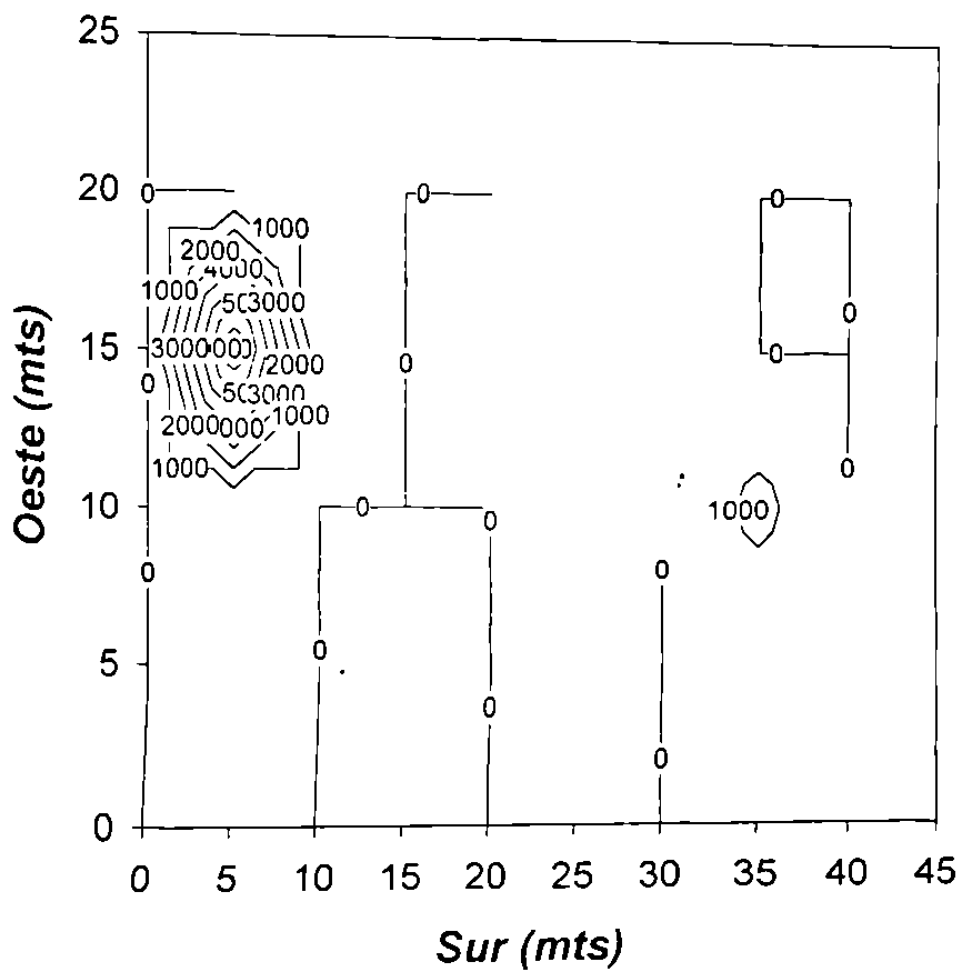


Fig. 26 Distribución de la aflatoxina B₁ en maíz con labranza en convencional

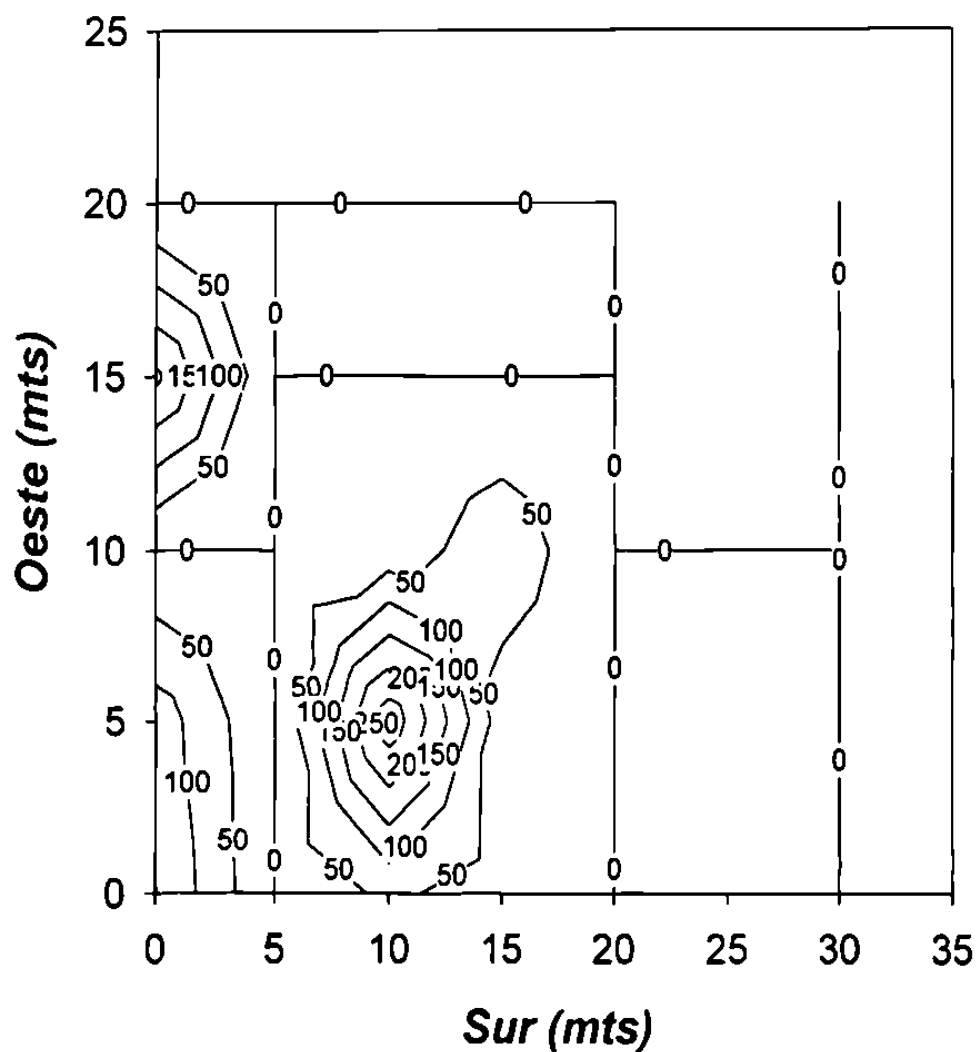


Fig. 27 Distribución de la aflatoxina G₂ en maíz con labranza en conservación

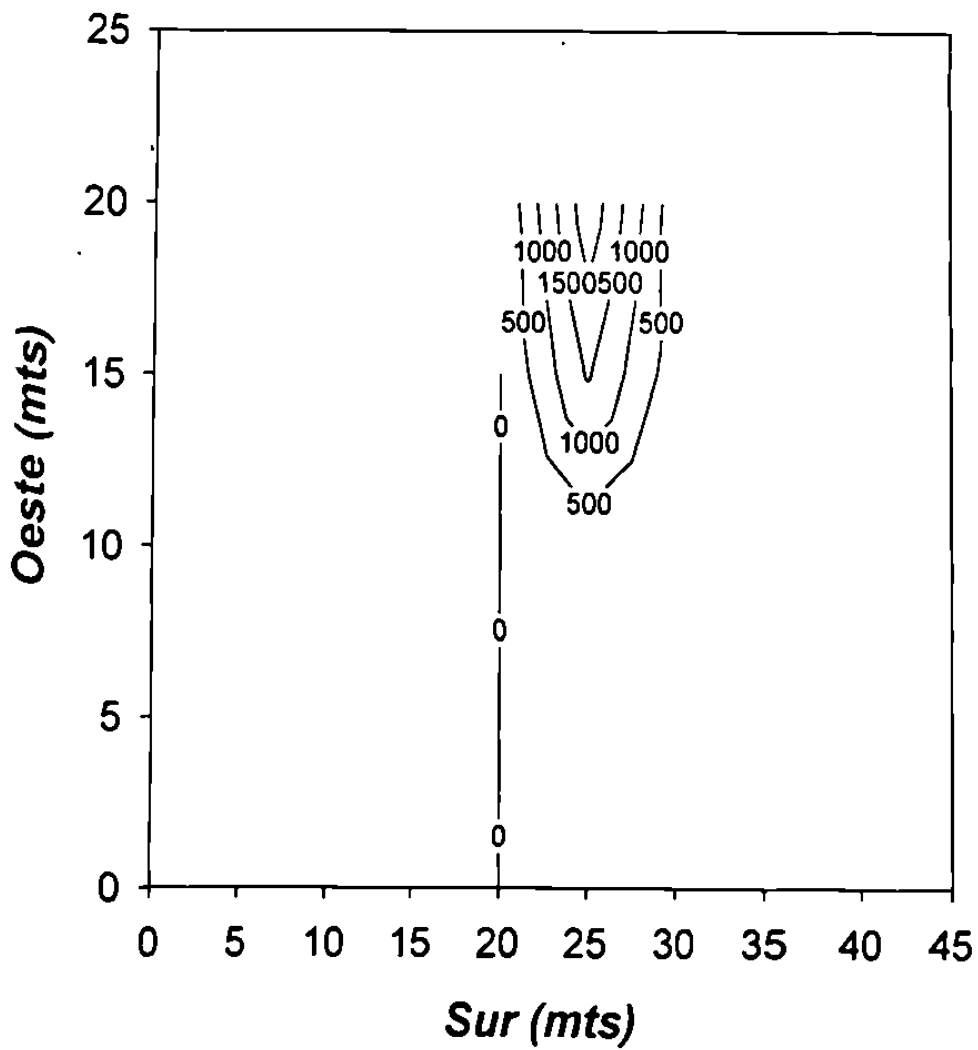
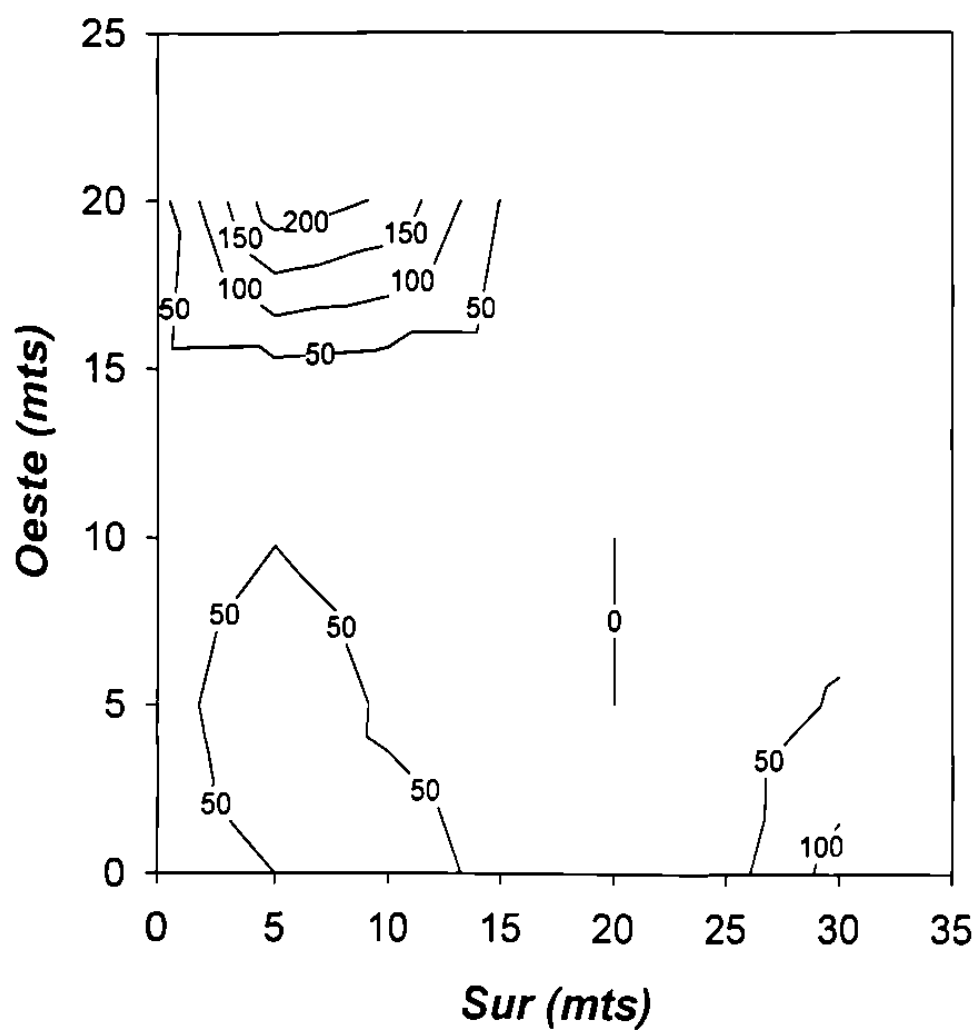


Fig. 28 Distribución de la aflatoxina G₂ en maíz con labranza en convencional



Para la identificación de cepas productoras de micotoxinas, primeramente se ensayo con cepas control de *A. flavus* y *A. parasiticus*, de las cuales no se detectaron las cuatro toxinas a la vez ya que para el caso de *A. parasiticus* se presentaron al menos 2 tipos de aflatoxina (tabla 14). Los rangos de concentración van desde 92 -12 ppb.

Tabla 14.- Determinación de la concentración de aflatoxina (ppb/mg de micelio), sintetizadas por las cepas de referencia *A. flavus* y *A. parasiticus*

| | <i>AFB₁</i> | <i>AFB₂</i> | <i>AFG₁</i> | <i>AFG₂</i> |
|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>A. parasiticus</i> | 92 | 22 | - | - |
| <i>A. parasiticus</i> | 36 | - | - | - |
| <i>A. flavus</i> | | 12 | | 48 |
| <i>A. flavus</i> | - | 45 | - | 43 |
| <i>A. parasiticus</i> | 73 | - | - | 9 |

Se obtuvieron 84 cepas de los granos de maíz, de las cuales 20 no produjeron ningún tipo de aflatoxina, mientras que 64 cepas produjeron al menos un tipo de micotoxina, de estas, solo 4 correspondieron a *A. flavus*, el resto correspondió a *A. parasiticus*. En cuanto, a la cantidad sintetizada se observó que la *AFG₁* es la que se encuentra en mayor proporción comparada con el resto de las toxinas. Los valores máximos detectable fueron de 880 ppb aunque se tuvieron algunas muestras que solo poseen 1 ppb. Para la *AFB₁*, aproximadamente el 50% de las cepas la produjeron con valores máximos de 594 y 880 ppb, el resto de las muestras presentaron

concentraciones de menos de 32 ppb. Solo 7 cepas del total pudieron sintetizar la AFG₂ con valores que van desde 17 hasta 289 ppb, aunque se tiene una cepa con 880 ppb/mg de micelio. Por último, tenemos la AFB₂, la cual aproximadamente el 80% de la cepas presentaron esta toxina con concentraciones que van desde 1 hasta 15 ppb/ mg de micelio producido por el hongo (Tabla 16).

En lo que respecta a las cepas aisladas de esclerocios, se tiene que solo se aislaron 5, de las cuales en todas se presentó la AFG₁; después la sigue la AFB₁, que solo en dos muestras se cuantificó, el resto de las toxina no se presentaron (Tabla 15).

Tabla 15.- Concentración de aflatoxinas (ppb/ mg de micelio) en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aisladas de esclerocios

| No. | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ |
|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 13 | - | - | - |
| 2 | 4 | 19 | - | - |
| 3 | 7 | 238 | - | - |
| 4 | 4 | - | - | - |
| 5 | 5 | - | - | - |

Tabla 16.- Concentración de las aflatoxinas (ppb/ mg de micelio) encontradas en las diferentes cepas del *A. flavus* y *A. parasiticus*

| No. | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ | No. | AFB ₁ | AFB ₂ | AFG ₁ | AFG ₂ |
|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 110 | 594 | - | 8 | 33 | 59 | - | - | - |
| 2 | - | 8 | - | - | 34 | 1 | - | - | - |
| 3 | 3 | 8 | 2 | - | 35 | 880 | 880 | 880 | 880 |
| 4 | - | - | 7 | - | 36 | 32 | - | - | - |
| 5 | 8 | - | - | - | 37 | 25 | - | - | - |
| 6 | 7 | 7 | - | - | 38 | 15 | - | - | - |
| 7 | 6 | - | - | - | 39 | 1 | - | - | - |
| 8 | - | 2 | - | - | 40 | 1 | - | 197 | - |
| 9 | 1 | - | - | 3 | 41 | 75 | - | 17 | - |
| 10 | 2 | 1 | 1 | 1 | 42 | 7 | 6 | - | - |
| 11 | 1 | 5 | - | - | 43 | 253 | - | - | 1 |
| 12 | 1 | - | - | - | 44 | 4 | 2 | - | - |
| 13 | 3 | - | - | 2 | 45 | 21 | - | - | 4 |
| 14 | 9 | 3 | - | 3 | 46 | 3 | 4 | - | - |
| 15 | - | 32 | - | - | 47 | 193 | - | - | - |
| 16 | 15 | 1 | - | 1 | 48 | 29 | - | - | - |
| 17 | 3 | - | - | 15 | 49 | 3 | - | - | - |
| 18 | 19 | - | - | - | 50 | 2 | - | - | 3 |
| 19 | 10 | - | 18 | - | 51 | 13 | - | - | - |
| 20 | - | 2 | - | - | 52 | 10 | - | 13 | - |
| 21 | 8 | 1 | - | - | 53 | 3 | - | - | - |
| 22 | 2 | - | - | - | 54 | 21 | - | - | - |
| 23 | - | - | - | 2 | 55 | 26 | - | - | - |
| 24 | 4 | - | - | - | 56 | 5 | - | - | - |
| 25 | 1 | - | - | - | 57 | 4 | - | - | - |
| 26 | 98 | - | - | - | 58 | 6 | - | - | - |
| 27 | - | 15 | 289 | - | 59 | 2 | - | 13 | - |
| 28 | 4 | 1 | - | - | 60 | 38 | - | - | - |
| 29 | 3 | - | - | - | 61 | 28 | 1 | - | - |
| 30 | 2 | - | - | - | 62 | 4 | - | - | - |
| 31 | 43 | - | - | - | 63 | 11 | - | - | - |
| 32 | 2 | - | - | - | 64 | 11 | - | - | - |

RESULTADO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El número de cepas obtenidas en cada uno de las diferentes técnicas de aislamiento presentó una diferencia estadística ($p < 0.5$). Mediante una comparación de medias, se determinó que existe una diferencia significativa entre el número de cepas de *Aspergillus sp.* y de *Fusarium sp.*; por lo que puede influir en la presencia de las toxinas que ellas sintetizan. En cuanto a la comparación con otros géneros, no existe diferencia significativa.

Por medio de una análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, se obtuvo que el periodo en el cual se muestreo no tuvo ningún efecto sobre el número más probable de esporas ($p > 0.05$). Tanto el tipo de labranza como el periodo de muestreo influyó de forma significativa sobre la cantidad y tipo de hongos identificado. Se obtuvo que el maíz proveniente con la labranza convencional presenta un mayor número de hongos toxigénicos, que aquel proveniente de la labranza en conservación.

Los esclerocios enumerados a distintas profundidades del suelo también van a tener una variación estadísticamente significativa ($p < 0.05$), ya que el número de ellos va ha estar influenciado principalmente por los profundidad a la que fue tomada la muestras así como del tipo de labranza utilizada. Tales resultados también van a repercutir en la tipificación de las cepas que los sintetizan, ya que vemos, que conforme aumenta la profundidad del suelo, el género *Aspergillus* se aisló con menor frecuencia, siendo nula la presencia de otros hongos como *Penicillium sp.*

Para observar el efecto de la temperatura como factor determinante en el porcentaje de viabilidad de los esclerocios, no se presentó diferencia estadística ($p < 0.05$) alguna, ya que solo la diferencia esta dada por el tipo de labranza así como de la profundidad a la cual se tomó la muestras. Por tanto dicha diferencia también afecta la frecuencia de aislamiento del género *Aspergillus*.

Para finalizar, la determinación de la concentración de aflatoxinas presentes en maíz, estuvieron afectadas por el tipo de labranza así como por el período en el cual fue tomada la muestras ($p < 0.05$). Presentando menor concentración de aflatoxinas en el maíz cuyo método de cultivo fue el de labranza en conservación.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a reportes anteriores, puesto que en diversas investigaciones realizadas se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* como los principales contaminantes de algunos granos de interés comercial y del medio ambiente (Machorra V., *et al* 1992), por lo que son considerados como hongos de alto riesgo, ya que a parte de ser buenos productores de toxinas, en algunas ocasiones se han asociado con cuadros alérgicos severos (Rippon J., 1996).

Las cepas de *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.*, se presentaron en diferentes proporciones en los tres muestreos, ya que en el primero tuvimos mayor cantidad de cepas correspondientes al género *Aspergillus* y en menor proporción especies de *Fusarium*, en el resto de los muestreos se disminuyó considerablemente el número de cepas de *Aspergillus* y aumentó la cantidad de cepas de *Fusarium*. Dichos resultado concuerdan con los ya reportados para el aislamiento de estos hongos pero en sustratos diferentes al maíz (Songa. W., 1996; Danielsen S., 1996). Hay reportes en donde *Aspergillus sp.* puede estar parasitado con cepas de *Penicillium sp.*, ya que cuando se establecen cepas de *A. niger* ó *A. flavus* en un determinado sustrato se pueden contaminar con especies de *Penicillium*, sin que se puedan separar ambas (Rapell T.H., 1974). Estos dos fenómenos no se observaron en este trabajo.

En cuanto a las cepas correspondientes a los Mucorales no es un problema a considerar, ya que se ha reportado que no afectan de manera

considerable los cultivos de maíz, con la formación de toxinas; el riesgo es para el agricultor, puesto que si él posee un estado inmunológico deficiente, por inhalación de las esporas producidas se origina severos cuadros clínicos fulminantes (Bonifaz A., 1995).

Cada una de los géneros aislados presentaron una especie con mayor incidencia, tal fue el caso de *Fusarium sp.*, del cual, la de mayor frecuencia fue *F. moniliforme*, en ambos tipos de tratamiento, y seguido de *F. oxysporum*. Ambas cepas se relacionaron con la producción de fumonisinas presentes en diversas variedades de maíz y otros productos vegetales (Jiménez M., 1996). Además, se ha reportado que se pueden encontrar tanto aflatoxinas como fumonisinas en un mismo tipo de muestra (Siame B. A., 1998). En cambio, en el género *Aspergillus* se identificaron en su mayoría cepas correspondientes al grupo *Flavi*, dentro de los cuales destacó *A. terreus*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, cabe mencionar que la primera solo se ha asociado con la producción de toxinas como el ácido kójico, que aunque no se comprobaron sus dosis tóxicas, en algunos reportes es considerado como un compuesto de leve toxicidad (Bothast R. J., 1974; Goto T., 1996). Del género *Penicillium* se logró identificar cepas correspondientes a las especies *P. islandicum*, *P. lasenii* y *P. oxalicum*, que tienen la capacidad de sintetizar toxinas como la citrina y patulina. (Ramírez C., 1982). El resto de las cepas encontradas correspondieron a los géneros *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Nigrospora sp.* y *Helminotosporum sp.* Se ha

determinado que estas se encuentran distribuidas en el medio ambiente, y por tanto se aíslan con facilidad (Trenk H.L., 1970).

Actualmente no existe una metodología que nos indique como determinar con precisión el número de esporas por g de muestra, ya que en trabajo cuyos objetivo fue dar un número real, solo nos proporcionaban valores aproximados. Sin embargo, esto datos nos pudieran dar una idea sobre el grado de contaminación de un alimento, ya que lo relevante de los hongos productores de toxinas, es precisamente su capacidad para la síntesis de micotoxinas.

De acuerdo con esto, si granos o alimentos en su fase de precosecha están contaminados con cantidades elevadas de esporas, y si durante su almacenaje fueran mantenido en condiciones deficientes, y pueden aumentar el riesgo de la formación de metabolitos tóxicos (Sorenson W. G., 1996; Trenk H.L., 1970). Además actualmente no existe ninguna normativa mexicana que nos proporcione el número máximo permitido de hongos micotoxigénicos en alimentos, solamente existe para regular la cantidad de toxinas presentes. Otro factor importante a considerar es el transporte de esporas por medio de insectos que pueden dañar al maíz, ya que la distribución de los hongos puede darse por este mecanismo y lograr hasta cierto punto una homogeneidad en el número mas probable de esporas por g de muestra (Ashworth L. J., 1970; LaPrade J. C., 1976)

Existen otros factores abióticos que nos pueden ayudar a controlar la cantidad de aflatoxinas en ciertos cultivo, esto es, correcto manejo agronómico

de la tierra utilizada para el cultivo, ya sea labranza convencional o en conservación. Sin embargo, en este trabajo se determinó que existe una relación entre los procedimientos de cosecha del maíz con respecto al número de esporas presentes y sus toxinas. Esto nos pudiera dar una idea del comportamiento de los hongos, el cual es igual en ambos tipos de labranza (Rambo G. W., 1985).

Existen algunas estructuras de resistencia que juegan un papel importante en la patogenia del hongo y pueden influir en la propagación del mismo y como consecuencia dar origen a la producción de aflatoxinas. Debido a esto, se han realizado numerosos trabajos en donde se clasifican varios tipos de estructuras fúngicas que contribuyen a la infestación total de la planta (Orum T.V., 1997).

Los esclerocios, son una de estas estructuras que se han denominado L y S (Garber R. K., 1997). Se han realizado estudios sobre la distribución espacial de los hongos que originan tales estructuras en suelo destinado al cultivo de algodón. Los resultados obtenidos en estos trabajos son muy semejantes a lo encontrado por nosotros, sin embargo la labranza juega un papel importante. Nosotros encontramos que se encontraban en suelos que no se habían removido por varios períodos de tiempo (L. en conservación), lo que originó el acúmulo de ciertos hongos y por lo tanto, también de sus toxinas.

En suelos con labranza convencional encontramos que los esclerocios estuvieron distribuidos uniformemente, lo que nos indicó que debido al continuo

movimiento de la tierra se logró disgregar de forma homogénea, a los microorganismos presentes (Jones R. K., 1980).

Por otro lado, encontramos que la temperatura no afectó el porcentaje de viabilidad, por lo que no se observó cambios considerables entre la relación temperatura ambiente y sobrevivencia de esclerocios, debido a que estaba solo influenciado por el tipo de labranza y la profundidad a la que se tomó la muestra.

La determinación de las aflatoxinas mediante la técnica de HPLC, tuvo ciertas variaciones en cuanto a la cuantificación de las mismas, ya que el detector utilizado tenía una capacidad de resolución de AFG2:AFB2 (10:1). Esto quiere decir que se cuantificaron con mayor eficiencia las toxinas con subíndice 2 debido a que hay mayor límite de detección (Shimadzu Corp., 1998). Lo anterior probablemente se deba a que las aflatoxinas cuyo subíndice es 1, se sintetizan primeramente y después conforme al paso del tiempo, por medio de reacciones de oxidación, se convertirán en aflatoxinas con subíndice 2 (Ellis W. O., 1991).

Nosotros encontramos que en las muestras la concentración de las toxinas presentes en este estudio se vio afectada por el tipo de labranza, ya que se tuvieron amplios rangos de concentraciones.

Además, el tiempo en que se efectuaron los diferentes muestreos, también influyó en la presencia de estas micotoxinas, ya que al inicio de este trabajo no se tuvieron demasiadas muestras infestadas. Conforme al paso del

tiempo la concentración fue aumentando, ya que los hongos continuaron sintetizando las toxinas. Sin embargo, por efecto de las condiciones climatológicas, la cantidad de esporas que las originan, fueron menores aún cuando los niveles de aflatoxinas estuvieron elevados. Con todo y lo anterior, existieron marcadas diferencias entre los niveles de aflatoxinas presentes en el maíz.

De las cepas aisladas en todo el estudio, la mayoría de ellas fue *A. parasiticus* y se encontró en menor proporción *A. flavus*. Esto es de tomarse en consideración porque este último hongo solo produce la AFB, mientras que el primero da origen a AFB y AFG. Las cantidades que produjeron son relativamente pequeñas, pero pudiera aumentar su concentración y por tanto ser un riesgo para la población que consume productos elaborados de este maíz.

CONCLUSIONES.

- 1.- El tipo de labranza no influyó en la cantidad de esporas fúngicas de cualquier especie presente en el maíz, pero si afectó la presencia de hongos productores de micotoxinas.
- 2.- La temperatura no afectó el número de esclerocios y su viabilidad,
- 3.- La profundidad a la que fue tomada la muestra y el tipo de labranza influyó en el número y viabilidad de los esclerocios.
- 4.- La identificación de los esclerocios y la cuantificación de aflatoxinas nos permitió saber si es un factor importante en la propagación de esporas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- 5.- La concentración de la aflatoxinas esta influenciada por la práctica agronómica utilizada en la cosecha del maíz.
- 6.- *A. parasiticus* estuvo presente en mayor proporción que *A. flavus* en las muestras analizadas.

LITERATURA CITADA.

- Ahlgren G.H. 1971. Forage Crops. Ed. McGraw-Hill, México, pp. 290-295.
- Arenas R. 1992. Micología médica e ilustrada. Ed. Universitaria, Mc Graw-Hill, México, pp. 143-253.
- Ashworth L. J., R. E. Rice , J. L. Mcmeans and C. M. Brown. The relationship of insects to infection of cotton bolls by *Aspergillus flavus*. *Phytopathol.* **5**: 488-493.
- Barnett H.L. 1985. Illustrated genera of imperfect fungi. 3ª Ed. Parry D. Hunter, México, pp. 250-260.
- Barrios G. J., A. Mejía y A. Tomasini. 1992. Determinación de aflatoxinas en *Yucca sp.* por métodos cromatográficos. *Tecnología Alimentaria.*, **27** (1,2 y 3): 25-29.
- Bazúa D.C., R. Guerra and H. Sterner. 1979. Extruded corn flour as an alternative to lime-heated corn flour for tortilla preparation. *J. Food Sci.* **44**: 940-941.
- Bonifaz A. 1992. Micología médica. Ed. Cervantes. México, pp. 10-20.
- Booth C. 1977. Laboratory guide to the identification of the major species of *Fusarium*. Ed. Commonwealth Mycology Institute. England, pp. 3-58.
- Bothast R. J. and D. I. Fennell. 1974. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycol.* **66**: 365-369.

- Carman, A.S., Jr S S. Kuan, G.M. Ware, P.P. Umrigar, K.V. Miller and H. G. Guerrero. 1996. Robotics automated analysis of foods for aflatoxin. *J. AOAC Internac.* **79** (2): 456-464.
- Cotty P. J. 1987. Simple fluorescence method for rapid estimation of aflatoxins levels in a solid culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (6): 1254-1258.
- Cotty P.J., P. Bayman, D.S. Egel and K.S. Elias. 1994. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. The genus *Aspergillus*, Ed. Heith A. Powell. E.U.A., pp. 1-25.
- Diener U.L. and N.D. Davis. 1987. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Rev. CIMMYT México.* 31-40.
- Diener V.L., R.L. Cole, T.H Sanders, G.A. Payne, L.S. Lee and M.A. Klich. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**: 249-270.
- DiProssimo V.P. and E.G. Malek. 1996. Comparison of three methods for determining aflatoxins in melon seeds. *J. AOAC Internac.* **79** (6): 1330-1334.
- Dorner J. W., R. J. Cole and P. D. Blankenship. 1992. use of a biocompetitive agent to control pre harvest aflatoxin in drought stress peanuts. *J. Food Protect.* **55** (11): 888-892.
- Duvick J.P., T. Rood, A. G. Rao and D. R. Marshak. 1992. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* **267** (26): 18814-18820.

- Ellis W. O., J. P. Smith and B.k. Simpson. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. *Rev. Food Sci. Nutrit.* **30** (3): 403-439.
- Ellis W. O., J. P. Smith, B. K. Simpson, S. Khanazadeh and J. H. Oldhan. 1993. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Food Microbial.* **10**: 9-12.
- Ellis W. O., J. P. Smith, B. K. Simpson, H. Ramaswamy and G. Doyon. 1994. Growth an aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts stored under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Int. J. Food Microbial.* **22**: 173-187.
- Ellis W. O., J. P. Smith, B. K. Simps and H. Ramaswamy. 1994. Effect of gas barrier characteristics of films on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts packaged under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Food Res. Inter.* **27**: 505-512.
- El-Maraghy S.S.M. 1996. Fungal flora and aflatoxin contamination of feedstuff samples in Beida Governorate, Libya. *Folia Microbiol.* **41** (1): 53-60.
- Garber R. K. and P. J. Cotty. 1997. Formation of sclerotia and aflatoxins in developing cotton bolls infected by the S strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an atoxigenic strain. *Phytopath.* **87** (9): 939-945.
- Goodrich T. M., N. E. Mohaney and S. B. Rodríguez. 1995. The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Food Microbial.* **141**: 2831-2837.

- Goto T., D.T. Wicklow and Yoko Ito. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a *Aspergillus tamarii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 36-4038.
- Gou B. Z., J.S. Russin, T.E. Clevelan, R.L. Brown and K.E. Damann. 1996. Evidences por cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Am. Phytopathol. Soc.* **86**: 824-829.
- Guo B. Z., R. L. Brown., A.R. Lax., T.E. Clevelan, J.S. Russin and N.W. Widstrom. 1998. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptibles to *Aspergillus favus*. *J. Food Protec.* **61** (1): 98-103.
- Gou B. Z., J.S. Russin, R.L. Brown, T.E. Clevelan, and N.W. Widstrom. 1995. Resistance to aflatoxin contamination in corn as influenced by relative humidity and kernel germination. *J. Food Protec.* **59** (3): 276-281.
- Gourama H. and L. B. Bullerman. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J. Food Protec.* **58** (11): 1249-156.
- Gourama H. and L. B. Bullerman. 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudopantarum*. *Inter. J. Food Microbial.* **34**: 131-143.
- Guzman D., L.Trudel, and G.N. Wogan. 1995. Corn "Nixtamalización" and the fate of radiolabeled aflatoxin B₁ in the tortilla making process. *Environ. Contam. Toxicol.* **55**: 858-864.
- Hassan G. and B. Bullerman. 1996. Detection of molds in food and feeds: potential rapid and selective methods. *J. Food Protec.* **58** (12): 1389-1394.

- Hughes T., and E.R. Henson. 1970. Crop production. Ed. The Mcmillan Company. E.U.A., pp. 69-110.
- Hussein A. M., N. F. Sommer and R. J. Fortlage. 1986. Suppression of *Aspergillus flavus* in raisins by solar heating during sun drying. *Phytopatol.* **76** (3): 335-339.
- Illescas R., 1995. La teoría química de la formación del nixtamal. *Rev. de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.* **IV**, (3-4): 129-133.
- Jiménez M., T. Huerta and R. mateo. 1996. Mycotoxin productios by *Fusarium* species isoleted from bananas. *Appl. Envirom. Microbial.* **63** (2): 364-369.
- Jones R.K. 1986. The influence of cultural practices on minimizing the development of aflatoxin in field maize. *Aflatoxin in maize. CIMMYT UNDP and USAID.* **2**: 139-142.
- Jones R. K., H. E. Duncn and P. B. Hamilton. 1980. Plating date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. *Phytopathol.* **71** (8):810-816.
- Jones E. T., M. J. Wineland, J. T. Parsons and W. M. Hagler Jr. 1996. Degradation of aflatoxin by poultry litter. *Poult. Sci.* **75**: 52-58.
- Kaverri S.V., J. M. Fremy, C. Lapeure and A. D. Strosberg. 1987. Inmunodetection and immunopurification of aflatoxins using a high affinity monoclonal antibody to aflatoxin B1. *Lett. Applied Microbial.* **4**: 71-75.
- Kirmuzagül S. and H. Anul. 1996. Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoid glycosides. *Plant. Med.* **4**: 50-62.

- Kpodo K., Sorensen, A. K., and Jokobsen, M., 1996., The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. *Food Chem.*, **56** (2): 147-153.
- Kuiper-Goodman T. 1995. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol. Lett.* **3**: 853-859.
- Kusumoto K. and D.P.H. Hsieh. 1996. Purification and characterization of the esterases involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *J. Microbial.* **42**: 804-810.
- LaPrade J. C. and A. Manwiller. 1976. Relation of insect damage. Vector and hybrid reaction to aflatoxin B1 recovery from field corn. *Phytopathol.* **4**: 544-549.
- Line J. E. and R. E. Brackett. 1995. Role of toxin concentration and second carbon source in microbial transformation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum*. *J. Food Protec.* **58** (9): 1042-1044.
- López M. A., S. M. Alzamora and A. Argai. 1997. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *A. parasiticus* growth. *Food Microbial.* **14**: 117-124.
- López M. R., F. Martínez, R. Castañón y L.J. Tovar. 1995. Técnicas empleadas en el laboratorio de micología. Ed. Trillas. México, pp. 5-20.
- Machorro V.L. y L.A. Valdivia. 1992. Cambios cuantitativos en las aflatoxinas durante el procesos de la nixtamalización y elaboración de la tortilla. *Tec. Alimen.* **24**: 120-128.

- Marsh S. F. and G. A. Payne. 1985. Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathol.* **74** (11): 1284-1289.
- McGee D. C., O.M. Olanya and G.H. Hoyos. 1996. Populations of *Aspergillus flavus* in the Iowa cornfield ecosystem in years not favorable for aflatoxin contamination of corn grain. *American Phytopathol Soc.* **80** (7): 742-746.
- McMillian W.W. 1986. Relation of insects to aflatoxin contamination in maize grown in the southeastern USA. *aflatoxins in maize. CIMMYT, UNDP and USAID.* **2**: 194-199.
- Munimbazi C., J. Daxena, Wei-Yun J. Tsai and L.B. Bullerman. 1997. Inhibition of production of cyclopiazonic acid and ochratoxin A by fungicide iprodione. *J. Food Protect.* **60** (7): 849-852.
- Nesheim S. and G.E. Wood. 1995. Regulatory aspects of mycotoxins in soybean and soybean products. *J. AOCS.* **72** (12): 1421-1423.
- Neucere J.N., R.L. Brown and T.E. Cleveland, 1995. Correlation of antifungal properties and β -1,3-Glucanases in aqueous extracts of kernels from several varieties of corn. *J. Agricultur. Food Chem.* **43** (2): 275-276.
- Ochoa M. A., Ch. Torres, P.I. Moreno, G.G. Yepiz, S.Ch. Alvarez, L. Marroquín y G.M. Silverira. 1989. Incidencia d aflatoxinas B1 y zeralenona en trigo y maíz almacenado en el Estado de Sonora. *Ciencia de los Alimentos.* **1** 1: 19-23
- Orum T. V., D. M. Bigelow, M. R. Nelson, D. R. Howell and P. J. Cotty. 1997. Spatial an temporal pattern of *Aspergillus flavus* strain composition an

-
- propagule density in Yuma country Arizona soils. *Plant. Diseases.* **81**: 911-916.
- Payne G.A., 1985. Reduction of aflatoxin levels in maize due to irrigation and tillage. *Phytopathol.* **75**: 1283-1286.
- Payne G. A., 1986. Reduction of aflatoxin contamination in corn by irrigation and tillage. *Phytopathol.* **76**: 679-684.
- Payne G.A. 1992. Aflatoxin in maize. *Cri. Rev Plant. Sci.* **10** (5): 423-440.
- Quintero R.R. 1990. Ingeniería bioquímica "teoría y aplicaciones". Ed. Alhambra Universidad. 2a. Edición. México, pp. 20-22.
- Rambo G. W., J. Tuite and P. crane. 1974. Preharvest inoculation and infection of dent corn ears with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Phytopathol.* **64**: 797-800.
- Ramirez C. 1982. Manual and atlas of the Penicillia. Elsevier Biom. USA, pp 27-627.
- Rappel T.H. and D. Fenell. 1974. The genus *Aspergillus*. Cambridge Press. R. U. pp. 15-20, 50-70.
- Rief K. and W. Metzger. 1995. Determination of aflatoxin in medicinal herbs and plant extracts. *J. Chromatog.* **692**: 131-136.
- Rippon J.W. 1990. Tratado de micología. Ed. Interamericana, Mc Graw Hill, México, pp. 600-700.
- Roch O.G., G. Blunden, D.J. Haid, R.D. Coker and C. Gay. 1995. Determination of aflatoxins in groundnut meal by high-performance liquid chromatography: a

-
- comparison of two methods of derivatisation of aflatoxin B1. *British J. Biom. Sci.* **52**: 312-316.
- Siame. B. A., S. F. Mpuchane, B. A. Gashe, J. Allotey and G. Teffera. 1998. Occurrence of aflatoxins fumonisin B1 and zearalenone in foods and feed in Botswana. *J. Food. Protec.* **61** (12): 1670-1673.
- Sisson P.F. 1986. The effect of climatic conditions on the incidence and severity of aflatoxin in the USA. *Aflatoxin in maize. CIMMYT, UNDP and USAID.* **2**: 173-175.
- Schatzki T.F., 1996, Distribution of aflatoxin in almonds. *J. Agricul. Food Chem.* **44**: 3595-3597.
- Shimadzu Corporation. 1998. Analisis of aflatoxins by High performace liquid chromatography. México, pp. 991-20.
- Scott P.M. and B.P.C. Kennedy. 1973. Analysis and survey of ground black, white and *Capsicum peppers* for aflatoxins. *J. AOAC Inter.* **56** (6): 1452-1457.
- Scott M. P. 1995. Natural toxins. *J. AOAC Inter.* **49**: (1) 24-25.
- Screegel G. 1991. *Microbiología General*. Ed. Cambridge University Press. R.U. pp. 250-252.
- Selim M., W. Pependorf, M.S. Ibrahim, S. El-Sharkawy and S. El-Kashory. 1996. Aflatoxin B1 in common Egyptian foods. *J. AOAC Inter.* **76** (5): 1124-1129.
- Shiem Mei-Tsu, R.L. Brown, M.P. Whitehead, J.W. Cary, P.J. Cotty, T.E. Cleveland and R. A. Dean. 1997. Molecular genetics evidence for the involvement of a specific polygalacturonasa, P2c, in the invasion and spread

-
- of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Apple. Environ. Microbial.* **3** (9): 3548-3552.
- Shubha P. K., J. W. Cary, D. Bhanthnagar and J. W. Bennett. 1996. Characterization of experimentally induces, nonaflatoxigenics variant or *Aspergillus parasiticus*. *Apple. Envir. Microbiol.* **50**: 3399-3404.
- Smith G. 1992. Introducción a la micología industrial. Ed. Acriba, México, pp. 70-85.
- *Songa W., and R. J. Hillocks. 1996 High levels of *Penicillium spp.* and *Aspergillus spp.* in soil associated with reducen *Fusarium* wilt in pigeonpea. First international *Fusarium* biocontrol workshop. october 28-31 1996 Beltsville MD.
- Sorenson W. G., C.W. Hesseltine and O. L. Shotwell. 1966 Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol.* **20**: 49-55.
- Taylor J.W. 1995. Molecular Phylogenetic Classification of Fungi. *Arch. Med. Res.* **26** (3): 307-314.
- Trenk, H.L. and P. A. Hartman. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Appl. Microbiol.* **19** (5): 781-784.
- Trueckess M.W. and G.E. Wood. 1994. The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary and agricultural significance. Ed. Goodman Academics Press. E.U.A. pp. 409-426.

- Tsai Wei-Yun J., J.D. Lambert and L. B. Bullerman. 1984. Simplified method for microscale production and quantification of aflatoxin in broth. *J. Food Protec.* **47** (7): 526-529.
- Ulloa S. M. and H.W: Schroeder. 1969. Note on aflatoxin decomposition in the process of making tortilla from corn. *J. Food Protec.* **46**: 397-400
- Vasanthi S., R.V. Bhat. 1997. Aflatoxin intake from maize-based diets in a rural population in southern India. *J. Sci. Food Agric.* **73**: 226-230.
- Wheeler M. H. and D. Bhatnagar. 1995. inhibition of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* with pentachlorobenzyl alcohol, phthalide and pyroquilon. *Pest. Biochem. and Phys.* **52**: 109-115.
- Whitaker T., W. Horwitz, R. Alcertt and S. Neshem. 1996. Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. *J. AOAC Inter.* **79** (2): 476-485.
- Wicklow D.T., B. W. Horn., Shhotwell, O. L. , Hesseline, C. W. and Cadwell R. W. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection an aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathol.* **78** (1): 68-73.
- Wicklow D.T., D.M. Wilson and T.C. Nelsen. 1993. Survival of *Aspergillus flavus* sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia. *Phytopathol.* **83**: 1141-1144.
- Zeringue H. J., R. L. Brown, J. N. Neucere and T. E. Cleveland. 1996. Relationships between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and

resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production.

Agric. Food Chem. **44**: 403-407.



