



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE MAÍCES
RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A
CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÍCOLA

P R E S E N T A :

ANDREA SUSANA CRUZ MORALES

ASESOR: DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la FES Cuatlitlán quienes me recibieron y albergaron como una segunda casa y me proporcionándome una de las herramientas más importantes a que todo ser humano debe aspirar: el conocimiento.

A la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS), de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por el apoyo logístico para la realización de la tesis, en cuanto a tecnologías adecuadas e infraestructura experimental.

En especial al Dr. Ernesto Moreno Martínez por la dirección de este trabajo, su apoyo y todas las facilidades para la realización del mismo.

Al M.C. Marco Antonio García Perea por la atinada orientación para que esta investigación fuera realizada, el aporte de sus conocimientos y su apoyo en la realización de la tesis.

A las Maestras en Ciencias Josefina Moreno Lara, Ma. Cristina Pérez Reyes y Gabriela Sánchez Hernández por su apoyo en las técnicas de laboratorio.

A los integrantes del jurado por sus valiosas opiniones y sugerencias para mejorar el presente trabajo el Dr. Alejandro Espinosa Calderón, la M.C. Yazmín Cuervo Usan, la M.C. Margarita Tadeo Robledo y el M.C. Arturo Leodegario Ortiz Cornejo.

Al CONACYT, por el apoyo recibido a través del proyecto 43544 "Determinación de mecanismos hereditarios y moleculares en la pérdida de vigor, longevidad y contaminación por aflatoxinas en maíz, bajo la responsabilidad del Dr. Ernesto Moreno Martínez.

DEDICATORIAS

† A la memoria de mi padre y a mi Madre

Ejemplo de trabajo, honestidad y sencillez. Por darme la vida, una formación y hacer de mi lo que hasta ahora soy. Por sus sacrificios, su apoyo espiritual, moral, y económico incondicional, para lograr este éxito. Con admiración, cariño y respeto: Mi humilde dedicatoria a esa impagable acción.

A mis hermanos: Cynthia, Israel e Isaac

Por su apoyo brindado que sin deberla ni temerla le entraron a mi sostenimiento y formación académica. Por todos los logros que hemos compartido juntos.

A toda mi familia

Por el apoyo, confianza que me han brindado en os momentos difíciles.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez

Gracias por sus enseñanzas, tiempo y confianza que me ha otorgado incondicionalmente.

A mis todos mis amigos quienes de manera sincera comparten con migo la satisfacción de un objetivo cumplido.

*Con respeto y cariño a todos los que
hicieron posible alcanzar esta meta.*

ÍNDICE

	Índice de Cuadros	iv
	Índice de Figuras	iv
	RESUMEN	v
I	INTRODUCCIÓN	1
II	OBJETIVOS	4
III	HIPÓTESIS	4
IV	REVISIÓN DE BIBLIOGRAFICA	5
4.1.	Maíz	5
4.1.1.	Antecedentes	5
4.1.2.	Importancia mundial	5
4.1.3.	Importancia del maíz en México	7
4.1.4.	Composición química del maíz	8
4.2.	Semilla	9
4.2.1.	Calidad de semillas	10
4.3.	Componentes de calidad de la semilla	10
4.3.1.	Componente genético	10
4.3.2.	Componente físico	11
4.3.2.1	La humedad y los hongos de almacén	12
4.3.3.	Componente sanitario	12
4.3.4.	Componente fisiológico	13
4.4.	Características biológicas	13
4.4.1.	Viabilidad	13
4.4.2.	Germinación	13
4.4.2.1.	Etapas de la germinación	14
4.4.2.2.	Pruebas de germinación	15
4.4.3.	Vigor	16
4.4.3.1.	Importancia del vigor	18
4.4.3.2.	Pruebas de vigor	18
4.4.4	Longevidad	24

4.4.5.	Potencial de almacenamiento	25
4.5.	Los hongos	26
4. 5.1.	Hongos de campo	26
4. 5.2.	Hongos de almacén	27
4. 5.2.1.	Condiciones que favorecen el desarrollo de hongos de almacén	28
4. 5.3.	Daños ocasionados por hongos de almacén a los granos y semillas .	29
4. 5.4.	Toxinas de hongos de almacén	30
4.6.	Biología del género <i>Aspergillus</i>	30
4. 6.1.	Ciclo biológico de <i>Aspergillus flavus</i>	32
4. 6.2.	Infección de <i>A. flavus</i> en maíz	33
4.7.	Micotoxinas	34
4.7.1.	Factores para el desarrollo de hongos y producción de micotoxinas .	35
4.7.2.	Toxicidad de las micotoxinas	35
4.7.2.1.	Micotoxicosis	36
4.8.	Aflatoxinas	36
4.8.1.	Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas	37
4.8.2.	Efectos tóxicos de las aflatoxinas	39
4.8.3.	Producción de aflatoxinas	41
4.8.4.	Condiciones favorables para el desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> y la producción de aflatoxinas	42
4.8.5.	Control de aflatoxinas	46
V	MATERIALES Y METODOS	50
	Diagrama de flujo de la metodología	50
5.1.	Lugar de experimentación	51
5.2.	Material biológico	51
5.3.	Diseño experimental	52
5.4.	Experimentación	53
5.4.1.	Porcentaje de humedad inicial en maíz (CH)	53
5.4.2.	Determinación de Micobiota	54
5.4.3.	Análisis de aflatoxinas	55
5.4.4.	Germinación	57

5.4.5.	Vigor	58
5.4.5.1.	Vigor por longitud de plúmula	58
5.4.5.2.	Vigor por envejecimiento acelerado	60
5.4.5.3.	Vigor por medición de la conductividad eléctrica	60
5.4.6.	Longevidad	61
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
6.1.	Aflatoxinas	62
6.2.	Micobiota	65
6.3.	Germinación	67
6.4.	Vigor	68
6.4.1.	Vigor mediante la prueba de Longitud de Plúmula	69
6.4.2.	Vigor mediante la prueba de Envejecimiento Acelerado EA	70
6.4.3.	Vigor mediante la prueba de Conductividad Eléctrica	71
6.5.	Longevidad	73
VII	CONCLUSIONES	76
VIII	BIBLIOGRAFÍA	77

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Principales estados productores de maíz en México 2006 .	7
Cuadro 2	Composición promedio de un grano de maíz <i>Zea mays</i> L. var. Indentata	9
Cuadro 3	Características distintivas entre <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>	32
Cuadro 4	Principales especies productoras de micotoxinas	35
Cuadro 5	Principales propiedades físico-químicas de las aflatoxinas	38
Cuadro 6	Identificación de genotipos de maíz	51
Cuadro 7	Comparación de medias de dos pruebas de aflatoxinas en maíces (ppb)... ..	64
Cuadro 8	Comparación de medias de maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas en análisis de microbiota, germinación, vigor, y longevidad	65

Índice de Figuras

Figura 1	Estructuras morfológicas del hongo <i>Aspergillus</i>	31
Figura 2	Estructura molecular de las aflatoxinas	39
Figura 3	Correlación lineal de 2 pruebas de aflatoxinas en genotipos de maíz	63
Figura 4	Porcentaje de colonias de hongos desarrolladas en placas de MSA y PDA de los 13 materiales de maíz	66
Figura 5	Porcentaje de germinación en 13 genotipos de maíz	68
Figura 6	Longitud media de plúmula (cm) 13 genotipos de maíz	69
Figura 7	Porcentaje de germinación de 13 genotipos de maíz sometidos a Envejecimiento Acelerado	70
Figura 8.	Conductividad Eléctrica(μ S/cm)) de 13 genotipos de maíz	72
Figura 9	Porcentaje de germinación de 13 genotipos de maíz sometidos a prueba de Deterioro Controlado	74

RESUMEN

El cultivo de maíz en México es muy importante, tanto por la superficie que se siembra como por ser parte de la dieta básica del mexicano. Este puede ser invadido por diversos microorganismos durante su desarrollo en campo, su transporte y almacenamiento. Las enfermedades inducidas por hongos son frecuentes y ocasionan pérdidas económicas al reducir el potencial de producción. El maíz es susceptible a contaminación por aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*; que produce metabolitos secundarios los cuales son potencialmente tóxicos, cancerígenos y mutagénicos poniendo en riesgo la salud del hombre y los animales. Así mismo la calidad de la semilla puede verse afectada por el crecimiento de este hongo capaz de producir aflatoxinas.

El presente trabajo esta enfocado a obtener información sobre algunas características biológicas de maíces que presentan resistencia y susceptibilidad a contaminación con aflatoxinas en el almacén, para saber si esta contaminación tiene algún tipo de relación con el deterioro de la calidad de la semilla durante el periodo de almacenamiento.

La investigación se realizó en la UNIGRAS de la FES Cuautitlán, UNAM, se utilizaron 44 genotipos de maíz de diferentes regiones del país del banco de germoplasma del INIFAP Celaya, Guanajuato, del ciclo agrícola 2004-2005. Estos fueron inoculados con la cepa UNIGRAS 25 de *A. flavus* altamente productora de aflatoxinas en el 2006, incubándose durante 14 días a 27° C para posteriormente realizar la cuantificación de las mismas por el método 991.31 de la AOAC (1995) utilizando el método Aflatest de VICAM (Cobielles 2007).

De esta prueba se eligieron 13 materiales, 4 resistentes y 9 susceptibles. Para corroborar la selección, los materiales fueron incrementados en el ciclo 2005-2006, posteriormente fueron nuevamente inoculados con *A. flavus* y repetida la prueba de aflatoxinas. Por medio de regresión lineal se confirmó la resistencia y susceptibilidad de estos materiales con $r=0.85$.

Se realizó la caracterización biológica de los materiales seleccionados considerando parámetros relacionados con pruebas de germinación, vigor (longitud de plúmula, envejecimiento acelerado y conductividad eléctrica), longevidad y determinación de micobiota, de acuerdo a las reglas de la ISTA mencionadas por Moreno, (1996). Los análisis de varianza arrojaron diferencias altamente significativas en todas las variables evaluadas. Así mismo, para determinar si existió relación entre las variables evaluadas con respecto a la producción de aflatoxinas se realizó regresión lineal, no encontrando relación en ninguna variable.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que los maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas no presentaron diferencias biológicas significativas entre ellas cuando son sometidos a las mismas condiciones de manejo. Y que no existe relación alguna entre el vigor y la resistencia y/o susceptibilidad a contaminación por aflatoxinas en maíz, considerando que algunas causas de la variabilidad del vigor de las semillas pueden ser el genotipo, el medio ambiente y la nutrición de la planta, así como el estado de madurez en el momento de la cosecha, el tamaño, el peso y el peso volumétrico, el daño físico y el deterioro, entre otros.

I INTRODUCCIÓN

El maíz se ha utilizado desde épocas remotas. Es de gran importancia económica a nivel mundial, ya sea como alimento humano, para ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial de producción con 20.5 millones de toneladas (FAOSTAT,2007) de las cuales alrededor del 61 % se destinan al consumo humano, el 20 % es demandado por el sector pecuario, el 13 % se canaliza para la industria y el resto representan las mermas y la semilla para la siembra (SAGARPA, 2002). A diferencia de los otros cereales, se puede cultivar en casi todos los climas, las altitudes y los suelos. Se almacena con facilidad y se conserva por largo tiempo; se prepara con sencillez y no requiere de equipos complejos para consumirse. En México este cereal es de gran importancia porque es la materia prima de la tortilla que es uno de los alimentos que más se consumen en el país, así mismo como base para la elaboración de alimento de animales; siendo este el principal cultivo en México.

El cultivo de maíz es invadido por diversos microorganismos durante su desarrollo en el campo, su transporte y almacenamiento. A consecuencia de la invasión de hongos la FAO, 2003 estima que cada año el 25 % de las cosechas mundiales están afectadas por micotoxinas. Las enfermedades inducidas por hongos son frecuentes y ocasionan pérdidas económicas al reducir el potencial de producción. El estudio de los hongos y las micotoxinas es importante, no solo desde el punto de vista científico, sino desde la perspectiva económica, ya que son muchos los problemas que originan, desde el productor hasta el consumidor final. Por ejemplo, la disminución en rendimiento de las cosechas, enfermedades en los animales de granja, contaminación de los alimentos, pérdidas de características organolépticas y nutricionales, costos derivados de la prevención o el descontaminante etc.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos que son metabolizados por hongos, principalmente especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, y son capaces de desencadenar diversas alteraciones como enfermedades en los

seres humanos y en los animales que consumen alimentos contaminados por estos hongos, como los cereales, leche o frutos secos. México posee características climáticas que favorecen la presencia y el crecimiento de los hongos productores de micotoxinas.

La contaminación con micotoxinas en los granos generalmente es un proceso aditivo; puede iniciarse en el campo, aumentar durante la cosecha y las operaciones de secado, y continuar acumulándose durante el almacenamiento. La presencia de micotoxinas en granos y semillas es muy variable. El tipo o estructura química de estas depende del desarrollo de cepas fúngicas específicas sujetas a la influencia de factores ambientales como humedad del sustrato y temperatura ambiente, así como de métodos de procesamiento o producción, almacenamiento y tipo de sustrato; por consiguiente existen maíces que pueden ser susceptibles a la contaminación con micotoxinas.

El hongo *Aspergillus flavus* Link. produce un metabolito secundario llamado aflatoxina, que se considera potencialmente mutagénico, hepatotóxico y hepatocancerígeno que pone en riesgo la salud del hombre y de los animales. Aunque la presencia de este hongo no es indicativo de que se produzcan aflatoxinas en el alimento.

La contaminación por aflatoxinas esta asociada con el almacenamiento inadecuado del maíz, así como la contaminación del producto en el campo. La contaminación esta influida por el número de esporas que este contenga, las poblaciones de insectos y ácaros así como el daño mecánico que el maíz recibe dentro de las operaciones de la cosecha. Para su producción, las aflatoxinas necesitan de condiciones favorables que les permitan producirse, como son la temperatura, el pH, la actividad del agua, etc. Si el hongo no tiene estos factores es posible que la micotoxina no se pueda producir. Las aflatoxinas se producen en ambientes tropicales y sub-tropicales ya que son ambientes con una humedad relativa alta (85%) y una temperatura que oscila entre los 20 y 35° C.

Por lo antes mencionado es importante tener en cuenta las condiciones adecuadas durante el almacenamiento de las semillas y granos de maíz para así evitar las condiciones que permiten la producción de aflatoxinas, ya que estas pueden afectar la salud humana y también del ganado que la consume. Para esto se necesita obtener variedades resistentes para evitar el desarrollo de *Aspergillus flavus* y la subsecuente producción de aflatoxinas.

El presente trabajo esta enfocado a obtener información sobre algunas características biológicas de maíces que presentan resistencia y susceptibilidad a contaminación con aflatoxinas en el almacén. Para saber si esta contaminación tiene algún tipo de relación con el deterioro de la calidad de la semilla durante el periodo de almacenamiento.

II OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general

Evaluar las características biológicas de diferentes genotipos de maíz resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas.

2.2 Objetivos particulares

- a) Analizar la microbiota presente en genotipos de maíz resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas.
- b) Seleccionar maíces resistentes y susceptibles a la contaminación por aflatoxinas.
- c) Determinar la calidad fisiológica de maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas.
- d) Encontrar la relación entre maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas y maíces con alto y bajo vigor.

III HIPÓTESIS

- ✓ Los maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas presentan diferencias biológicas significativas entre ellas cuando son sometidos a las mismas condiciones de manejo.
- ✓ Genotipos de maíz resistentes a contaminación por aflatoxinas presentan alto vigor y los maíces susceptibles tienen bajo vigor.

IV REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

4.1. Maíz

4.1.1. Antecedentes

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas, su nombre científico es *Zea mays*. El grano de maíz es la principal fuente de la alimentación humana en América; además es el cereal más importante después del trigo en los intercambios mundiales, aunque en su mayor proporción como alimento es destinado al ganado o materia prima para la obtención de almidón (Gutiérrez y Gumes, 1999). El maíz, a diferencia de los otros cereales, se puede cultivar en casi todos los climas, las altitudes y los suelos. Se cultiva relativamente rápido, desde tres hasta ocho meses, se almacena con facilidad y se conserva por largo tiempo; se prepara con sencillez y no requiere de equipos complejos para consumirse.

4.1.2. Importancia mundial

El maíz junto con el trigo y el arroz, es uno de los cereales económicamente más importantes del mundo, ya sea como alimento suministrando elementos nutritivos a los seres humanos, como alimento para el ganado y como materia prima en la industria de la transformación con la que se producen otros productos como el almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas y edulcorantes alimenticios. (FAO, 2003). Además este cereal constituye la base de la alimentación de los latinoamericanos (Hernández, 2003).

Globalmente, el maíz se cultiva en más de 140 millones de hectáreas (FAO, 2003) con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas. El maíz tropical se cultiva en 66 países y es de importancia económica en 61 de ellos, cada uno de los cuales siembra más de 50,000 has. con un total de cerca de 61.5 millones de has. y una producción anual de 111 millones de toneladas métricas. El rendimiento medio del maíz en los trópicos es de 1,800 kg/ha comparado con una media mundial de más de 4,000 kg/ha. El rendimiento medio del maíz en las zonas templadas es de 7,000 kg/ha (CIMMYT, 1995). Es previsible que la demanda de

maíz como alimento humano y animal crezca en las próximas décadas en los países en desarrollo a una tasa mayor que la del trigo o del arroz. Dado que se espera que el nivel de vida aumente, sobre todo en países asiáticos, la demanda de maíz como alimento para ganado también presentará una alta tasa de crecimiento. En este aspecto la FAO (2007) estima que la demanda de maíz para la alimentación animal aumentará de los 165 millones de toneladas actuales a casi 400 millones en el 2030, siendo este un aumento de 240 %.

La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo, se adapta ampliamente a diversas condiciones ecológicas y edáficas, por eso se cultiva en casi todo el mundo. Hoy día se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile. La mayor parte del maíz es cultivado a altitudes medias, pero se cultiva también por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3,800 metros sobre el nivel del mar en la cordillera de los Andes (FAO, 2003). El maíz es clasificado en dos tipos dependiendo de la latitud y del ambiente en el que se cultiva; el cultivado en los ambientes más cálidos, entre la línea ecuatorial y los 30° de latitud sur y los 30° de latitud norte es conocido como maíz tropical, mientras que aquel que se cultiva en climas más fríos, más allá de los 34° de latitud sur y norte es llamado maíz de zona templada; los maíces subtropicales crecen entre las latitudes de 30° y 34° de ambos hemisferios. Esta es una descripción muy general ya que los maíces tropicales y templados no obedecen a límites regionales o latitudinales rígidos. El maíz tropical a su vez, es clasificado en tres subclases, también basadas en el ambiente: de tierras bajas, de media altitud y de zonas altas (Paliwal, 2001). En los últimos 50 años se han modificado significativamente las prácticas de cultivo utilizadas en el maíz, sobre todo el uso de alta tecnología para incrementar los rendimientos por ha; la mecanización, el uso de variedades mejoradas y el uso intensivo de agroquímicos (Gutiérrez y Gumes, 1999).

Todos estos indicadores hacen que el maíz sea un cultivo que debe ser debidamente explotado a fin de alimentar a la creciente población mundial; mayores incrementos de producción de alimentos humanos y animales deben provenir de los cereales gruesos, incluyendo el maíz, los cuales tienen ventajas comparativas en ambientes desfavorables (Paliwal, 2001).

4.1.3. Importancia del maíz en México

El maíz ha sido y será muy probablemente el producto de mayor consumo en los hogares mexicanos por varias razones. Actualmente se producen alrededor de 19.3 millones de toneladas con un valor de 30.515 millones de pesos en una superficie de 6.8 millones de hectáreas, además de ocupar el cuarto lugar como productor a nivel mundial y es el cultivo que presenta un mayor número de productores, siendo 3.2 millones, en su mayoría ejidales (solo existen 4 millones de productores agrícolas en el país). Alrededor del 90 por ciento de la producción es de maíz blanco y se destina al consumo humano. Para el 2005 la cantidad de importación fue de 6.031 millones de toneladas mientras que se exportaron 0.4581 millones de toneladas (FAOSTAT, 2007). Por lo tanto es uno de los principales cultivos del país en función de la superficie total cosechada y de la producción de los principales cultivos anuales. En el Cuadro 1 se mencionan los principales estados de la republica productores de maíz:

Cuadro 1. Principales estados productores de maíz en México 2006.

Estados productores	Superficie cosechada (Has)	Producción (Ton)	Rendimiento Promedio (Ton/Ha)
Sinaloa	485,034.55	4,327,682.72	8.92
Jalisco	506,387.15	2,740,716.92	5.41
México	554,225.42	1,740,506.23	3.14
Michoacán	384,936.27	1,382,227.86	3.59
Chiapas	701,603.47	1,309,937.95	1.87
Total nacional	6,821,775.99	20,060,877.16	2.94

Fuente SAGARPA 2006.

México, con una población de aproximadamente 100 millones de habitantes, es el país que tiene el consumo per cápita de maíz más grande del mundo, en algunos grupos poblacionales llega a ser mayor a 120 kg/año y en algunas zonas rurales provee aproximadamente el 70 % de las calorías y el 50 % del consumo proteico

diario, ya que es un alimento de la cultura nacional y de la cual derivan un sinnúmero de alimentos consumidos por la población de manera cotidiana (Vega, Ramírez, 2006).

El maíz de grano blanco se utiliza principalmente para la elaboración de las tradicionales tortillas y tamales, (usando el proceso alcalino de cocimiento llamado nixtamalización), pero también se puede obtener harinas, aceite, frituras o utilizarse como materia prima en la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones entre otros, observándose que entre más bajo es el nivel socioeconómico existe una mayor dependencia. El maíz de grano amarillo también se puede utilizar para consumo humano en una amplia variedad de platillos, sin embargo, en la actualidad se tiene como destino el consumo pecuario en la alimentación del ganado y en la producción de almidones (Anguiano, 2003).

Debido a que la mayor parte del maíz producido en México está dedicado a la alimentación humana de manera directa y a que el maíz es producido en gran medida por sus propios consumidores es decir, los campesinos que lo cultivan en pequeñas parcelas, es de gran importancia conocer las enfermedades que al consumirlo conlleva (FAO, 2003). El maíz se ha convertido, no sólo en México sino en buena parte del mundo, en sustento permanente de múltiples grupos campesinos, en el alimento barato de millones de trabajadores asalariados urbanos y en materia prima estratégica de la ganadería mundial y la industria de alimentos. (Hispanista, 2004)

4.1.4. Composición química

El maíz tiene aproximadamente 10 % de proteína, 5 % de lípidos, 1.4 % de cenizas y 70 % de almidón (Cuadro 3). Este último componente es el que se encuentra en mayor proporción en el maíz y el que tal vez contribuya más en las propiedades funcionales de los productos que se elaboran con este cereal (Anguiano *et al.*, 2005).

Cuadro 2: Composición promedio del grano de maíz *Zea mays* L. var. Indentata.

Componentes	Porcentajes (%)
Humedad	12,0 - 13,0
Almidón	65,0 - 70,0
Azúcares	1,0 - 2,0
Proteína	10,0 - 11,0
Grasa	4,0 - 5,0
Fibra	2,0 - 2,5
Geniza	1,0 - 2,0

(Anguiano, *et al.*, 2005).

El pericarpio representa aproximadamente 5 % del peso total del grano de maíz pero contiene casi toda la fibra. El germen representa aproximadamente 13 % del peso de grano de maíz de producto básico, y aporta aproximadamente 85 % de los lípidos (grasas y aceites) y casi un cuarto de toda la proteína. El endospermo, que representa más del 80 % del peso total del grano consiste en su totalidad de almidón y proteína (Claridades Agropecuarias, 2005).

4.2. Semilla

Las semillas son importantes en varios aspectos; desde el punto de vista biológico, contienen los recursos genéticos recombinados necesarios para el ciclo completo de la planta a que dará origen y normalmente de ellas depende la sobrevivencia del germoplasma en condiciones desfavorables del crecimiento. Antropocéntricamente, las semillas son una fuente importante en la alimentación humana y animal; además, algunas tienen usos industriales en la producción de aceites, de fibra textil y en la fabricación de bebidas, así como para uso medicinal y en artesanías siendo el objetivo principal de la semillas generar una plántula que use eficientemente sus reservas nutricionales, durante su crecimiento inicial, y sea capaz de lograr su autosuficiencia en el menor tiempo posible (Manzo, 1982).

4.2.1. Calidad de semillas

Se define como un grado o padrón de excelencia, en ciertos atributos que pueden determinar el desempeño de la semilla en la siembra o en el almacén. En la práctica, la expresión “calidad de semillas” es utilizada libremente para reflejar el valor de la semilla para supuestos específicos; el desempeño de la semilla debe estar a la altura de las expectativas del consumidor (Manzo, 1982).

La calidad de semilla puede definirse como el nivel o grado de excelencia alcanzado por las semillas cuando son producidas y beneficiadas en forma óptima, el cual es asumido por las semillas solamente cuando son comparadas con un estándar aceptable. La semilla puede ser superior, buena, mediana o de pobre calidad. (Andrade, 1992). Mientras que Moreno (1996) indica que la calidad de la semilla esta determinada principalmente por la germinación y el establecimiento de las plantas en campo, estas dependen en gran medida del vigor de las semillas.

4.3. Componentes de calidad de la semilla

La calidad de la semilla esta determinada por los siguientes componentes: calidad genética, calidad de viabilidad y germinación, calidad sanitaria y calidad física; aunado a una buena calidad para el almacenamiento (Cabrera, 2003).

4.3.1. Componente genético

Se refiere a la variedad obtenida por el fitomejorador. La calidad genética es óptima, cuando se asegura pureza varietal de acuerdo con la semilla original, la máxima calidad genética, esta relacionada con la copia fiel de la variedad obtenida por el fitomejorador. La semilla debe ser genéticamente pura, manteniendo los atributos propios de la especie o cultivar como son productividad, adaptación, precocidad, calidad de grano, resistencia, etc.; características que serán mantenidas durante todas las fases de multiplicación (Sánchez, 2004). En el caso del maíz por ser una planta alógama, se hace difícil en la producción de semilla el control de la calidad genética, debido a que puede tener polinización cruzada a grandes distancias, ya que el polen es transportado por el viento (Ortiz, 1989 citado por Alva, 1999).

La constitución genética de las semillas va a determinar la respuesta del cultivo a las condiciones ambientales, a la aplicación de otros insumos y a las prácticas de cultivo; aunque el ambiente que rodea a la semilla durante todo su proceso de formación influye en su nivel de vigor; incluso se considera que el almacenamiento de la semilla puede llegar a ser un factor determinante en el deterioro de la calidad genética (Roos, 1980, citado por Vazquez, 2004).

Dentro de los factores que afectan la pureza genética se encuentran: origen de la semilla, las contaminaciones mecánicas, la estabilidad genética, los efectos de selección y las contaminaciones durante la polinización (Andrade, 1992).

4.3.2. Componente físico

Se refiere al nivel de excelencia con respecto a tamaño, forma, color, brillantez, densidad de la semilla, entre otras características. Se considera también el porcentaje de semilla pura, peso de la semilla. (Sánchez, 2004). Para llegar a una óptima calidad la semilla debe ser limpiada, clasificada por su forma y tamaño y evaluada en su pureza, determinando el porcentaje de malezas nocivas, semillas de otras variedades y otros cultivos, y material inerte (Moreno *et al*, 1988).

Uno de los aspectos importantes durante la cosecha es el contenido de humedad al que se debe iniciar la recolección de semilla con el objetivo de evitar al máximo el daño mecánico ya que este influye en el comportamiento de las semillas en las diferentes etapas de la producción hasta la comercialización; además de que todo el equipo que se utilice durante la recolección, deberá estar limpio para evitar las mezclas de semilla con otros lotes que se hayan cosechado con anterioridad. (Juarez, 1997). La gran relevancia de la humedad en el manejo de los granos y semillas radica en que ésta es el factor más importante en su conservación, ya que favorece el desarrollo de insectos y hongos y tienen efectos sobre los procesos fisiológicos de las semillas, de los que dependen su pérdida de vigor y viabilidad (Moreno *et al.*, 1988).

4.3.2.1. La humedad y los hongos de almacén

Los hongos de almacén son principalmente especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, La característica principal es su capacidad de crecer en productos almacenados en humedades relativas superiores a 68 % y con contenidos de humedad de las semillas relativamente bajos. En ciertas regiones, algunas especies como *A. flavus* inician su invasión en el campo antes de la cosecha. Uno de los efectos nocivos de estos hongos es la reducción del poder germinativo de las semillas. Así como la pérdida de la viabilidad de diferentes semillas (Moreno, 1996).

4.3.3. Componente sanitario

Se refiere al hecho de que la semilla se encuentra libre de microorganismos, que representa una seria dificultad para la producción de semilla de alta calidad y posteriormente puede limitar la capacidad productiva del grano, de la variedad o híbrido. La sanidad se refiere a la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades; hongos, bacterias, virus y plagas de animales (gusanos e insectos), pero también pueden estar involucradas condiciones fisiológicas, tales como deficiencias de microelementos (Moreno, 1996).

La semilla con calidad sanitaria debe estar libre de patógenos que puedan afectar a la propia semilla, y/o libre de enfermedades transmitidas por semilla que pueden afectar al propio cultivo y/o disemina un problema patológico (Andrade, 1992). Para conocer el componente genético de las semillas se realizan diferentes pruebas de sanidad cuyo principio es que se determina la presencia o ausencia de organismos enfermos, plagas y condiciones fisiológicas deletéreas; y se estima el número de semillas afectadas en la muestra del lote evaluado. La determinación puede estar influida por el tipo de tratamiento que se haya aplicado al lote de semillas.

Es importante esta determinación por que:

- ✓ El inóculo es portado por la semilla y puede dar lugar al desarrollo progresivo de enfermedades en el campo y reducir el valor comercial del cultivo.
- ✓ Los lotes de semilla importados pueden introducir enfermedades en nuevas regiones.

- ✓ Pueden elucidar la evaluación de las plántulas y las causas de una germinación deficiente o establecimiento en campo y por consiguiente suplementar las pruebas de germinación (Moreno, 1996).

4.3.4. Componente fisiológico

A la calidad biológica también se le conoce como componente fisiológico. Son aquellos atributos endógenos que dan a la semilla capacidad para germinar rápidamente y producir poblaciones uniformes de plantas productivas en una gran variación de condiciones ambientales. Esta integrado por características relacionadas con la calidad fisiológica para establecer nuevas plántulas y plantas sanas e individuos. Estas características que definen los aspectos biológicos son entre otros viabilidad, germinación y vigor. (Andrade, 1992).

4.4. Características biológicas

4.4.1. Viabilidad

La semilla viable es capaz de germinar bajo condiciones apropiadas. Una semilla no viable es aquella que sufrió un cambio degenerativo irreversible que normalmente representa su muerte. La viabilidad se la semilla es aquella característica que la hace capaz de germinar bajo condiciones favorables, considerando que no existía ningún tipo de dormancia antes de hacer una prueba de germinación (Roberts y Basu, citado por Alva, 1999). En una prueba de germinación estándar, la viabilidad es la totalidad de semillas que son capaces de germinar, independientemente de que las plántulas que crezcan sean normales o anormales (International Seed Testing Association, ISTA, 1996).

4.4.2. Germinación

La germinación de las semillas, como atributo de calidad, por mucho tiempo ha sido una característica biológica importante: como unidad de reproducción, se espera que produzcan plantas sanas y vigorosas en campo y, para ello, deben germinar.

Esta se define como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables (Moreno, 1996).

La germinación indica la capacidad de la semilla para convertirse en una plántula normal bajo condiciones favorables. Es el proceso de reinicio del crecimiento activo del embrión caracterizado por la ruptura de la cubierta seminal y la emergencia de la plántula (Santiago, 1988).

4.4.2.1. Etapas de la germinación

Los fisiólogos vegetales hablan de cuatro estadios:

1. La hidratación o imbibición, durante la cual el agua entra al embrión e hidrata proteínas y otros coloides.
2. La formación o activación de enzimas, que da lugar a un incremento en la actividad metabólica.
3. El alargamiento de las células de la radícula seguida por la protusión radicular de la testa de la semilla (la germinación propiamente dicha).
4. El subsecuente crecimiento de la plántula (Cabrera, 2003).

Mientras que Alva, (1999) menciona que el primer paso de la germinación es la imbibición de agua, que produce la hidratación inicial de la semillas, la cual depende del potencial hídrico de las células que la componen, en condiciones óptimas se forma un modelo de absorción de agua en tres fases: 1) Absorción rápida debida a las fuerzas de las paredes y contenidos celulares de la semilla, la cual se produce activando el metabolismo en las semillas viables; 2) Absorción lenta o nula, que ocurre por la igualdad de potenciales de la semilla y substrato, existiendo un metabolismo activo previo a la germinación en las semillas viables; y 3) Absorción rápida debida a la emergencia de la radícula y el crecimiento de la plántula, que se asocia a una gran actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas.

La imbibición desencadena una serie de actividades metabólicas como son la respiración, la síntesis de proteínas y la movilización de las reservas. Una semilla seca normalmente presenta una escasa actividad respiratoria, aumentando el consumo de oxígeno por la misma, después de iniciada la imbibición; a partir de este momento el proceso respiratorio de las semillas puede dividirse en cuatro fases: 1) Incremento rápido de la respiración: que se da antes de transcurridas 12 horas desde el inicio de la imbibición; el aumento de la actividad respiratoria es proporcional al incremento de la hidratación de los tejidos de la semilla, proceso ocasionado en parte a la activación de las enzimas de las rutas respiratorias debido a la entrada de agua a las células; la sacarosa es el principal substrato utilizado en esta fase; 2) Estabilización de la actividad respiratoria: entre las 12 y 24 horas desde el inicio de la imbibición, ocasionada por las cubiertas de las semillas, que todavía permanecen intactas en esta fase, limitando la entrada de oxígeno, produciendo cierto grado de respiración anaeróbica; 3) Un segundo incremento de la actividad respiratoria: asociada a la mayor disponibilidad de oxígeno, debido a la ruptura de la testa producida por la emergencia de la radícula; aunque este incremento puede deberse también a la actividad de las mitocondrias recientemente sintetizadas en las células en división del eje embrionario en desarrollo y 4) Disminución de la respiración, que coincide con la desintegración de los cotiledones, después de que han exportado sus reservas almacenadas (Bewley y Black, 1983 mencionado por Arias, 2005).

4.4.2.2. Pruebas de germinación

La prueba de germinación estándar se considera como la emergencia y desarrollo de la plántula, a un estado donde la apariencia de sus estructuras esenciales señalan si es apta para desarrollar con posterioridad en una planta satisfactoria bajo condiciones favorables del suelo, siendo entonces su objetivo principal proporcionar información sobre la calidad de las semillas para producir plantas normales (ISTA, 1999). Es el índice de calidad más conveniente y usado a nivel mundial, el objetivo de definir la germinación es obtener información con respecto al valor de las semillas con propósito agrícola y para comparar el valor de diferentes lotes (Moreno, 1996).

Aguilar (1989) menciona que la Prueba de Germinación Estándar (PGE) presenta limitantes en dar información exacta sobre el potencial de establecimiento de un lote de semillas debido a:

1. Como es realizada en laboratorio, bajo condiciones artificiales, estandarizadas, en medios esencialmente estériles y ambientes con humedad y temperaturas controladas; puede predecir bien la emergencia en el campo cuando las condiciones en él son cercanas al óptimo, lo que no ocurre en el campo.
2. No se toma en consideración el deterioro natural de la semilla ya que dependiendo del tiempo y las condiciones en que las semillas son almacenadas, su calidad puede disminuir.
3. Se considera como plántula normal aquella que presenta todas sus estructuras esenciales, sin que esta llegue a ser una razón que garantice una relación con rapidez de crecimiento.
4. Finalmente, esta prueba no mide la rapidez y uniformidad con que germinan las semillas.

Por estas razones se crearon las pruebas de vigor que son un índice de mayor sensibilidad acerca de las cualidades de las semillas. Así, cualquier evento que preceda a la pérdida de germinación puede servir como base para una prueba de vigor (García, 2007).

4.4.3. Vigor

Es la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determina el nivel de actividad y comportamiento de la semilla o lote de semillas, durante la germinación y emergencia de las plántulas. La diferencia en semillas con alto y bajo vigor se detectan solo en fases iniciales de crecimiento y bajo condiciones adversas, pero no hay suficientes evidencias de que el efecto se observe en rendimiento (Tadeo y Espinosa, 2004).

La ISTA (1996) define al vigor de la semilla como la suma total de aquellas propiedades que determinan el nivel de actividad y comportamiento de la semilla o del lote de semillas durante la germinación y emergencia de la plántula; mientras

que Moreno (1996), menciona que algunas causas de la variabilidad del vigor de las semillas son: genotipo, medio ambiente y nutrición de la planta, estado de madurez en el momento de la cosecha, tamaño, peso y peso volumétrico, daño físico, deterioro, envejecimiento y patógenos.

La (Association Official Seed Analysts, AOSA, 1983), define vigor como “conjunto de propiedades de las semillas que determinan el potencial para una rápida emergencia uniforme y desarrollo normal de plántulas bajo un amplio rango de condiciones de campo. Las que se comportan bien se llaman semillas de alto vigor y las que se comportan pobremente son denominadas semillas de bajo vigor”.

La definición engloba procesos relacionados con las diferencias en vigor (Cruz, 1993):

1. Procesos y reacciones bioquímicas durante la germinación tales como reacciones enzimáticas y actividades respiratorias.
2. Velocidad y uniformidad de la emergencia de la plántula en el campo
3. Capacidad de emergencia de las plántulas bajo condiciones desfavorables del medio ambiente.

Tres son los factores que caracterizan al vigor de las semillas: germinación rápida, velocidad de desarrollo después de la germinación, e integridad y normalidad de las plántulas que emergen de una semilla vigorosa. Dada la importancia que ha cobrado el vigor de las semillas sobre las PGE; se han realizado diversas investigaciones al respecto, para comprender la naturaleza genética y efectos en el establecimiento de las plántulas en campo, así como los efectos en el rendimiento y la longevidad de las semillas en almacén (García, 2007).

Evaluar el vigor de las semillas es de gran utilidad para predecir el comportamiento de un lote cuando las condiciones del medio ambiente no son del todo favorables para la germinación y emergencia de las plántulas (Moreno, 1996).

El vigor de las semillas se aprecia más fácilmente durante la emergencia, ya que en esta etapa de desarrollo es posible encontrar mayor diferencia entre genotipos con diferente vigor, incluso dentro de lotes de un mismo genotipo, lo que permite

seleccionar aquellos lotes que aseguren mayor emergencia, establecimiento del cultivo y capacidad competitiva bajo diversas condiciones de siembra (Copeland; citado por Villaseñor, 1984).

4.4.3.1. Importancia del vigor

El vigor permite predecir el comportamiento de un lote de semillas cuando las condiciones del ambiente no son del todo favorables para la germinación y emergencia. El vigor y la longevidad están muy relacionadas, una semilla vigorosa tiene mayor longevidad. (Tadeo y Espinosa, 2004).

4.4.3.2. Pruebas de vigor

Una prueba de vigor no es una prueba de respuesta per se, la respuesta en campo de un determinado lote de semillas puede estar más estrechamente correlacionado con las pruebas de vigor o con las pruebas ordinarias de laboratorio, dependiendo de la naturaleza de las condiciones de campo bajo las cuales se siembra. Así una prueba de vigor es entonces un estudio bajo condiciones ambientales específicas que proveen medios que detecten diferencias que no sean discernibles en una prueba de laboratorio ordinaria y que tenga como objetivo el de proveer resultados que sean reproducibles y que estén correlacionados con el comportamiento de las semillas en campo (Rodríguez, 2005). Las principales pruebas que se han hecho se han clasificado en dos tipos:

- a) Directas, en donde las condiciones de campo son simuladas en el laboratorio; y
- b) Las indirectas que determinan a nivel de laboratorio características bioquímicas, fisiológicas y químicas. (Perry y Camargo citado por Vázquez, 2004)

Villaseñor (1984) clasifica las pruebas para evaluación de vigor como:

i) Pruebas Indirectas.

En estas pruebas la evaluación de vigor se aplica directamente a la semilla antes de que se inicie la germinación. Entre estas pruebas de encuentra:

- ✓ Prueba de tetrazolio.
- ✓ Prueba de la tasa de respiración.
- ✓ Prueba de la actividad del ácido Glutámico descarboxilasa.
- ✓ Prueba de niveles de Adenosina trifosfato (ATP).
- ✓ Prueba de conductividad eléctrica.
- ✓ Pruebas de cambios de permeabilidad.

ii) **Pruebas Directas.**

Se efectúan una vez que la semilla ha germinado en condiciones favorables de germinación, en ocasiones estas pruebas pueden ser realizadas bajo condiciones de campo o laboratorio, entre las principales pruebas están:

- ✓ Prueba de ladrillo molido
- ✓ Prueba de frío (Cold Tesst): se realiza bajo condiciones de baja temperatura 7 días a 10° C, después de 5 a 6 días a 25° C, en suelos con patógenos de semilla.
- ✓ Prueba de crecimiento de plántula: Se mide el crecimiento de las plántulas.
- ✓ Prueba de velocidad de crecimiento del cogollo y peso seco de este.
- ✓ Prueba de velocidad de germinación: se efectúan conteos diarios del número de semillas germinadas, termina cuando se logra el máximo de germinación.
- ✓ Prueba del primer recuento de emergencia
- ✓ Prueba de envejecimiento acelerado: Predice la capacidad de almacenamiento de semillas (longevidad). Se coloca la semilla a altas temperaturas (40° C), así como humedad relativa, por 72 horas.

A continuación se describen algunas de las pruebas antes mencionadas:

a. **Primer conteo de la prueba de germinación estándar (PGE)**

El porcentaje de plántulas normales obtenido en el primer conteo de la PGE, informa sobre las semillas que rápidamente reanudan la actividad metabólica y crecimiento, propias de la germinación. Este porcentaje representa la rapidez de germinación de la semilla y puede ser usado como índice de vigor.

La PGE presenta las ventajas de ser rápida, económica, simple y de fácil interpretación. Sin embargo, existen pocos estudios que la avalen y la utilicen como prueba de vigor en los cultivos (Copeland y McDonald, 1995). El lote con mayor porcentaje de emergencia y mayor crecimiento será considerado el del mayor vigor (Hunter; citado por Villaseñor, 1984).

b. Prueba de envejecimiento acelerado (PEA)

El envejecimiento puede ser definido como un proceso que comprende una serie amplia de eventos degenerativos, ordenados y pasivos no regulados que se acumulan en el tiempo, ocasionados primeramente por factores ambientales. Estos procesos degenerativos no necesariamente causan la muerte, pero si pueden disminuir la resistencia al estrés e incrementar la posibilidad de muerte (Cruz, 1993). Esta prueba surgió bajo el supuesto de que los procesos de deterioro en la semilla sometida a condiciones de envejecimiento acelerado son similares a aquellos que ocurren en condiciones normales, variando únicamente la tasa de deterioro al incrementarse significativamente. La base de esta prueba es que los lotes de semilla que mantienen buena germinación durante el envejecimiento son buenos para el almacenamiento, mientras que aquellos que reducen substancialmente su germinación deficientes para el almacenamiento (Delouche y Baskin citado por Contreras, 2005).

De acuerdo con Taiz y Zeiger, (2002; citado por García, 2007) indican que en esta prueba, las semillas se someten a condiciones de temperatura alta y humedad relativa cercana a 100 %, por un período corto, antes de realizar con ellas una PGE. Estas condiciones aceleran el envejecimiento de las semillas y, por lo tanto, se espera que acentúe la diferencia entre lotes de semillas. Cuando las condiciones que rodean a la semilla son alta temperatura (superior a 35° C), normalmente se puede producir deshidratación y rupturas severas en las células cuando las semillas vuelven a ser hidratadas. Esto se debe a que las temperaturas altas disminuyen la fuerza de los puentes de hidrógeno, y de interacciones electroestáticas que existen entre proteínas y membrana celular; además, aumentan la fluidez de los lípidos que la constituyen y un cambio en la composición y estructura de la membrana, por lo que se provocan fugas de iones e inhibición de procesos fisiológicos como

fotosíntesis y respiración. Finalmente, el envejecimiento puede producir daño en la cromatina, lo que se traduce en un aumento en la aparición de malformaciones en plántulas.

Esta pérdida en la calidad interna de semillas se expresa en menor tasa de germinación, aumento en producción de plántulas anormales y, por lo tanto, pérdida en la uniformidad de los lotes. De acuerdo a esto, se espera que lotes de semillas vigorosas sean capaces de resistir el proceso de envejecimiento. Además, el deterioro podría estar asociado con una pérdida en la capacidad de almacenamiento y menor habilidad para resistir enfermedades infecciosas (Copeland y McDonald, 1995), ya que las células dañadas producen compuestos que son buenos sustratos para el desarrollo de patógenos. Es común que hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor* spp. contaminen lotes de semillas. Además, las condiciones bajo las cuales son envejecidas favorecen el desarrollo de estos hongos, los que incluso pueden proliferar durante la posterior PGE, lo que dificulta la evaluación de las semillas.

Varios autores mencionados por García, 2007 señalan como ventajas de esta prueba:

- ✓ La PEA es rápida, económica, simple y útil para gran cantidad de especies.
- ✓ Esta prueba evalúa individualmente semillas/plántulas, y luego entrega un valor en porcentaje del lote de semillas; lo que complementa, de manera aceptable para los consumidores, los resultados de la PGE.

Y como desventajas:

- ✓ El tamaño de semillas del mismo lote varía, lo que puede afectar el resultado de la prueba. Las semillas pequeñas, al mostrar mayor relación superficie: volumen, durante el envejecimiento absorben agua a una tasa mayor que las semillas grandes. Esto provoca que las semillas pequeñas logren un contenido de humedad máximo con menos tiempo de envejecimiento, lo que resulta en deterioro severo y reducción drástica en la germinación después del tratamiento; lo que impediría una calificación adecuada.
- ✓ Las condiciones de saturación de humedad bajo las cuales envejecen las semillas, favorecen la aparición de hongos.

c. Longitud de plúmula

La medición de longitud de plúmula es otra prueba para medir vigor. Este método es aplicable a plántulas que presentan una plúmula recta, como los cereales, o bien raíces no ramificadas, como la lechuga. Se ha usado principalmente en cereales como cebada, trigo y maíz, aunque también para soya, remolacha, y para medir la longitud de raíz de lechuga (Moreno, 1996). Este método compara el desarrollo de plúmulas entre lotes por medio de pruebas llevadas a cabo al mismo tiempo; entre mayor sea la longitud de plúmula mayor es el vigor de los lotes analizados.

La longitud de la plántula después de un periodo específico es el producto del tiempo que le tomo germinar; esto es, la iniciación del crecimiento y la subsecuente tasa de crecimiento, es la medición más conveniente que una requiera observaciones frecuentes para establecer relaciones con tiempo y no se exprese fácilmente por población de semillas (Contreras, 2005).

d. Prueba de conductividad eléctrica (PCE)

Esta prueba consiste en colocar un grupo de semillas en agua a una temperatura dada, por un tiempo determinado; luego del cual se mide la conductividad eléctrica de la solución que contenían las semillas. El trasfondo de esto, es que las membranas celulares sufren cambios de organización molecular durante el proceso de deshidratación, que afecta a la semilla cosechada y almacenada. Luego, durante la imbibición, propia del comienzo de la germinación, se reconstituye la estructura de estas membranas, y se restablece la permeabilidad selectiva al paso de solutos, hacia y desde la célula. Sin embargo, la capacidad de reconstitución de las membranas disminuye con el tiempo, y el daño que sufren es cada vez mayor. De acuerdo con esto, semillas con vigor bajo sufren un daño mayor en sus membranas y necesitan mayor tiempo para recomponer la integridad de ellas, que aquellas semillas con vigor alto. Por lo tanto, aquellas semillas menos vigorosas liberan mayor cantidad de solutos citoplasmáticos al medio en el que están siendo embebidas, que semillas más vigorosas, ya que las membranas de estas últimas son capaces de reorganizarse rápidamente para evitar grandes pérdidas de electrolitos. La PCE monitorea estas fugas celulares, las que por sus propiedades electrolíticas pueden ser detectadas por un conductivímetro (McDonal 2002).

Perry, (1984) Señala que en algunas especies, se ha visto la relación que existe entre la facilidad con que los solutos son lixiviados, a partir de distintos lotes de semillas, y la capacidad de emergencia en campo. Esta relación muestra que, cuando lotes de semillas con niveles aceptables de germinación (superior al 80 %) se sumergen en el agua, y ceden grandes cantidades de electrolitos al agua, emergen pobremente en campo; y menciona como:

Ventajas

- ✓ La medición de la conductividad del lixiviado de las semillas es rápida, precisa, económica y de procedimiento simple.
- ✓ Los resultados son reproducibles, ya que es fácil estandarizar el método una vez que se ha adaptado a las condiciones de trabajo óptimas de cada especie.
- ✓ Permite grandes rendimientos de evaluación, ya que la predicción y registro de una muestra previamente acondicionada, puede efectuarse en menos de un minuto.

Desventajas

- ✓ Los resultados de esta prueba parten de la base de que, todas las semillas de un lote, están igualmente deterioradas y entregan la misma cantidad de electrolitos al medio. Sin embargo, cada lote está compuesto por una población individual de semillas, con un potencial de comportamiento en campo propio.
- ✓ La humedad inicial, el tamaño y la edad de las semillas, el grado de daño morfológico, la influencia del ataque de los microorganismos del suelo, entre otros, pueden afectar la tasa de solutos lixiviados al medio. Esto distorsiona el valor de la conductividad y puede modificar los resultados de predicción, convirtiéndola en una prueba difícil de interpretar. Por ejemplo: las semillas viejas o grandes pueden liberar tantos electrolitos que alteren los valores de conductividad de un lote completo.
- ✓ Presenta dificultades al momento de diferenciar semillas latentes de las que germinan sin dificultad.
- ✓ La adición de compuestos a la semilla, como por ejemplo fungicidas, pueden dificultar o impedir la utilización de esta prueba. Frente a esto existen dos posturas:

La AOSA (1983) recomienda que los tratamientos sean removidos antes de hacer la PCE. Sin embargo, esto puede ser difícil y afectar el resultado final, ya que junto con remover los tratamientos se pueden arrastrar electrolitos propios de la semilla, o la remoción puede ser desuniforme, se debe tener cuidado en que la temperatura de la solución sea de 20°C, ya que cambios pequeños producen diferencias en la conductividad.

La PCE entrega resultados en $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de semillas, lo que es difícil de interpretar para consumidores no entrenados. Además, existe una relación inversa entre las lecturas de conductividad y la calidad de las semillas. Lecturas altas significan que las semillas son de calidad baja, lo que es una conclusión opuesta a lo que la mayoría de la gente pudiese esperar (García, 2007).

4.4.4. Longevidad

Por muchos años se ha conocido que la longevidad de las semillas, en general dependen de su genotipo, condiciones de campo durante la producción, cosecha y manejo poscosecha a que sean sometidas. El almacenamiento de semillas lleva al deterioro inevitable de la calidad, en forma rápida o lenta, según sean almacenadas.

Esta situación se manifiesta primero por la pérdida de vigor y enseguida por la declinación de la capacidad de germinación y la viabilidad. Los estudios en ésta área, se han enfocado en diversas áreas del conocimiento: comprender condiciones físicas y biológicas que favorecen el deterioro de las semillas, cambios bioquímicos del deterioro de las semillas, integridad de las membranas celulares, identificación molecular de genotipos vigorosos, así como el desarrollo de modelos de predicción de la pérdida de la viabilidad de las semillas (McDonal, 1999).

✓ Prueba de deterioro controlado (Longevidad)

Se basa en el mismo principio que la de envejecimiento acelerado, solamente que en ésta se controla de mejor manera el contenido de humedad de las semillas (Moreno, 1996).

4.4.5. Potencial de almacenamiento

Tadeo y Espinosa (2004) mencionan que es la capacidad de una semilla para que en condiciones de almacén, mantenga en buenas condiciones sus características como semilla, es decir con la persistencia de la viabilidad y porcentaje de germinación. Los granos son almacenados en diferentes formas, utilizando para ello diversas estructuras, desde trojes o bodegas muy rústicas hasta bodegas y silos con el equipo adecuado para manejar y almacenar los granos y semillas con mayor eficacia. Durante estas operaciones, de manejo postcosecha, los granos y semillas sufren considerables mermas y pérdidas, que reducen la disponibilidad de los alimentos básicos de los llamados países del tercer mundo, y que representan el 70 % de la población mundial.

Las mermas y pérdidas postcosecha varían de región a región, de año a año, y de cultivo a cultivo, se estima que un 5 % de la cosecha mundial de granos se pierde por deficiencias prácticas de almacenamiento. En México alcanzan hasta el 30 %, para el maíz que es retenido por los productores para su autoconsumo. Las principales causas que originan estas pérdidas son la carencia de estructuras adecuadas para el almacenamiento y la conservación de las cosechas, la carencia de métodos, técnicas y equipo para el manejo de los granos a partir de la cosecha. Con esas carencias en los sistemas de postcosecha, sobrevienen una serie de problemas como son los causados por insectos y hongos que inciden en los almacenes. (Ortiz, 2002).

Existen varios factores que afectan el almacenamiento de grano. El primero es el contenido de humedad; es la única medida de control posible sobre uno de los parámetros más importantes que afectan la tasa de deterioro. El porcentaje de granos quebrados y dañados también afecta el almacenamiento. Otro es el número de granos infectados por hongos de almacén (Claridades 2005).

4.5. Los hongos

Los microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) causan considerables efectos nocivos en los alimentos que dan por resultado cambios que llevan a reducirlos y descomponerlos, alterando las cualidades nutricionales y gustativas y en algunos casos, a causa de la presencia de los microorganismos, los alimentos pueden volverse tóxicos para el hombre y los animales.

Los hongos son los patógenos más importantes de las plantas y también en cuanto a patógenos transportados por semillas. Son organismos heterótrofos uni o pluricelulares, poseen núcleo, generalmente su cuerpo es filamentososo y está formado por hifas: estructuras tubulares que pueden o no ser septadas. Su membrana es lipolítica, con permeabilidad selectiva a nutrientes y gases, lo que permite la secreción de diversas sustancias; producen numerosas esporas que son fácilmente transportadas por el viento, algunas por el agua de riego, otras por los implementos agrícolas y por el hombre a través de las transacciones comerciales de semillas infectadas.

Los hongos se reproducen en forma sexual y asexual, la primera es por medio de esporas que son producto de la fusión de núcleos, seguida de una división meiótica; la forma asexual no involucra la meiosis. Ciertos hongos tienen ambos estados, asexual y sexual, frecuentemente presentan su estado sexual en diferentes géneros de los hongos llamados perfectos (Moreno, 1996).

Los hongos contaminantes, en general pueden ser divididos en dos grandes grupos de acuerdo con el momento de la contaminación: los de campo y los de almacén (Moreno 1988).

4.5.1. Hongos de campo

Los hongos que afectan a las plantas en el campo detienen su desarrollo en el momento en que las semillas alcanzan su madurez fisiológica y empiezan a perder agua; cuando están listas para ser cosechadas. Cuando el contenido de humedad es inferior al equilibrio con una humedad relativa al 90 %, estos hongos entran a un estado de latencia, y así permanecen durante el almacenamiento de las semillas.

Incluye distintas especies que requieren altos niveles de humedad en el grano (20-22 %), son típicos los géneros *Alternaria* y *Fusarium* (Moreno, 1996).

4.5.2. Hongos de almacén

Son los hongos que invaden a los granos y semillas después de que estas son cosechadas a contenidos inferiores de humedad. Los hongos de almacén, especialmente los hongos de *Aspergillus* y *Penicillium*, se encuentran con frecuencia en la naturaleza y son comunes en la tierra y en muchos otros medios, estos hongos prosperan en granos almacenados que están secos. Los hongos de almacenamiento pueden invadir la semilla directamente, es decir que no crecen en la planta para llegar a las semillas. Las esporas de estos hongos, además de otras estructuras aletargadas, se encuentran normalmente en toda la naturaleza, con especial abundancia en el equipo e instalaciones de manejo de grano y semillas. Las esporas, así como las otras estructuras aletargadas, germinan cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables y atacan el grano almacenado. Dependiendo de la temperatura, la mayoría de las especies de hongos de almacén prosperan a un nivel específico de contenido de humedad, en un ámbito de 12 a 19 % aproximadamente (Christensen, 1972).

Las especies de hongos de *Aspergillus* y *Penicillium* son capaces de infectar el grano de maíz en el campo si le ha ocurrido algún daño a la mazorca que le permita acceso a los granos; no obstante, la mayoría de infecciones ocurre durante el manejo y almacenaje. De estos géneros, *Aspergillus* y *Penicillium*, los hongos más comunes en granos almacenados son las especies de los grupos *Aspergillus restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. ocharceus*, *A. versicolor* y *A. flavus*, este último de gran importancia, por ser el grupo al que pertenecen las dos especies *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, productoras de las micotoxinas causantes de cáncer más potentes que se conocen, las aflatoxinas. Las otras especies de hongos de almacén, del género *Penicillium*, son menos frecuentes por requerir mayores contenidos de agua y menores temperaturas aunque se han registrado más de 60 especies en granos de maíz y sus derivados causando el mismo daño que *Aspergillus*, y producen otras toxinas (Moreno, 1988).

Tanto las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, son de una amplia distribución, y uno de sus papeles en la naturaleza es la descomposición de la materia orgánica en el suelo, esto por su alta capacidad saprofítica. Esta particular característica, es la razón por la cual estos hongos invaden a los granos y semillas después de la cosecha, cuando los granos empiezan a declinar en su vigor, quedando expuestos al ataque de patógenos débiles, como lo son los hongos de almacén (Moreno, 1996).

4.5.2.1. Condiciones que favorecen el desarrollo de hongos de almacén

Las condiciones que favorecen el desarrollo de los hongos de almacén son:

a) Humedad. El factor más importante en la conservación de los granos y semillas es la humedad, tanto la del ambiente, la humedad relativa, como el agua contenida en los granos, ya que la disponibilidad de agua es determinante en el desarrollo de insectos y de los hongos de almacén. En humedades relativas de 55-70 % la actividad de los hongos de almacén es nula o prácticamente nula, y los hongos que pueden crecer a esas bajas humedades lo hacen muy lentamente y sus efectos también son lentos y muy poco perceptibles. Los hongos de almacén que más daños causan a los granos y semillas requieren de humedades relativas superiores al 75 % (Gimeno, 2003).

b) Temperatura. La temperatura es el segundo factor en importancia para el crecimiento de estos hongos, los que pueden crecer desde temperaturas muy bajas hasta temperaturas que llevan al calentamiento de los granos y en ocasiones hasta su combustión. A temperaturas bajas el crecimiento es lento, incrementándose a medida que la temperatura es mayor (Moreno *et al.*, 1988).

c) Condición del grano ó s emilla. La cosecha mecánica de los granos y semillas, así como su posterior manejo, son fuentes de daño físico que facilita la entrada de hongos e insectos, y las impurezas, que acompañan al grano, impiden el paso del aire y favorecen el desarrollo de los insectos y hongos, por tener siempre humedades más altas que el resto del grano. El grano con daño físico está más expuesto a ser invadido por los hongos, debido a que gana humedad rápidamente y

no ofrece ninguna resistencia a la penetración de las hifas del hongo (Moreno, 1988).

d) Período de almacenamiento. El factor tiempo, también es importante en el deterioro de los granos y semillas por la acción de los hongos. A períodos largos de almacenamiento corresponde un mayor riesgo de daño, lo cual es directamente proporcional al contenido de humedad y a la temperatura. Para determinar el período de almacenamiento se requiere conocer con precisión la humedad del grano y la del ambiente, así como la temperatura y condición del grano ó semilla. Otro factor que influye en el desarrollo de los hongos es el oxígeno, ya que estos microorganismos son aerobios por lo que en condiciones de bajo contenido de oxígeno en el aire de almacenamiento, alrededor del 1 %, los hongos paran su desarrollo (Moreno, 1988).

4.5.3. Daños ocasionados por hongos de almacén a granos y semillas

Si los granos no se cosechan a tiempo, están expuestos a ser invadidos por los hongos de almacén, dado que el grano empieza a perder humedad y a ser dañado por los insectos de almacén, ya que el almacenamiento comienza prácticamente después de la cosecha y de los trabajos de acondicionamiento del grano o semilla como la limpieza y secado, lo cual sucede antes de la cosecha. Uno de los principales efectos que estos hongos tienen es la rápida pérdida de la viabilidad que ocasionan a las semillas agrícolas, como el maíz, sorgo, y frijón, entre otras. Muchos hongos no causan problemas a las semillas ni a las plántulas durante su germinación y emergencia, pero son capaces de causar el desarrollo de enfermedades foliares, del tallo ó de los frutos (Christensen, 1972).

Los hongos de almacén junto con los insectos son responsables de la mayoría del deterioro del grano almacenado, así como del calentamiento y endurecimiento, la producción de micotoxinas, la generación de olores y sabores desagradables, y la completa destrucción del grano (Moreno, 1996). Durante el deterioro, la proporción de granos invadidos por los mohos de almacenamiento va aumentando al pasar el tiempo. Si la infección es muy severa el daño puede ocasionar la muerte del embrión (Claridades, 2005).

4.5.4. Toxinas de hongos de almacén

Ciertas especies de hongos de almacén se especializan en atacar semillas almacenadas. Bajo condiciones de alta humedad y alta temperatura, estos hongos pueden producir micotoxinas. La buena práctica de almacenamiento que mantienen la calidad del grano o semilla, previenen la contaminación. La aflatoxina es la toxina más conocida de *Aspergillus*; sin embargo, se han descrito docenas de otras micotoxinas, como la ocratoxina y la citrinina (Delouche, 1985).

Muchos hongos no son productores de micotoxinas incluso pudiendo invadir el grano, por lo que un grano enmohecido no tiene por que ser necesariamente tóxico. Del mismo modo, es posible detectar una micotoxina sin la presencia aparente del hongo productor, ya que éste puede haber sido inactivado por procesos químicos o por la alteración de los factores ambientales mientras las micotoxinas permanecen en el sustrato (Antón y Lizaso, 2001).

4.6. Biología del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a la clase de hongos conocidos como los Hyphomycetes, la cual pertenece a la división Deuteromycota. Esta división incluye los estados conidiales de los hongos que pueden ó no tener el estado teleomórfo. Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus* que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos de los que solo 12 grupos se relacionan con enfermedad humana: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flaviceps* y *A. ustus* (Alcalá et al.2002). Gams et al. (1985) reclasifico al género *Aspergillus* y lo dividió en 6 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Clavati*, *Nidulantes* y *Circumdati*) cada uno de los cuales está dividido a su vez en una o más secciones que corresponden a los grupos descritos por Rapper y Fennell.

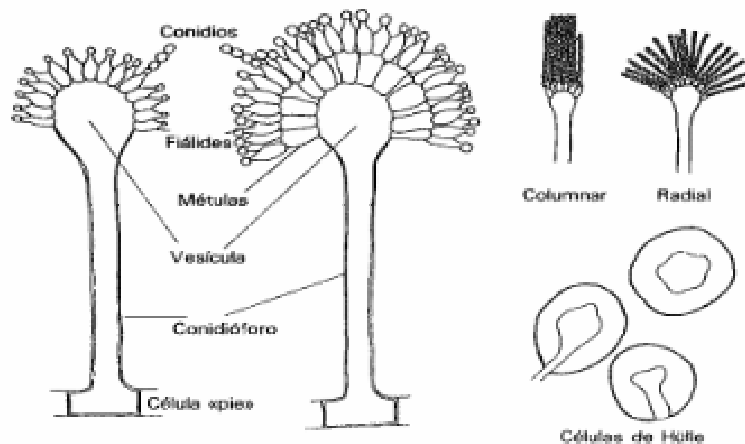
El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas:

globosa, radiada, columnar ó claviforme y a simple vista parecen ser alfileres sobre el substrato.

El conidióforo característico de *Aspergillus*, es una estructura unicelular que tiene tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica debajo de la vesícula) y la célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Abarca *et al.*, 2000).

En *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiogena o fiálide. En algunos *Aspergillus* hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte (Figura 1). *Aspergillus* posee una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente dos cabezas (Carrillo, 2003).

Figura 1. Estructuras morfológicas del hongo *Aspergillus*



Algunas especies del género *Aspergillus* no presentan estados sexuales, como es el caso de las especies *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, cuyo estado perfecto no es conocido y por lo tanto su reproducción es asexual o conidial. *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (Zenteno, 1971).

Los hongos del género *Aspergillus*, contaminan con sus toxinas diferentes alimentos: semillas de algodón, cereales y oleaginosas, productos lácteos, cárnicos, vinos, etc. (Arroyo, 1995).

Las dos especies más importantes como productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus* hongo protéico, (que posee enzimas llamadas proteasas, capaces de degradar y utilizar fuentes protéicas) y *Aspergillus parasiticus* (posee enzimas llamadas lipasas capaces de degradar y utilizar fuentes lipídicas). Las características principales son:

Cuadro 3: Características distintivas entre *A.flavus* y *A. parasiticus*.

Característica	<i>A.flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Arreglo del conidioforo	Consistentemente biseriado	Comúnmente uniseriado, algunas veces mixto
Textura de la pared de los conidios	Desde casi lisos hasta ligeramente ásperos	Inequívocamente rugosos
Color de la colonia	Verde-amarillo	Verde-pasto
Superficie de la colonia	Irregular con algunas hifas aéreas	Compacta, aterciopelada
Tipo de aflatoxinas	B ₁ y B ₂	B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂

Adaptado de Davis y Diener, 1986.

4.6.1. Ciclo biológico de *Aspergillus flavus*

El inóculo primario de *A. flavus* en el campo lo pueden constituir los esclerocios formados en los granos de maíz o aquellos que quedaron en el suelo de ciclos anteriores; el inóculo primario también puede ser el micelio que quedó en residuos de cosecha o insectos que fueron atacados por el hongo y quedaron muertos en el suelo (Diener y Davis, 1986). Los esclerocios son protegidos de manera que al germinar dejan disponibles miles de esporas que con la ayuda del aire, agua o insectos van a dar a las plantas de maíz; el inóculo también puede provenir de residuos de cosecha o del suelo. El período crítico para la infección es alrededor de tres semanas después del inicio de formación de los estigmas pero la colonización del hongo se puede dar en cualquier momento durante el desarrollo de la mazorca y

llenado de grano, incluso posteriormente cuando el grano es almacenado. Aunque existe un período crítico de infección, los factores ambientales que influyen para que el hongo se establezca no parecen circunscribirse a dicho período, sino que estos pueden influir durante todo el ciclo vegetativo de la planta en el campo y posteriormente en el almacenamiento del grano (Bucio, 1999).

4.6.2. Infección de *A. flavus* en maíz

A. flavus coloniza con facilidad los estigmas externos a las brácteas y luego desciende rápidamente por la mazorca, invadiendo primero los estigmas interiores, luego las glumas y la superficie de los granos, pero rara vez penetra a la médula del elote. El hongo vive en los estigmas, glumas y superficie de los granos hasta la etapa tardía del desarrollo del grano; cuando el grano se aproxima a la madurez (humedad cercana al 32 %), pero también es capaz de introducirse dentro de los granos directamente aunque lo hace más rápidamente cuando está dañado por insectos. La colonización de la superficie de los granos al parecer es más frecuente que la infección interna (Payne *et al.*, 1988).

La asociación entre los hongos del grupo *A. flavus* y la planta de maíz en el campo no termina con la cosecha pues se han encontrado aflatoxinas en los rastrojos, además de esclerocios. La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus* se debe a la invasión del hongo saprobio oportunista sin capacidad patogénica, así las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha las semillas de algodón o granos de maíz en crecimiento. Generalmente al haber una actividad combinada de insectos, hongos de almacén y otros microorganismos; al efectuar la aplicación de insecticidas se limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos (Carrillo, 2003).

4.7. Micotoxinas

El término micotoxina se deriva de las palabras griegas “Mikes” (hongo) y “Toksikon” (veneno). Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos con propiedades tóxicas, carcinogénicas, mutágenicas, teratógenicas y estrogénicas capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos en el hombre y en los animales a estos síndromes se les denomina “micotoxicosis” (Borrell y Gimeno, 2002).

Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas con una estructura química y una actividad biológica muy diversa. Aunque pueden ser genótipicamente específicas para un grupo de especies, el mismo compuesto puede también ser elaborado por los hongos pertenecientes a géneros distintos. La mayoría de las micotoxinas son producidas por especies de los géneros de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. La contaminación con micotoxinas puede deducirse, como un proceso aditivo, que comienza desde el campo de cultivo y se incrementa en los pasos subsiguientes de cosecha, almacenamiento y su uso final (Christensen y Sauer, 1982).

Un aspecto importante a recalcar es que no todos los hongos producen micotoxinas, por lo que no todos los granos invadidos con hongos tienen micotoxinas. La formación de micotoxinas depende de la cepa específicamente toxigena del hongo que prolifera en el sustrato y de factores ambientales como la humedad, la temperatura y el oxígeno. Por lo tanto, la contaminación con micotoxinas puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, métodos de producción, tipos de almacenamiento y también según el tipo de insumo. Las micotoxinas contaminan frecuentemente los géneros alimenticios, (cereales y productos de cereales, cacahuates, nueces, pistachos y otros frutos secos, carnes ahumadas, especias, vinos, café, frutas y otros) (Cuadro 4). Algunas de ellas pueden ser encontradas como residuos en la leche y en derivados de carne y huevo (Gimeno, 2003).

Cuadro 4. Principales especies productoras de micotoxinas.

Toxina	Procedencia Fúngica	Alimentos afectados
Toxinas de <i>Aspergillus</i> Aflatoxinas	<i>A.flavus, A.parasiticus.</i>	Cacahuates, semillas oleaginosas, cereales, leguminosas y otros residuos de alimento de origen animal.
Esterigmatocistina	<i>A.nidulan, A.versicolor.</i>	Granos de cereales.Granos de cereales, granos de café.
Ocratoxina	<i>A.ochraceus, p.viridicatum.</i>	
Toxinas de <i>Penicillium</i>	<i>P.islandicum.P.articae,</i>	Arroz y otros cereales .Producción
Luteosquirina Patulina	<i>P.claviformi,</i> otros.	de manzanas, cereales y trigo.
Toxinas de <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp., Trichoderma</i>	Maíz, trigo, cebada, avena.Mijo,
Zearalenona	<i>sp. Glicotricothecium sp</i>	cereales.Maíz y otros.

(Gimeno, 2003).

4.7.1. Factores para el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas

Según Antón y Lizaso (2000) el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas requieren de ciertos condicionantes ambientales, entre ellos los siguientes:

Factores físicos: humedad y agua disponible, temperatura, e integridad física del grano o alimento.

Factores químicos: composición del sustrato, pH, nutrientes minerales y disponibilidad de oxígeno.

Factores biológicos: presencia de insectos y estirpes específicas (en una misma especie fúngica existen estirpes productoras de micotoxinas y otras que son incapaces de producirlas).

4.7.2. Toxicidad de las micotoxinas

Es difícil establecer la etiología y las enfermedades crónicas de una ingestión prolongada de alimentos con ciertos niveles de micotoxinas, ya que los riesgos para la salud humana están sujetos a varios factores:

- ✓ Tipo de micotoxina, biodisponibilidad, toxicidad y concentración de la misma en el alimento.
- ✓ Sinergismo entre las micotoxinas presentes.
- ✓ Cantidad del alimento consumido y continuidad o intermitencia en la ingestión.
- ✓ Peso del individuo, estado fisiológico y edad del mismo (Sánchez y Santos-Chona, 2001).

4.7.2.1. Micotoxicosis

Las micotoxicosis son enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas. Estas enfermedades se evidencian por cánceres, hemorragias, tumores, abortos y defectos de nacimiento entre otros más. (Borrell y Gimeno, 2002).

Las micotoxinas afectan tanto a los animales como al hombre. Las micotoxinas pueden causar efectos agudos y crónicos en una gran variedad de especies animales en sus distintos órganos, aparatos y/o sistemas (Oirsa, 2003). Hay ciertas características que son típicas de esta intoxicación, como es que siempre esta relacionada con el alimento o asociada con algún ingrediente del mismo. La enfermedad resultante de la intoxicación no es contagiosa y además puesto que las micotoxinas se encuentran distribuidas de manera heterogénea en el alimento, muchas veces se observan brotes aislados en animales consumiendo la misma partida de alimento (Lara, 2004).

4.8. Aflatoxinas

En la década de los 60^s se reportó un problema de intoxicación en aves de corral masiva, en Inglaterra, donde murieron 100,000 pavos a causa de unos hongos no filamentosos. Denominada la enfermedad "X" del pavo. Estos compuestos se encontraron en harina de cacahuate importada de Sudamérica infestados por *A. flavus*. Diversos estudios permitieron determinar una serie de compuestos fluorescentes a la luz ultravioleta; nombrándoseles en su conjunto aflatoxinas o AF (a = *Aspergillus* + fla = *flavus* + toxina = veneno).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Afectan prácticamente a todos los seres vivos desde los virus hasta el hombre. Estos contaminantes de los alimentos actúan en concentraciones de partes por billón (microgramos por kilogramo). Son fluorescentes al exponerlas a la luz ultravioleta de onda larga y resisten altas temperaturas, en un rango entre 260 y 320° C, por lo tanto no se eliminan por completo con la cocción, fritura ni con la pasteurización de los alimentos (Arroyo, 1995).

Los insectos están asociados a la presencia de aflatoxinas en granos debido a que pueden actuar como vectores, pero las larvas no son inmunes al efecto tóxico (Carrillo, 2003).

Del mismo modo, puede detectarse una micotoxina sin la presencia del hongo productor, ya que éste puede haber sido inactivado por procesos químicos o por la alteración de los factores ambientales mientras las micotoxinas permanecen en el sustrato (Antón y Lizaso, 2001).

4.8.1. Propiedades físico-químicas de las aflatoxinas

Arroyo (1995), menciona que existen seis tipos principales de aflatoxinas producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, y *A. parasiticus* y que se designan según el color que presentan al fluorescer, así tenemos:

B₁ Que da una fluorescencia azul (blue) y el número 1 indica el valor de más rápido en el corrimiento cromatográfico de capa fina.

B₂ Es un derivado de la anterior, es 10 veces menos mutágena, también presenta fluorescencia azul, el número 2 indica que viaja más lento en la capa cromatográfica de capa fina.

M1 Es un derivado hidroxilado de la AFB₁ que se metaboliza y pasa a la leche de ahí su nombre (milk).

M2 Es un derivado de la M1 y el número 2 indica que corre más lento en la placa cromatográfica de capa fina.

G₁ Es un derivado de la AFB1 con un anillo de 5 carbonos (pentosa) en lugar del anillo con 6 carbonos característico de las de tipo B1 y tiene una fluorescencia verde (green).

G₂ Es un derivado de la AFB1 y tiene también una fluorescencia verde pero carece de la doble ligadura en el furano externo, se nombra 2 porque es más lenta en su corrimiento cromatográfico que la anterior.

La diferencia entre especies de *Aspergillus* puede efectuarse con base en la producción de determinados metabolitos secundarios. Así, *A. flavus* produce solo aflatoxinas B₁ y B₂, mientras que *A. parasiticus* B₁, B₂, G₁, y G₂. La especie recientemente descrita *A. nomius*, es morfológicamente muy similar a *A. flavus* y se caracteriza por producir aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (Detroy *et al*, 1971 citado por Abarca *et al.*, 2000).

Cuadro 5. Principales propiedades físico-químicas de las aflatoxinas.

Características	Aflatoxinas				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁
Formula química	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Peso molecular	312	314	328	330	330
Punto de fusión (°C)	268-269	287-289	244-249	230	290
Absorción ultravioleta en etanol nm (E)	223(25,600)	220(20,500)	243(11,500)	217(28,000)	226(23,100)
	285(23,400)	265(12,700)	247(9,900)	245(12,900)	265(11,600)
	362(21,800)	263(24,000)	264(10,000)	365(19,300)	
Fluorescencia emitida	425nm	425nm	450nm	425nm	425nm

(Moss, 1991).

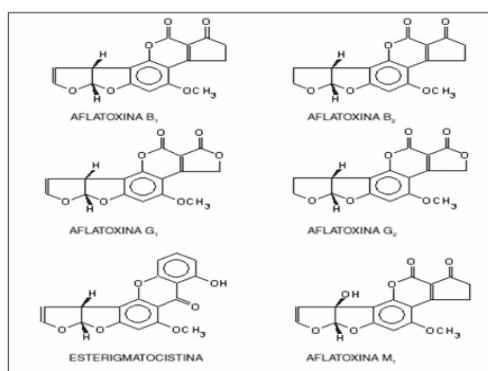
La más importante de todas las aflatoxinas desde el punto de vista toxicológico y químico es la aflatoxina B1 (AFB1) ya que es la precursora de todos los tipos de aflatoxinas restantes. Dentro de las propiedades químicas más importantes de la AFB1 tenemos las siguientes:

Presenta fluorescencia azul intensa al exponerla a la luz ultravioleta convencional de longitud de onda larga, es ligeramente soluble en agua y soluble en muchos

solventes orgánicos de polaridad intermedia como metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y cloroformo; se descompone sin evaporarse a 270° C, se rompen con hipoclorito de sodio (García *et al*,2001).

Las propiedades químicas de las aflatoxinas y sobre todo su estructura molecular (Figura 2), han dado lugar a las diversas formas de identificación y cuantificación a partir de muestras de alimentos contaminados. Así, se tienen técnicas que se basan en la separación por cromatografía de capa fina, detectando a las aflatoxinas por su capacidad de fluorescer con la luz ultravioleta, estos métodos tienen como desventaja la de utilizar grandes cantidades de solventes peligrosos en su manejo y a menudo estas técnicas son semicuantitativas y su sensibilidad no es la suficiente para determinar los límites que la legislación exige. Otra técnica es la de cromatografía de líquidos (HPLC), la cual cuantifica a las aflatoxinas e incluso es útil para separar los distintos tipos que existen naturalmente en los alimentos; actualmente se cuantifican por métodos que incluyen técnicas inmunológicas de ELISA (King y Wallin, 1989).

Figura 2. Estructura molecular de las aflatoxinas



(Mehan, 1989)

4.8.2. Efectos tóxicos de las aflatoxinas

El efecto de las aflatoxinas sobre los animales es muy variable, dependiendo de varios factores dentro de los cuales están: la edad, sexo, especie, estado nutricional, dosis ingerida, frecuencia de ingestión, y composición de la dieta. Los individuos pueden presentar síntomas que van desde la irritación de las mucosas

intestinales hasta intoxicaciones severas que traen consigo hemorragias internas, vómitos, diarreas, o daños crónicos como la cirrosis, el cáncer en hígado (Guzman, 2001). El órgano más afectado por estas toxinas, es el hígado, alterando también la absorción y metabolismo de las vitaminas, los lípidos y los minerales. Uno de los factores que colocan a las aflatoxinas como sustancias altamente peligrosas, es el hecho de que son acumulativas, y que pasan del tracto digestivo a la carne, a la leche y a los huevos de los animales que consumen alimentos contaminados con estas sustancias; con el consiguiente riesgo para los consumidores de esos productos(Andreson, 2006).

En general, se le llama aflatoxicosis a la enfermedad causada por la ingestión de alimentos contaminados por aflatoxinas. Los efectos nocivos de la intoxicación han sido clasificados en dos formas generales (Wilson *et al.*, 1992).

Aflatoxicosis aguda, que se produce cuando se consumen niveles moderados a altos de aflatoxinas. Los efectos de esta intoxicación pueden incluir:

- ✓ Hemorragias
- ✓ Daño agudo del hígado
- ✓ Edema
- ✓ Alteraciones en la digestión y/o metabolismo de alimentos
- ✓ Posiblemente la muerte

Aflatoxicosis crónica, que es la que resulta del consumo de niveles bajos a moderados de aflatoxinas. Los efectos son generalmente subclínicos y difíciles de reconocer, se dan a largo plazo o pueden ocurrir en cualquier momento después de haberse expuesto a las aflatoxinas durante meses o años, entre estos destacan:

- ✓ Efectos carcinogénicos
 - ✓ Efectos teratogénicos
 - ✓ Efectos embriotoxigénicos
 - ✓ Inhibición de la síntesis de proteínas
 - ✓ Pueden actuar como anticoagulantes
 - ✓ Pueden actuar sobre el sistema inmunológico, causando inmunodepresión.
- (Alvarado, 2005)

Otro efecto de las aflatoxinas, es el incremento de la susceptibilidad de los animales a las infecciones por bacterias, virus, y otros agentes causales de enfermedades.

Por otra parte, la contaminación por aflatoxinas en maíz es un problema internacionalmente importante, especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales donde la invasión por *Aspergillus* y la síntesis de aflatoxinas se ven favorecidas. Las condiciones del medio ambiente como humedad y temperatura aunado a las prácticas agronómicas, por ejemplo la fertilización nitrogenada, han sido reportadas como favorables a la síntesis de aflatoxinas en campo (Bucio, 1999).

Actualmente se permite para humanos la ingestión de alimentos, como el maíz, contaminados con 20 ppb de aflatoxina B, dosis baja para causar síntomas agudos; sin embargo no se le pone atención al efecto a largo plazo de la infección acumulativa de pequeñas dosis de aflatoxinas, que bien pueden ser la causa de cáncer, sin que las aflatoxinas se detecten en cantidades significativas, es decir por debajo de los límites permitidos, en los alimentos que se ingirieron el momento de los síntomas severos y la muerte (Kim y Campbell, 1983). *A. flavus* y *A. parasiticus* frecuentemente invaden el maíz, en donde sintetizan aflatoxinas, a las cuales se les considera como el compuesto carcinogénico más potente que ocurre naturalmente. Además, se ha comprobado que *A. flavus* produce ácido ciclopiazónico, el cual puede causar necrosis y alteraciones histopatológicas.

4.8.3. Producción de aflatoxinas

La producción de aflatoxinas depende de varios factores, entre los principales se encuentran cepas toxígenicas, el substrato y su condición, la micoflora asociada, las condiciones de humedad y temperatura, y la atmósfera de almacenamiento. Los productos que con más frecuencia se les encuentra contaminados con aflatoxinas son, el maíz, el cacahuate, la copra, sorgo, semilla de algodón, y diferentes clases de nueces. Sin embargo también se les ha encontrado en muchos otros productos, pero no en las cantidades y con la frecuencia que en los arriba mencionados, habiéndoseles encontrado en cebada, mijo, avena, harina de pescado, girasol, trigo, entre otros (Waliyar, 200).

En cuanto a la condición del sustrato, si se trata de granos, éstos estarán más expuestos si presentan daño físico, ya que estos hongos son patógenos débiles. Esta condición es de gran importancia en la producción de aflatoxinas en el campo. La producción en el campo, sucede cuando las plantas sufren sequía, altas temperaturas y ataque de insectos, lo que las debilita y predispone al ataque de estos patógenos, que bajo circunstancias favorables para las plantas, no causarían el mismo daño (Wilson, 1992).

En cuanto a la micoflora asociada, se dice que estos hongos no compiten con ventaja contra otros microorganismos, y que es la razón por la cual la producción de aflatoxinas no es tan común en granos que están sufriendo deterioro por hongos, ya que normalmente son invadidos por variedad de ellos; en cambio en semillas de algodón y en maíz en el campo los hongos productores de aflatoxinas ocurren prácticamente en cultivo vivo (Moreno, 1991). Estos hongos requieren para su desarrollo, humidades relativas de 85 % ó superiores. En cuanto a temperaturas se ha señalado que las temperaturas óptimas para la producción de aflatoxinas son de 25 a 35 °C.

4.8.4. Condiciones favorables para el desarrollo de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas

Los factores que favorecen la infección y desarrollo de *A. flavus* y la posterior producción de aflatoxinas son diversos y algunos de ellos interactúan entre si. Entre otros se pueden mencionar la temperatura, humedad relativa, contenido de humedad del grano, precipitación pluvial, niveles iniciales de inóculo, actividad de insectos, el daño físico de los granos, la concentración de CO₂ y O₂ y la competencia con el resto de la micoflora: otros factores de tipo agronómico también mencionados como son la genética de la planta, la fertilización, las fechas de siembra y la humedad del suelo (Benítez, 2007).

✓ **Temperatura.** En general las altas temperaturas favorecen el proceso de infección de *A. flavus* y su posterior producción de aflatoxinas. El rango de temperatura óptimo para el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxina está entre 28 y 38 °C. Aunque este puede desarrollarse desde los 11 hasta los 40 °C, sin

embargo con temperaturas menores al rango óptimo, la infección disminuye (Bucio, 1999). Moreno *et al* 1992, menciona que ha sido demostrado que mientras la AFB1 y la AFG1 fueron producidas en igual cantidad de 15°C hasta 18°C, éstas fueron producidas en una proporción de 12:1 a 32°C (Davies y Diener, 1986).

✓ **Humedad relativa.** La humedad relativa necesaria para que ocurra la infección del maíz por *A. flavus* es de 85 % o más; a menor humedad relativa se restringe o se detiene el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxinas puede ser a nivel de trazas. A mayores humedades relativas los niveles de aflatoxinas se pueden incrementar drásticamente, sobre todo combinado con temperaturas altas, humedad del grano u otros factores. La germinación y esporulación de *A. flavus* puede efectuarse a 81 y 83 %, respectivamente pero la infección y crecimiento requieren de más de 85 % para ser efectivas (Benítez, 2007).

✓ **La actividad de agua.** La actividad de agua es la proporción de la presión de vapor de agua del sustrato hasta la presión de vapor de agua destilada, en una determinada temperatura y presión. A baja actividad de agua, el agua es retenida por las sales, azúcares, proteínas y otros solutos, por lo tanto el crecimiento de los hongos no puede ocurrir porque se disminuye el agua disponible. La producción de aflatoxinas decrece en valores actividad de agua debajo de 0.85. Sin embargo el crecimiento del hongo puede todavía ocurrir en valores de actividad de agua de 0.78 hasta 0.80. La actividad de agua óptima para la producción de aflatoxinas para ambos *A. flavus* y *A. parasiticus* ésta en el rango de 0.95 a 0.99. Las diferencias pueden ser atribuidas a diferentes factores, incluyendo la cepa del hongo, pero también a la composición de los sustratos, los cuales, parecen jugar un papel importante, al igual que la actividad de agua respecto a la producción de aflatoxinas (Moreno, 2004).

✓ **Contenido de humedad del grano.** Varios investigadores reportan que existe una correlación positiva entre el contenido de humedad del grano y la infección de *A. flavus*. La humedad del grano almacenado debe ser mayor de 14 % para que el hongo pueda prosperar; la óptima fluctúa entre 16 y 20 %. Cuando el grano es almacenado con contenidos de humedad dentro del rango optimote desarrollo de *Aspergillus sp*, los niveles de aflatoxinas pueden incrementarse más

de 10 veces en tan solo 3 días. Si aunado a un alto contenido de humedad del grano se le suma otro factor favorable como por ejemplo elevación de temperatura, los niveles de aflatoxinas pueden incrementarse notablemente (Benítez, 2007).

✓ **Agobio por sequía.** El agobio de las plantas de maíz por sequía ha sido reportado como un factor que afecta la infección de *A. flavus* y la síntesis de aflatoxinas en maíz desde dos puntos de vista: bajas precipitaciones pluviales y manejo ineficiente de agua de riego.

Se han reportado mayores incidencias del hongo o altos niveles de aflatoxinas en años donde la precipitación pluvial ha sido escasa. Frecuentemente las bajas precipitaciones pluviales son asociadas al estrés de las plantas por sequía cuya condición las hacen más susceptibles al ataque de *A. flavus*, especialmente si coincide con la época de floración de maíz, además de que en suelos secos existen más esporas que pueden diseminarse hasta las mazorcas, o que las plantas desarrolladas bajo condiciones de estrés tienen menos follaje, lo que hace a las mazorcas más accesibles a la invasión por esporas del hongo. En el manejo del agua de riego se ha demostrado que en parcelas irrigadas adecuadamente se obtienen menos granos afectados con *A. flavus* y bajos niveles de aflatoxinas, considerándose incluso al agobio de plantas por sequía como uno de los principales factores que influyen en la concentración de aflatoxinas en maíz (Payne et al, 1992).

Además de las antes mencionadas Bucio, (1999) agrega también:

✓ **Niveles iniciales de inóculo.** La cantidad de inóculo disponible en sus diferentes formas para iniciar una infección en maíz es uno de los factores biológicos más importantes para determinar los niveles de contaminación por *A. flavus* y la producción de aflatoxinas. El inóculo inicial puede estar en el campo como esporas en el aire, en el suelo o en los residuos de cosecha o en el almacén en el grano mismo, dentro o fuera de él, pudiendo incluso estar en granos asintomáticos.

✓ **Daño físico y actividad de los insectos.** El daño físico ocasionado por el mal manejo del grano y el daño por los insectos, tanto en campo como en almacén, son factores que predisponen a los granos a la infección de *A. flavus* y la

consecuente producción de aflatoxinas. El daño físico y la actividad de los insectos también son factores determinantes para la síntesis de aflatoxinas en granos almacenados; los insectos además de producir heridas en los granos pueden actuar como vectores de *A. flavus* y ocasionar cambios en la humedad y temperaturas si sus poblaciones son elevadas.

✓ **Competencia con la micoflora.** El hongo *A. flavus* generalmente se encuentra asociado a múltiples especies de otros microorganismos en los granos de maíz. Algunos hongos reportados como competidores directos por el substrato con *A. flavus* son especies de *Diplodia*, *Gibberella*, y *Fusarium*. Aparte de los hongos, también se han buscado bacterias con actividad antagónica contra *A. flavus*. En un estudio hecho en semilla de algodón se demostró que 5 de 892 aislamientos bacterianos inhibieron parcial o totalmente el crecimiento del hongo, el más efectivo fue identificado como *Pseudomonas cepacia*.

✓ **Los gases atmosféricos** Los hongos son organismos aerobios, pero la relación entre los requerimientos de oxígeno y de bióxido de carbono varía considerablemente. Entre las especies y cepas de hongos se ha demostrado que las bajas concentraciones de CO₂ son benéficas para la germinación de la spora y son involucrados en el metabolismo del hongo y en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos e intermediarios del ciclo tricarboxílico. Sin embargo a concentraciones de CO₂ mayores de 20 %, se inhibe la germinación de las esporas y a concentraciones de CO₂ mayores de 10 % se suprime la producción de toxinas. Un decremento en el oxígeno atmosférico de menos del 20 %, o un incremento en la concentración de O₂ hasta 90 % se ha encontrado que inhibe la formación de aflatoxinas. La máxima producción de aflatoxinas en los granos almacenados depende no solo de la cepa sino también de la concentración de CO₂ y de O₂, en combinación con la actividad de agua, pH, y la temperatura de almacenamiento (Moreno, 2004).

✓ **La luz.** Moreno (2004) menciona que los efectos de la luz sobre la producción de aflatoxinas para *A. flavus* y *A. parasiticus* han sido estudiados por King y Tallin, 1989) quienes reportaron que mientras los conidios fueron producidos en luz y en oscuridad, los conidióforos fueron más abundantes en los hongos que fueron expuestos a la luz. Igualmente, observaron que la región azul de la luz

blanca fue más efectiva en la foto respuesta de los hongos. (Mehan, 1989), también reporto que la foto respuesta de los hongos fue influenciada por la temperatura, la cual afecta la producción de aflatoxinas. Demostró que la producción de aflatoxinas es inhibida por la luz, en cualquiera de las temperaturas bajas y altas, pero no para las temperaturas intermedias, entre 20 y 25°C.

✓ **El pH.** Durante el crecimiento de los hongos, el pH del sustrato puede fluctuar entre 4 y 5 como resultado de la actividad de los hongos. *A. flavus* y *A. parasiticus* son capaces de crecer sobre un amplio rango de valores de pH con un crecimiento óptimo en los rangos de 5 hasta 8 de pH. Sin embargo, la producción de aflatoxinas no ocurre de igual manera en todos los niveles de pH. Por lo tanto, mientras los hongos en general, pueden tolerar más condiciones ácidas, estas condiciones inhiben la producción de aflatoxinas (Mc Gee *et al* 1996).

✓ **Otros factores agronómicos.** El genotipo de maíz es un factor que podría influir en la síntesis de aflatoxinas. Por otro lado la cantidad de aflatoxinas se puede reducir cuando se modifican las fechas de siembra o de cosecha del cultivo del maíz, logrando evitar que las condiciones óptimas coincidan con la época crítica de contaminación de las mazorcas; esto puede lograrse adelantando las épocas de siembra y cosecha (Bucio, 1999). Por ultimo, la labranza del suelo y la rotación de cultivos tuvieron poco impacto sobre las poblaciones de *A. flavus* en el suelo; esto contradice otros estudios donde se reporta que en parcelas con monocultivo de maíz se recuperaron mayores poblaciones de *A. flavus* que en aquellos con rotación con el cultivo de soya (McGee *et al*, 1996).

4.8.5. Control de aflatoxinas

Es claro que la presencia de microorganismos causantes de micotoxinas en los granos y alimentos representa un peligro considerable. Las pérdidas económicas causadas por el rechazo de granos contaminados son considerables. Pero son más importantes las pérdidas no detectadas, debido a la reducción de la productividad en la explotación de animales. El mejor método para disminuir la contaminación de granos con micotoxinas, es la adopción de medidas preventivas para el control de hongos. Prácticamente, el único medio de combatir a las aflatoxinas, es el evitar el

crecimiento de los hongos productores, tanto en granos como en alimentos procesados; por lo tanto el combate de los hongos es particularmente importante. (Ortiz, 1992).

a) Control antes de la cosecha

La prevención mediante el control antes de la cosecha es el primer paso para asegurar un producto final inócuo. Aunque se reconoce desde hace tiempo que existe una conexión entre la contaminación por micotoxinas y unas condiciones inadecuadas de almacenamiento, los estudios han revelado que algunas semillas y granos se contaminan con micotoxinas en el campo. La invasión de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas ocurre frecuentemente en el campo, cuando el maíz es atacado por gusanos de la mazorca. Una vez infectado el cultivo en las condiciones reinantes en el campo, la proliferación de los hongos proseguirá durante las etapas posteriores y el almacenamiento. Por consiguiente, el control antes de la cosecha está orientado a afrontar factores críticos que potencian la producción de micotoxinas. Algunas de las principales estrategias utilizadas son las siguientes:

- ✓ Manejo adecuado de riego y el estado del suelo (la temperatura y una humedad relativa elevadas son esenciales para la germinación de las esporas y la proliferación fungosa). Utilizar variedades que se cosechen cuando no exista mucha lluvia o modificar la fecha de la siembra para que cuando se cultive, no haya mucha humedad.
- ✓ Manejo adecuado de los rastrojos o residuos agrícolas, destrucción de las malezas y residuos de la cosecha anterior (medio apropiado para la supervivencia de esporas de hongos) y rotación de los cultivos (prevención de la contaminación).
- ✓ Reducir al mínimo la infestación por insectos de los granos y prevención de daños mecánicos de los productos durante el cultivo y la cosecha (ayuda a prevenir la proliferación de *A. flavus* y *A. parasiticus* y la posterior producción de aflatoxinas).
- ✓ Emplear variedades de semillas resistentes (maíz resistente a las aflatoxinas). Las investigaciones en este campo están en estudio, pero se considera que el

empleo de variedades resistentes tendrá mucha importancia en el futuro, especialmente en aquellas que son resistentes al ataque de insectos de campo.

- ✓ Cosechar lo más rápido posible y evitar que el grano permanezca mucho tiempo en el campo (Andreson, 2006).

b) Control durante la cosecha

Durante la cosecha es importante controlar, entre otras cosas, si el producto agrícola se ha desarrollado en plazo previsto y si está limpio y seco. Este control es esencial para prevenir la formación de micotoxinas durante el almacenamiento. Algunos estudios han indicado que los cultivos que se dejan en el campo durante más tiempo presentan niveles más altos de contaminación por toxinas. También es esencial que el producto este suficientemente seco para evitar la proliferación de hongos durante el almacenamiento (Moreno, 2004).

c) Control después de la cosecha y descontaminación

Aunque la prevención del desarrollo de hongos toxigenitos es la mejor estrategia de control para prevenir la contaminación con aflatoxinas, es probable que terminará produciéndose una contaminación por micotoxinas. Por consiguiente, los procedimientos de control después de la cosecha y de descontaminación representan un medio importante para evitar la exposición de los consumidores. Se han propuesto varias estrategias de descontaminación para las diversas micotoxinas. Algunos métodos tradicionales de elaboración son útiles para separar físicamente las toxinas o para desactivarlas químicamente. Entre los criterios de reducción de las micotoxinas o de descontaminación se incluyen los siguientes:

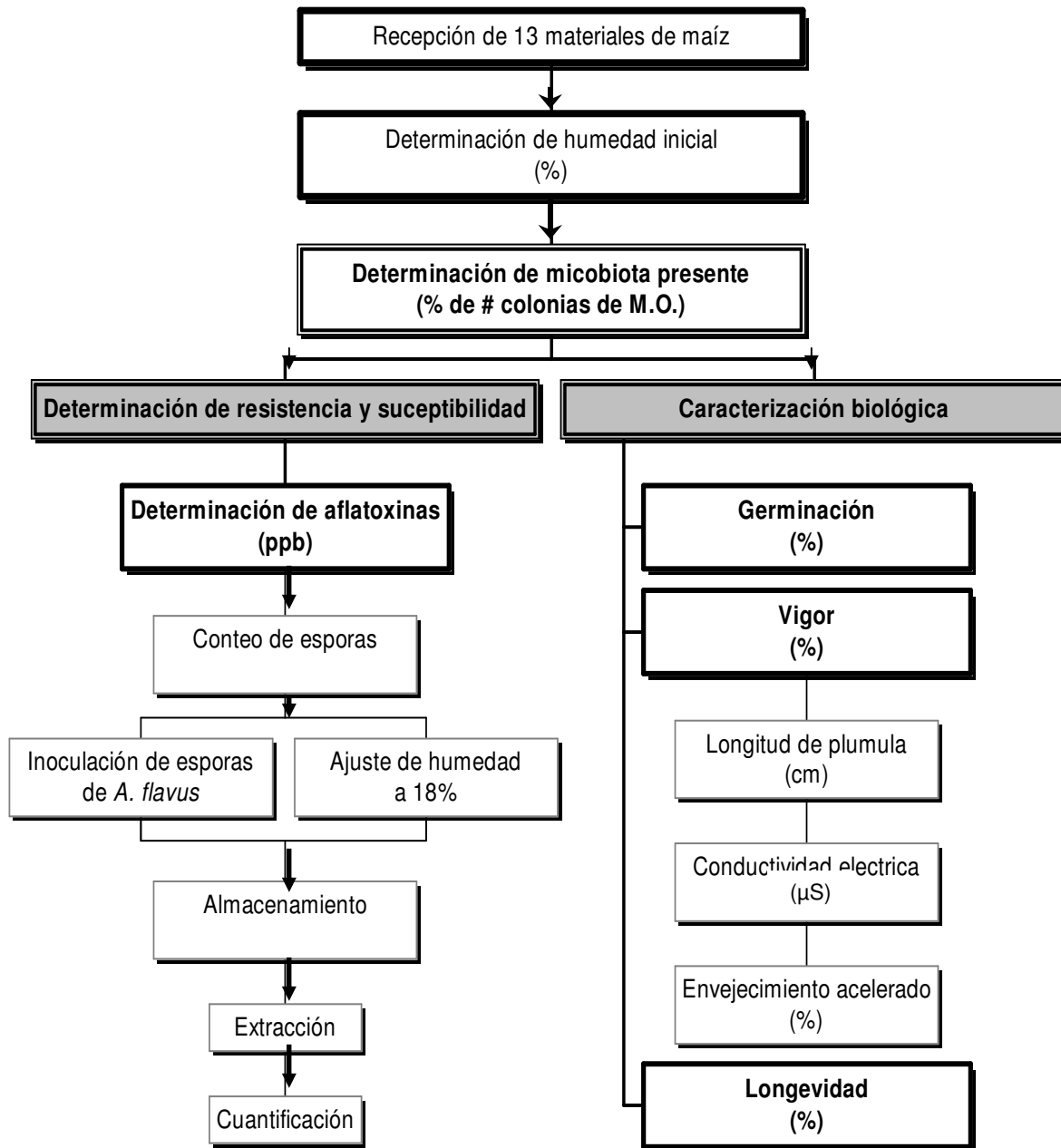
- ✓ Inactivar, destruir o eliminar las toxinas.
- ✓ No producir ni dejar residuos tóxicos en los alimentos/piensos.
- ✓ Conservar el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- ✓ No alterar de modo apreciable las propiedades tecnológicas del producto.
- ✓ Si es posible, destruir las esporas de los hongos. (Moreno, *et al* 1992).

d) Control durante el almacenamiento

- ✓ Limpiar cuidadosamente de sustancias extrañas el producto antes del secado y almacenamiento, ya que pueden contaminar con esporas al grano. Es importante no prolongar el tiempo de contacto del grano con las impurezas.
- ✓ Secar el grano lo más pronto posible después de la cosecha.
- ✓ Almacenar con contenidos de humedad mínimos que impidan el desarrollo de hongos en el almacén.
- ✓ Almacenar los productos bajo condiciones adecuadas. Las estructuras de almacenamiento deben de estar bien diseñadas y protegidas para no permitir la entrada del agua. Adicionalmente, deben estar limpias y en buen estado físico.
- ✓ Es necesario mantener el lugar del almacenamiento a temperaturas y humedades relativas desfavorables para el desarrollo de hongos.
- ✓ Los granos almacenados deben de estar secos, frescos y libres de insectos (Oirsa, 2003).

V MATERIALES Y MÉTODOS

Diagrama de flujo de metodología



5.1. El Lugar de experimentación

El trabajo de investigación se realizó en el 2007: consistió en la determinación de variables asociadas con la calidad fisiológica de la semilla; se efectuó en los laboratorios de la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2. Material biológico

Se utilizaron 13 diferentes materiales de semillas generadas y reproducidas en el ciclo agrícola 2005-2006, en el campo experimental Bajío ubicado en INIFAP, Celaya Gto. Estos genotipos arribaron al laboratorio de UNIGRAS, y se almacenaron en bolsas de polietileno a una temperatura de 7° C, hasta su utilización.

Los genotipos fueron:

Cuadro 6: Identificación de genotipos de maíz

Genotipo	Tipo de material	Origen de genotipo
UNIGRAS 1		Noreste
UNIGRAS 2		Bajío
UNIGRAS 3		Norte
UNIGRAS 4	Variedad sintética	
UNIGRAS 5		Bajío
UNIGRAS 6		Sureste
UNIGRAS 7		Noreste
UNIGRAS 8		Norte
UNIGRAS 9	Variedad sintética	
UNIGRAS 10	Línea QPM	
UNIGRAS 11	Colecta	Colecta
UNIGRAS 12		Centro
UNIGRAS 13		Bajío

5.3. Diseño experimental

Para todas las variables evaluadas: micobiota presente en la semillas, porcentaje de germinación, porcentaje de vigor por tres diferentes métodos (longitud de plúmula, envejecimiento acelerado y conductividad eléctrica) y longevidad; se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA); en los análisis de varianza donde existió diferencia significativa se llevó a cabo la comparación de medias de Tukey, el número de repeticiones de cada prueba de calidad de semilla, cambió acorde a la metodología que se utilizó para evaluarlas según la ISTA (1999) y AOSA (1995).

Para determinar si existe relación entre las variables evaluadas con respecto a la producción de aflatoxinas, se realizó regresión lineal, para obtener el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2).

El programa estadístico que se utilizó en los análisis de varianza y comparación de medias fue el SAS System 2000 versión 8.1; y para regresión lineal se utilizó el programa GraphPad InStat versión 3.0.

Transformación de datos

Los resultados observados de las variables aflatoxinas y micobiota; se transformaron por el método de $\log(x+1)$; utilizando la siguiente fórmula matemática.

$$Y = \log(x+1)$$

Donde: Y = valor de la variable transformada, \log = logaritmo y X = valor de la variable observada

La transformación de datos, donde la desviación estándar es proporcional a la media, a nuevas escalas, se realizó para que el análisis de varianza sea válido; ya que, si los datos no tienen una distribución normal, violan supuestos del análisis de varianza.

5.4. Experimentación

5.4.1. Porcentaje de humedad inicial en maíz (CH)

La determinación del porcentaje de humedad en las semillas se basó en las reglas internacionales aprobadas por la ISTA (1996). El método que se utilizó fue el secado por estufa, el cual es oficial para maíz entero del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y de la American Association of Cereal Chemists.

De acuerdo a la ISTA (1996) se pesaron, por duplicado, de 4 a 10 gramos de semilla de maíz en cajas de aluminio de 5 cm de diámetro y de 1.5 a 3.0 cm de altura, con tapas ajustadas para evitar la pérdida o ganancia de humedad (previamente pesadas) todo esto en una balanza con precisión de milésimas. Una vez realizado el pesaje, se destaparon las cajas y se colocaron dentro de la estufa de circulación forzada de aire calibrada a $103 \pm 2^\circ \text{C}$ por un periodo de 72 horas; el tiempo de secado comenzó cuando la temperatura se estableció en los 103°C , después de meter las cajas. Transcurrido el tiempo de secado, se taparon y se colocaron rápidamente en un desecador durante 30-45 minutos, para permitir que se enfriaran y después ser pesadas sin ganar humedad.

El contenido de humedad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (en \%)} = \frac{P_i - P_f}{P_f} \times 100$$

Donde: P_i = peso de la muestra antes del secado (g) y P_f = peso de la muestra después del secado (g)

5.4.2. Determinación de micobiota

Para la determinación del porcentaje de micobiota presente en las semillas se requirieron 300 semillas de la fracción de semilla pura, tomadas de la muestra representativa sometida a la prueba, se colocaron 2 repeticiones de 15 semillas cada una en MSA y 2 en PDA de cada material.

Para esta determinación se prepararon medios de cultivo MSA (Malta Sal Agar). Para la preparación de este medio se colocaron 20 g de extracto de malta, 20 g de agar y 40 g de cloruro de sodio, todo esto aforado a un litro con agua destilada en un matraz; y PDA (Papa Dextrosa Agar) utilizando 20 g de extracto de papa, 20 g de dextrosa y 20 g de agar, los dos medios aforados a un litro de agua destilada.

Estos medios de cultivo se esterilizaron durante 20 minutos a 15 libras de presión, después se dejaron enfriar y se vertieron en cajas petri estándar (90 mm de diámetro) conteniendo aproximadamente 15 ml de medio.

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas y agitándolas con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante dos minutos, después se quitó el exceso del desinfectante colocando las semillas en toallas de papel previamente esterilizadas, a continuación se colocaron espaciadas en la superficie de las cajas de petri con los medios de cultivo MSA y PDA ya solidificados; esto se realizó dentro de un ambiente estéril. Posteriormente se colocaron en incubación a una temperatura de 25°C durante 7 días. Después del periodo de incubación la muestra de trabajo se examinó para buscar la presencia de organismos causantes de enfermedades y disturbios fisiológicos en las semillas. Se pudieron valorar aspectos morfológicos macroscópicos y microscópicos de las colonias de hongos desarrollados.

Los resultados se expresaron como porcentaje por número de semillas afectadas de la muestra examinada además de la identificación de los géneros de hongos desarrollados (Moreno, 1996).

5.4.3. Análisis de aflatoxinas

a. Inoculación de *Aspergillus flavus*.

Para esta prueba se utilizó la cepa *A. flavus* UNIGRAS-25. A partir del medio de cultivo Czapek, se obtuvo una porción de agar con la cepa del hongo con un sacabocado del número 2 que se colocó en un tubo de ensaye con 100 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.05 %, este se agitó para que se homogenizaran las esporas en el agua. En seguida se realizó el conteo de esporas (aproximadamente 250,000 esporas por mL) con la cámara de Neubauer (French y Teddy, 1982). Esta suspensión con esporas se empleó para inocular el maíz.

Se trabajó con una muestra de 150 g de semilla de cada genotipo, que fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min, después las semillas se secaron en una campana de flujo laminar, para evitar su contaminación; en seguida, fueron colocadas en frascos esterilizados de 250 ml. Se determinó el contenido de humedad inicial de la semilla, posteriormente se ajustó la misma a 18 % (final) mediante la adición de agua destilada estéril hasta alcanzar la humedad deseada (Pixtón, 1982), se inoculó al mismo tiempo con la suspensión de esporas.

Se prepararon cámaras húmedas en cajas de plástico con tapadera, en las cuales se colocó una solución saturada de cloruro de potasio (KCl) (2000 mL de agua con 500grs de KCl) para conservar la humedad en 18 %. Dentro de las cámaras húmedas se colocaron frascos de 50 g (cada muestra se dividió en tres partes iguales para su manejo) de semillas inoculadas para almacenarse a una temperatura de 27°C durante 14 días con el objeto de promover el desarrollo óptimo del hongo y la subsecuente producción de aflatoxinas.

b. Determinación de aflatoxinas totales

Para la determinación de aflatoxinas totales, se procedió de acuerdo al método 991.31 de la AOAC (1995). (Aplicable para la determinación de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 a concentraciones mayores, o iguales, a 10 ppb en maíz o crema de cacahuete) citado por Moreno (2004).

Se pesaron 50 g de maíz de cada muestra, 5 g de sal (NaCl) estos se colocaron en un vaso de licuadora y se molieron durante 1 min a alta velocidad. Enseguida se añadieron 100 ml de metanol-agua (80:20) y se molió por 1 min a alta velocidad. El extracto se vació en un embudo con papel filtro Whatman[®] No. 1 aflautado para recolectar el filtrado en una probeta de 100 ml.

Del extracto filtrado se tomaron 10 ml y se colocaron en un vaso de precipitado con 40 ml de agua destilada. Se mezcló bien. El extracto diluido se pasó por un filtro de fibra de vidrio y se colectó el filtrado en un vaso de precipitado. Se pasaron 10 mL de este último (10 ml=1.0 g muestra equivalente) a través de una columna de afinidad AflaTest-P[®] con anticuerpos monoclonales a una velocidad de una a dos gotas por segundo. Se pasaron 10 ml de agua destilada a través de la columna en una proporción de dos gotas por segundo.

Se repitió el paso anterior. Se eluyó en la columna de afinidad, pasando a través de el 1 mL de metanol grado HPLC a través de la columna, en una proporción de una a dos gotas por segundo y se colectó la muestra eluída (1 ml) en una cubeta de vidrio. Se añadió 1.0 ml del revelador AflaTest para eluir en la cubeta. Se mezcló bien y se colocó la cubeta en el fluorómetro marca VICAM[®] serie 4 calibrado previamente y, se leyó la concentración de aflatoxinas después de 60 segundos. Los resultados de aflatoxinas se expresan en partes por billón (ppb).

5.4.4. Germinación

La prueba de germinación se llevó a cabo con una fracción de la muestra representativa de cada material considerada como semilla pura. Se realizó la prueba de germinación por medio de rollos de germinación. De la semilla pura, previamente homogeneizada, se tomaron 400 semillas al azar en 8 repeticiones de 50 semillas cada una, se distribuyeron alternadamente para evitar la aglomeración y contaminación por microorganismos que pudieran alterar los resultados. Las semillas se colocaron en el sustrato (entre hojas de papel absorbente húmedo), y se enrolló en “muñecas” que se colocaron en forma vertical dentro de bolsas plásticas con perforaciones para evitar el exceso de humedad, se colocaron dentro de una cámara de germinación a una temperatura de 27° C durante siete días.

Evaluación de las plántulas

Basados en los parámetros que menciona la Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983) se efectuaron dos conteos de plántulas, registrando las plántulas normales, anormales, así como semillas muertas y duras. Siendo una plántula normal aquella que reúne las características esenciales, tanto fisiológicas como morfológicas para producir una plántula normal. A continuación se describen las características que se tomaron en cuenta durante su evaluación (Moreno, 1996):

Plántulas normales:

- | | |
|---------|--|
| Raíz | a) Raíz primaria vigorosa, generalmente con raíces adventicias.
b) Sin raíz primaria vigorosa, pero al menos con dos raíces adventicias vigorosas. |
| Plúmula | a) Hoja verde vigorosa, no muy dividida y que se extiende más allá de la mitad dentro del coleóptilo, el cual puede o no estar dividido.
b) Plúmula retorcida o enroscada limitada por la cubierta dura de la semilla, considerando que la plúmula no esté deteriorada. |

Plántulas anormales:

- Raíz
- a) Sin raíces.
 - b) Sin raíz primaria, solamente raíces adventicias cortas y débiles.
- Plúmula
- a) Sin hoja verde, sólo coleóptilo incoloro.
 - b) Hoja extendiéndose a menos de la mitad dentro del coleóptilo.
 - c) Hoja muy fragmentada o dividida longitudinalmente (el coleóptilo puede o no estar dividido).
 - d) Plúmula pálida, delgada o en forma de huso (generalmente asociada con el deterioro de la semilla).
 - e) Plúmula deteriorada en el punto de unión de la semilla, considerando que esto no es resultado de condiciones de prueba inadecuadas (escutelo generalmente deteriorado).
 - f) Hoja completamente blanca (albina).

Calculo del porcentaje de germinación.

Con el promedio de las cuatro repeticiones de 50 semillas cada una, se calculó y registró el porcentaje de germinación señalando el porcentaje de semillas muertas, duras y plántulas anormales con base en los parámetros que menciona la AOAC (1995).

5.4.5. Vigor

5.4.5.1. Vigor por longitud de plúmula

Se realizaron tacos de germinación para evaluar la longitud de la plúmula. La prueba consistió en colocar las semillas en papel absorbente para germinación a la mitad de las hojas de papel, en su eje de 30 cm, se marco una línea. Igualmente se marcaron cinco líneas paralelas a la línea central con una distancia de 2 cm de línea a línea,

las cuales se dibujaron en la parte superior de la hoja. Sobre la línea central se marcaron 25 puntos con 1 cm de distancia, y se pegó una semilla en cada punto. Para pegar las semillas se utilizó, goma de látex no tóxica. Los embriones de las semillas quedaron hacia el lado contrario del papel y con la plúmula apuntando hacia arriba, en ángulos rectos respecto a las líneas horizontales. Se prepararon cuatro repeticiones con 25 semillas cada una por material. Las “muñecas” se prepararon con 4 hojas de papel, dos debajo de las semillas y dos cubriéndolas. Una vez que se cubrieron las semillas con las toallas húmedas, se doblo hacia arriba una franja de 2 cm de la parte basal, para luego enrollar las hojas en sentido perpendicular a las líneas horizontales. La “muñeca” se sujetó mediante una banda de hule, manteniéndose verticalmente sin ningún sostén. Las “muñecas se colocaron en cajas de plástico dentro de una incubadora a 27° C sin luz y con alta humedad relativa. La prueba duro siete días (AOSA, 1983).

Al final de la prueba, siete días después, se hizo el recuento de las plúmulas de las plántulas normales localizadas entre cada par de líneas paralelas. Las plántulas anormales se eliminaron. A cada punto medio entre dos líneas paralelas se dio el valor correspondiente a la distancia en centímetros de la línea central; así el punto medio entre la línea central y la primera línea paralela adquiere el valor de 1, el segundo es 3 y los siguientes 5, 7 y 11 y 15 respectivamente. El número de plúmulas que quedó entre dos paralelas se multiplicó por el valor medio de dichas paralelas y los productos se sumaron. La longitud total se dividió entre el número de semillas que se utilizaron para el cálculo (Moreno, 1996). Utilizando la siguiente formula:

$$L = \frac{(nx_1 + nx_3 + \dots + nx_{15})}{25}$$

Donde: L = longitud de plúmulas, n = número de plúmulas entre cada par de paralelas y x = la distancia media desde la línea central.

5.4.5.2. Vigor por envejecimiento acelerado

Esta prueba se fundamenta en someter a las semillas a condiciones totalmente opuestas a un buen almacenamiento, en cámaras especiales de envejecimiento acelerado. Luego, las semillas se sometieron a una prueba de germinación estándar durante siete días en cámaras de germinación y se evaluaron las semillas germinadas en normales y anormales, según el criterio ISTA (1996). El resultado se expreso como porcentaje de semillas vigorosas.

Lotes de 400 semillas de cada material se colocaron en canastillas de plástico y se asentaron en una malla sin permitir el contacto del agua con las semillas dentro de cámaras de plástico completamente herméticas, esto con el fin de tener una humedad relativa cercana al 100%, y se colocaron en la incubadora a 40° C, durante 96 hrs. Al término del tiempo de estrés de las semillas, a cada uno de los materiales se les realizó la prueba de germinación estándar, tal y como se menciona en el punto 5.4.4. Para la evaluación de la prueba de vigor por este método sólo se considero a las plántulas normales de cada repetición. El valor medio se expresó en unidades porcentuales.

5.4.5.3. Vigor por medición de la conductividad eléctrica

Esta prueba consiste en colocar un grupo de semillas en agua, a una temperatura y durante un tiempo determinados. Enseguida se mide la conductividad eléctrica de la solución que contenía las semillas.

Para el desarrollo de la prueba se adaptó el método descrito por Moreno (1996) para maíz. Cinco semillas por material con cuatro repeticiones, fueron colocadas en tubos de plástico con 20 ml de agua destilada. Los tubos conteniendo las semillas y el agua se taparon para evitar la contaminación con polvo y reducir la evaporación. Los tubos se colocaron en una incubadora a 30° C durante 24 horas. Además, para cada repetición se preparó un vaso control que contenía únicamente agua destilada. Las

mediciones fueron realizadas en un equipo Conductronic PC45[®], el cual se calibró con una solución de 1413 μS (micro siemens a 25^o C). Primero se separó el agua que contenía a las semillas, y ésta se paso a otro vaso, en esta agua se midió la conductividad eléctrica. Antes de cada medición se enjuagó el conductivímetro con la solución control para evitar contaminaciones.

5.4.6. Longevidad

Esta prueba es una modificación de la prueba de envejecimiento acelerado, se diferencia únicamente en reemplazar el agua destilada, utilizada para crear un ambiente con 100% de humedad relativa durante el envejecimiento de semillas, por agua destilada saturada con cloruro de sodio (NaCl) que permita disminuir la humedad a la que las semillas son expuestas. Esta sal disminuye el potencial osmótico del agua y, por lo tanto, reduce la humedad relativa del aire que rodea a las semillas durante el envejecimiento, a un 15% (Copeland y McDonald, 2001). La sal no produce daño alguno en las semillas, ya que no se encuentran en contacto con el producto (Virgen, 1983).

Las semillas se colocaron en micro cámaras con soluciones sobresaturadas, 1.5 L de agua con 1.6 k de NaCl; estas fueron colocadas en una incubadora a 27^o C durante 90 días, al término de los cuales fueron retiradas y se procedió a realizar una prueba de germinación estándar. Se realizaron cuatro repeticiones de 50 semillas cada una, de cada material.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron de los experimentos realizados en esta investigación se muestran en los cuadros y graficas que a continuación se presentan. En los cuadros como en las gráficas se muestran las medias correspondientes de las repeticiones que en cada prueba se establecieron como unidades experimentales.

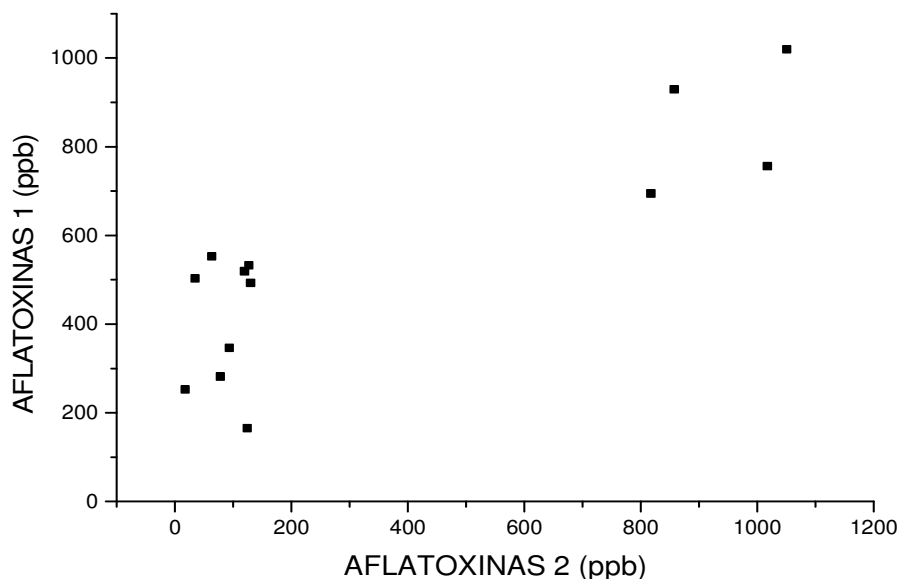
Con el propósito de determinar si existe asociación entre algunas características biológicas de las semillas y su tolerancia a la contaminación con aflatoxinas y con base a los resultados obtenidos, se calculó por medio de regresión lineal, el coeficiente de relación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) entre todas las variables, contra la contaminación por aflatoxinas. El valor r puede interpretarse como la proporción de la primera variable que puede atribuirse a la varianza de la segunda. Para los cálculos de r y r^2 se consideraron 13 pares de datos en cada prueba.

6.1. Aflatoxinas

En el caso de las aflatoxinas, para clasificar los materiales como resistentes y susceptibles, los maíces fueron inoculados con esporas de *A. flavus* e incubados como ya se señaló en Materiales y Métodos y después sometidos a una cuantificación de aflatoxinas, con el fin de observar si hay una relación entre las características biológicas de las semillas y la infección por el hongo con la consecuente producción de aflatoxinas. Asimismo, se compararon datos de pruebas previamente reportados en el año 2006 (Cobielles, 2007) quien clasificó los mismos genotipos en resistentes y susceptibles basado en los resultados de la prueba de aflatoxinas, los cuales utilizamos en comparación con los resultados de este trabajo (figura 3). Para eso se realizó la segunda prueba a los maíces seleccionados como resistentes y susceptibles como se puede ver en el Cuadro 7.

Los niveles de aflatoxinas totales en los maíces tuvieron un rango desde las 20 ppb en el maíz UNIGRAS 1 y 1053 ppb en el UNIGRAS 10, ambos de la prueba del 2006; en la segunda prueba del 2007 se tuvieron desde 250 ppb en el UNIGRAS 1 y de 1016 ppb en el UNIGRAS 10 (Cuadro 7). Estos resultados son muy significativos del comportamiento de los maíces, tanto resistentes y como susceptibles, ya que si bien las concentraciones de aflatoxinas son diferentes en cada prueba, los mismos maíces se comportan como resistentes y como susceptibles en las dos pruebas. Lo anterior es de gran importancia para el mejoramiento genético del maíz; como maíces de donde se pueden derivar líneas resistentes a la contaminación con aflatoxinas, las que se pueden incorporar a maíces con características agronómicas deseadas.

Figura 3: Correlación lineal de 2 pruebas, en 2006 y 2007, de producción de aflatoxinas en 13 genotipos de maíz.



Se encontraron diferencias altamente significativas (** $P \leq 0.01$) en ambas pruebas de cuantificación de aflatoxinas, entre el grupo de materiales seleccionados como resistentes con el grupo seleccionado como susceptibles a la infección del grano por *A. flavus* y a la producción de aflatoxinas.

Además de que con la correlación lineal nos permite decir que los materiales se comportaron nuevamente como resistentes y susceptibles con un coeficientes de correlación (r) de 0.8488 y coeficiente de determinación de $r^2 = 0.7205$ quiere decir que fue significativo y que hubo una relación alta entre la prueba realizada en este trabajo y la que realizo Cobielles 2007.

En el Cuadro 7 se observa que existen diferencias entre las concentraciones de aflatoxinas expresadas en ppb; los resultados de estas pruebas del contenido de aflatoxinas permitieron su clasificación como resistentes los materiales con contenido de aflatoxinas menores de 200 ppb , y susceptibles las de mayor a 800 ppb en la primera prueba. existiendo una alta correlación con la segunda prueba; corroborando con esto la susceptibilidad y la resistencia de los respectivos materiales evaluados. Considerándose a los genotipos sombreados 4, 10, 11, y 12, como susceptibles.

Cuadro 7. Comparación de medias de dos pruebas de aflatoxinas en maíces (ppb).

Material	1ª prueba	2ª prueba
UNIGRAS 1	20.3	250.0
UNIGRAS 2	126.7	162.3
UNIGRAS 3	80.7	279.0
UNIGRAS 4	1020.0	753.3
UNIGRAS 5	129.4	530.0
UNIGRAS 6	132.7	490.0
UNIGRAS 7	37.0	500.0
UNIGRAS 8	122.0	516.7
UNIGRAS 9	66.0	550.0
UNIGRAS 10	1053.3	1016.7
UNIGRAS 11	860.0	926.7
UNIGRAS 12	820.0	691.7
UNIGRAS 13	96.0	343.3

*Materiales sombreados susceptibles a contaminación por aflatoxinas; no sombreados resistentes.

En el Cuadro 8 se muestran los nueve genotipos que se clasificaron como resistentes; observamos que son de diferentes regiones de producción, lo que apoya la hipótesis de que se cuenta con fuentes de resistencia a las aflatoxinas.

Cuadro 8. Comparación de medias de maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas en análisis de micobiota, germinación, vigor, y longevidad.

Genotipo	AFLA. ppb	MICOBIOTA		GERM. %	VIGOR			LONG. cm
		PDA	MSA		Long. P.	E.A.	C.E.	
UNIGRAS 1	250c	96.5a	53.5ab	99a	14.25abc	49.5ab	111.5ab	98.5a
UNIGRAS 2	162.3c	93.5ab	76.5 a	89bc	14.25abc	44ab	139.5a	91abc
UNIGRAS 3	279c	40f	30b	91.5abc	15a	43.5ab	103.75ab	94ab
UNIGRAS 4	753.3ab	86.5abc	56.5ab	96abc	15a	20.5d	103ab	94ab
UNIGRAS 5	530abc	70bcde	60ab	88.5c	14.25abc	33bcd	113ab	87ab
UNIGRAS 6	490abc	63.5cdef	27b	93.5abc	14.75ab	26cd	120.5ab	81.5c
UNIGRAS 7	500abc	53ef	23.5b	97.5ab	15a	45.5ab	78.5b	97.5a
UNIGRAS 8	516.7abc	43.5f	30b	98a	13.75a	53a	89b	
UNIGRAS 9	550abc	80abcd	27b	98.5a	14.75a	37abcd	77.5b	93ab
UNIGRAS 10	1016.7a	47ef	33.5b	99a	14.75a	47.5ab	77b	96.5ab
UNIGRAS 11	926.7ab	56.5edf	27b	99.5a	14.5abc	43ab	78.5b	98.5a
UNIGRAS 12	691.7ab	70bcde	43.5ab	95.5abc	13.5c	25.5cd	114ab	91.5abc
UNIGRAS 13	343.3bc	70bcde	36.5ab	93.5abc	15a	41abc	122.25ab	95ab
HSD	611.03	40.797	25.085	8.798	10.746	16.619	50.367	10.159
SIGNIFICANCIA	**	**	**	**	**	**	**	**
COEF. VAR	38,191	9,369	25,778	3,704	2,970	17,030	20,366	15.4

*Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia significativa con Tukey, $\alpha=0.05$; **altamente significativo al 0.01; HSD Diferencia mínima significativa honesta (Tukey), COEF. VAR. = Coeficiente de variación, AFLA. = Aflatoxinas, PDA = Papa Dextrosa Agar, MSA = Malta Sal Agar, GERM.= Germinación, Long. P. = Longitud de plúmula, E.A.= Envejecimiento Acelerado, C.E. = Conductividad Eléctrica, LONG. = Longevidad. Materiales sombreados susceptibles a contaminación por aflatoxinas; no sombreados resistentes.

6.2. Micobiota

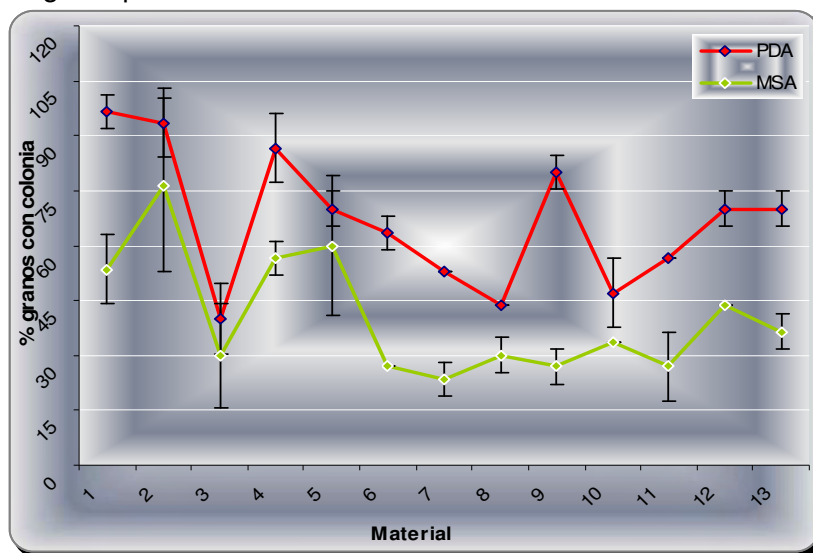
En la Figura 4, se muestra la media de los porcentajes de colonias desarrolladas, se muestra el error estándar, a través del cual se aprecia la variación de resultados dentro de repeticiones de un mismo genotipo. Esto debido probablemente a que aunque son materiales de distintas regiones, estos son incrementados en una misma localidad, por que se encontró que el 100% de colonias identificadas fueron del genero *Fusarium* spp., el cual es sistémico y se transmite por semilla aislándose, en todos los genotipos; independientemente del medio de cultivo en el que se realizó la evaluación, PDA ó MSA. El desarrollo de

Fusarium spp. en los materiales evaluados es normal, si se considera que fueron incrementados en la localidad de Celaya, Gto.; en donde las enfermedades relacionadas con *Fusarium* spp. son un serio problema y además este hongo es un organismo íntimamente ligado al maíz, en todas las regiones del mundo donde se cultiva esta gramínea .

Los resultados del análisis estadístico de regresión lineal indican para PDA y para MSA coeficientes de correlación muy similares de $r = -0.3456$ y de -0.3430 , respectivamente. Esto significa que la contaminación con aflatoxinas no está relacionada por la presencia de los hongos detectados en las semillas, en este caso el hongo *Fusarium* sp.

La micobiota presente en los distintos materiales presenta una relación prácticamente nula con la producción de aflatoxinas. La relación r^2 entre ambas variables se presenta solo en un 0.1194 y 0.1177 para PDA y MSA, respectivamente; indicado por el coeficiente de determinación, no obstante dicha relación no es significativa.

Figura 4. Porcentaje de colonias de *Fusarium* sp. desarrolladas en placas de MSA y PDA en 13 genotipos de maíz.



6.3. Germinación

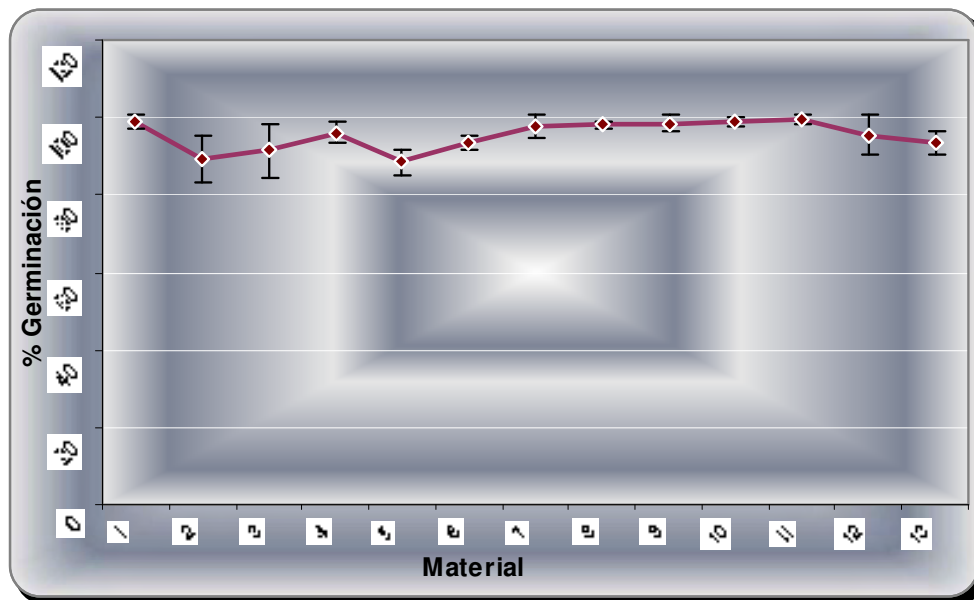
En el Cuadro 8 se observan las comparaciones de medias de la variable de germinación estándar, con sus respectivas desviaciones estándar; se formaron tres grupos con porcentajes de germinación de 99.5 a 88.5 (Tukey, $\alpha=0.05$). El coeficiente de variación fue bajo (3.704 %) para la variable; lo que indica alta confiabilidad en los datos obtenidos. Por otra parte, indica cierta relación inversa a la hipótesis planteada entre la respuesta de alta germinación versus baja producción de aflatoxinas. Sin embargo se tuvieron resultados altamente significativos (** $P\leq 0.01$), entre los genotipos evaluados, en cuanto a la germinación (Cuadro 8).

En la Figura 5 se observa que el porcentaje promedio de germinación de todos los materiales fue mayor a 85 %. En el grupo seleccionado como susceptible fue 3.2 % superior que el grupo seleccionado como resistente, mostrando valores mayores a 95 % mientras que el grupo de materiales resistentes reflejó una variación amplia, registrándose aquí el material de menor porcentaje de germinación siendo el maíz 5 con un 88.5% al mismo tiempo que el genotipo 1 resultó con 99 % de germinación. Así podemos mencionar que: la resistencia o susceptibilidad a la invasión por *A. Flavus* y subsecuentemente a producción de aflatoxinas, parece no estar necesariamente relacionada con altas o bajas germinaciones.

La ISTA (1999) menciona que dependiendo del tiempo y las condiciones en que las semillas son almacenadas, su calidad tiende a disminuir y que el primer componente que muestra señales de deterioro es el vigor, pero esto no es detectado de manera determinante por la prueba de germinación estándar en los primeros estados de deterioro ya que el objetivo de esta prueba es determinar el máximo potencial germinativo, entonces la variación en el porcentaje de germinación, aunado a las diferencias altamente significativas (** $P\leq 0.01$) entre los 13 genotipos (Cuadro 8) refleja en cierta medida el potencial de almacenamiento de cada uno de los materiales. No obstante el alto porcentaje de germinación

puede ser debido a que son materiales de cosecha reciente, por lo que pueden considerarse como materiales especialmente vigorosos.

Figura 5. Porcentaje de germinación en 13 genotipos de maíz.



Así que en esta prueba no es posible definir si existe alguna relación entre las dos variables estudiadas, ya que el análisis estadístico resultó que el coeficiente de correlación obtenido fue, positivo pero bajo entre el grupo seleccionado como resistente y el grupo seleccionado como susceptible a la infección del grano por *A. flavus* (Cuadro 8) siendo el valor de $r = 0.5348$ y $r^2 = 0.2860$. Marcando una baja correlación entre el porcentaje de germinación y la contaminación con aflatoxinas.

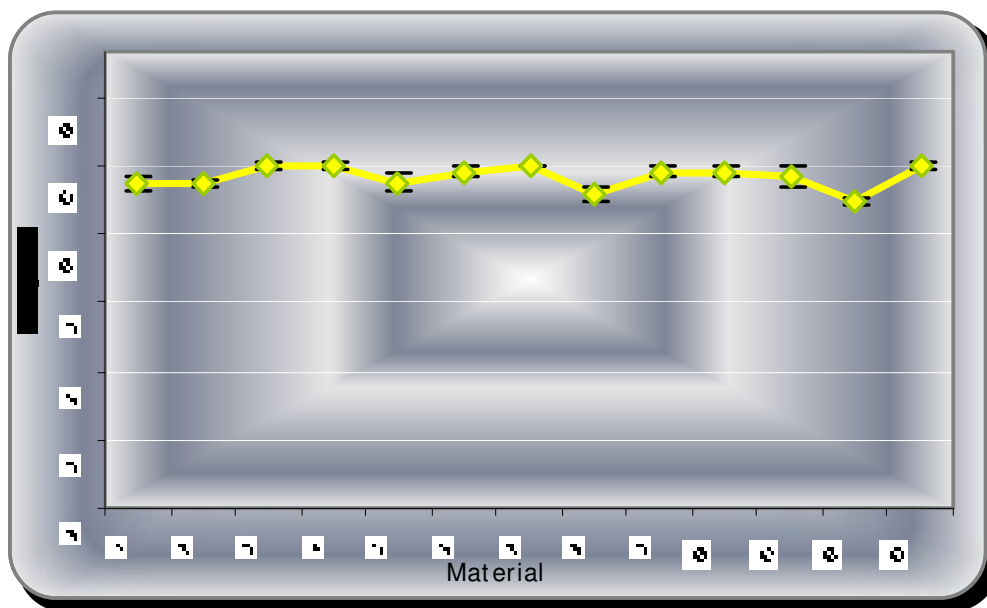
6.4. Vigor

Con el propósito de determinar si existe asociación entre vigor de las semillas y su tolerancia a la contaminación con aflatoxinas; se realizaron pruebas de longitud de plúmula, envejecimiento acelerado y conductividad eléctrica, descritas en la sección de Materiales y Métodos.

6.4.1. Vigor mediante la prueba de Longitud de Plúmula

En el cuadro 8 se muestra la comparación de medias en la prueba vigor por longitud de plúmula donde se obtuvieron diferencias altamente significativas (** $P \leq 0.01$) entre los 13 genotipos, el coeficiente de variación fue bajo de 2.9 %, lo que indica alta confiabilidad en los datos obtenidos. Se formaron cuatro grupos en los que se observa que los genotipos 3, 7, 8, 9, 13 y los genotipos 4, 10, dentro del grupo de susceptibles y de resistentes, respectivamente; los valores mostrados de las plúmulas, fueron de 15 cm indicando alto vigor, mientras que el genotipo 12 fue 13.5 cm y se ubicó como de bajo vigor (Figura 6).

Figura 6. Longitud media de plúmula (cm) 13 genotipos de maíz.



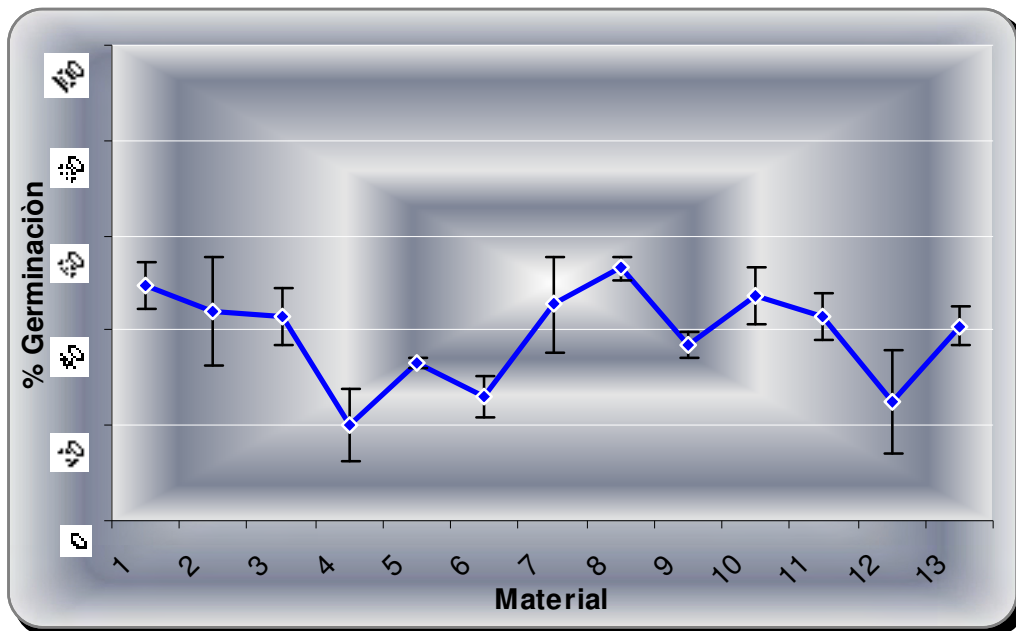
Los datos obtenidos en esta prueba, no sugieren una relación directa de la contaminación de aflatoxinas con el vigor, por el método de longitud de la plúmula, en genotipos resistentes a contaminación por aflatoxinas manteniéndose estadísticamente iguales las longitudes de plúmulas con respecto a los genotipos susceptibles. Derivado esto, el análisis estadístico reflejó un coeficiente de correlación de $r = 0.001565$ y un coeficiente de determinación de $r^2 = 2.456$. Lo cual indica una nula relación entre las variables de aflatoxinas y longitud de

plúmula. Estos resultados se pueden atribuir a que en las primeras etapas de deterioro, las diferencias en cuanto a vigor no se manifiestan fácilmente en materiales de reciente cosecha.

6.4.2. Vigor mediante la prueba de Envejecimiento Acelerado (EA)

Según Delouch (1973) esta prueba surgió bajo el supuesto de que los procesos de deterioro en la semilla sometida a condiciones de envejecimiento acelerado son similares a aquellos que ocurren en condiciones normales, variando únicamente la tasa de deterioro al incrementarse significativamente por las condiciones del envejecimiento. La hipótesis de esta prueba se basa en que los lotes de semilla que mantienen buena germinación durante el envejecimiento, son buenos resistentes para el almacenamiento, mientras que aquellos que reducen sustancialmente su germinación, son deficientes para el almacenamiento. De esta forma, los resultados pueden ser utilizados para clasificar lotes de semillas según su vigor y para la toma de decisiones en cuanto a la capacidad de almacenamiento o potencial de siembra de cada lote de semillas.

Figura 7. Porcentaje de germinación de 13 genotipos de maíz sometidos a Envejecimiento Acelerado.



En la prueba de envejecimiento acelerado se presentan los resultados como comparación de medias expresadas como porcentajes de semillas con germinación normal, observándose la formación de cuatro grupos de genotipos y diferencias altamente significativas entre los genotipos, en el análisis de varianza (** $P < 0.01$), el coeficiente de variación fue de 17.030; para esta variable se realizó la transformación de datos por medio de $\log(X+1)$, para dar cumplimiento al supuesto del análisis de varianza; ya que este tipo de datos no tuvieron una distribución normal (Cuadro 8). En la Figura 7 se observa un valor de 53 % en el genotipo 8 ubicado dentro del grupo de materiales resistentes mientras que el 4 del grupo de susceptibles presentó el valor más bajo con 20.5% de germinación después de haber sido sometidas al estrés. Al respecto Tekrony (1995) mencionado por Villaseñor (1984) señala que los lotes de semillas que presentan germinación, superior al 80 % después del EA, pueden ser clasificados como de vigor alto, entre 60-80 % como vigor medio y menores de 60 % como vigor bajo; basados en lo anterior los 13 genotipos evaluados se consideran de bajo vigor en esta prueba; Lo que parece indicar que puede indicarnos que la habilidad de soportar el deterioro en el proceso de envejecimiento acelerado, puede no estar asociada con factores que determinan la resistencia a la infección del grano causada por *A. flavus*.

En el análisis de regresión lineal el coeficiente de correlación fue de $r = -0.2197$ junto con el coeficiente de determinación $r^2 = 0.0482$ nos indica que no existe relación entre estas dos variables lo cual se puede observar en la Figura 8.

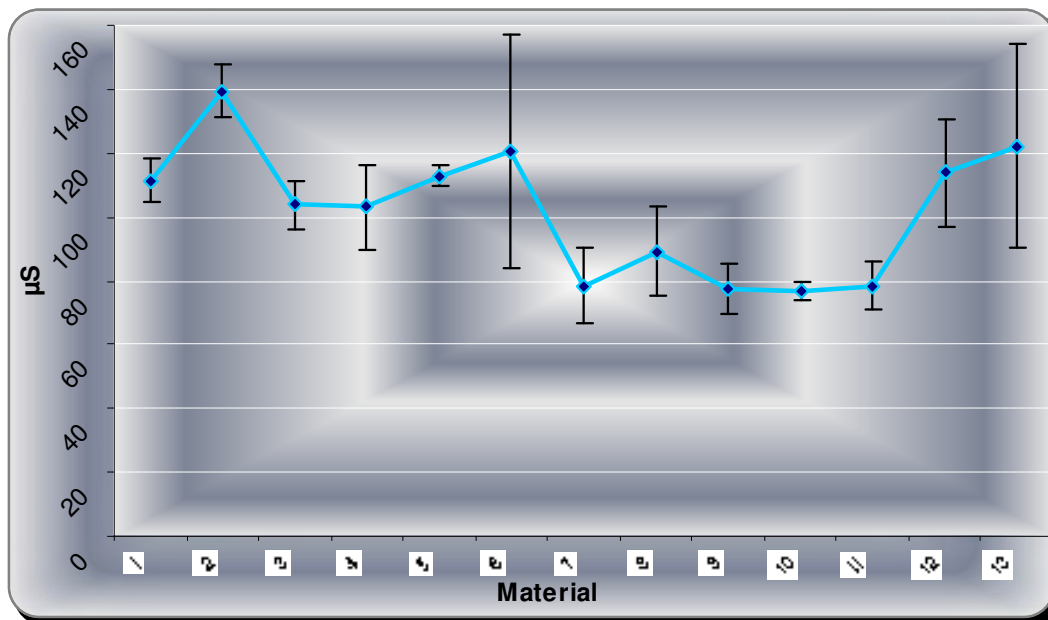
6.4.3. Vigor mediante la prueba de Conductividad Eléctrica (CE)

Powell (1988) mencionado por García (2007) consideró que la integridad de las membranas celulares determinada por los cambios bioquímicos deteriorativos y la capacidad para reorganizar y reparar daños de las membranas celulares, puede ser considerada la causa fundamental de las diferencias en el vigor de las semillas, que son medidas en forma indirecta a través de la lixiviación de

electrólitos durante la prueba de conductividad eléctrica. La prueba de conductividad eléctrica se reporta en $\mu\text{Siemens/cm}$. Los lotes de semillas que muestran una elevada germinación en laboratorio, pero liberan grandes cantidades de electrólitos, luego de la inmersión en agua, son considerados de bajo vigor, presentando el lote de semillas un bajo desempeño en condiciones de estrés en el campo. Contrariamente, lotes con una alta germinación y baja liberación de electrólitos son considerados de alto vigor y con mejor capacidad para soportar condiciones de estrés al momento de germinar en el campo.

Además, el deterioro podría estar asociado con una pérdida en la capacidad de almacenamiento y menor habilidad para resistir enfermedades infecciosas (Copeland y McDonald, 2001), ya que las células dañadas producen compuestos que son buenos sustratos para el desarrollo de patógenos.

Figura 8. Conductividad eléctrica ($\mu\text{S/cm}$) de 13 genotipos de maíz.



En el Cuadro 8 se observan las comparaciones de medias a través de la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ para la variable vigor por el método de Conductividad eléctrica (CE), en un periodo de 24 h de exposición de las semillas en agua de remojo; se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas (** $P \leq 0.01$)

entre los 13 genotipos evaluados. En CE se formaron solamente dos grupos con una desviación estándar de 20.366 $\mu\text{S}/\text{cm}$, encontrando que el genotipo 2 obtuvo el valor más elevado con 139.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ siendo este el menos vigoroso y el genotipo 8 un valor de 89.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ resultando ser el de mayor vigor ambos ubicados en el grupo clasificado como materiales resistentes.

En la figura 8 se observa que el vigor (CE) es mayor en los genotipos 7, 8 y 9 pertenecientes al grupo de resistentes, al igual que en los genotipos 10 y 11 del grupo de materiales susceptibles. Se determinó una cierta relación media entre la resistencia y/o susceptibilidad a contaminación por aflatoxinas y vigor basados en la regresión lineal al obtener el valor de $r=-0.6438$ y $r^2=0.4145$.

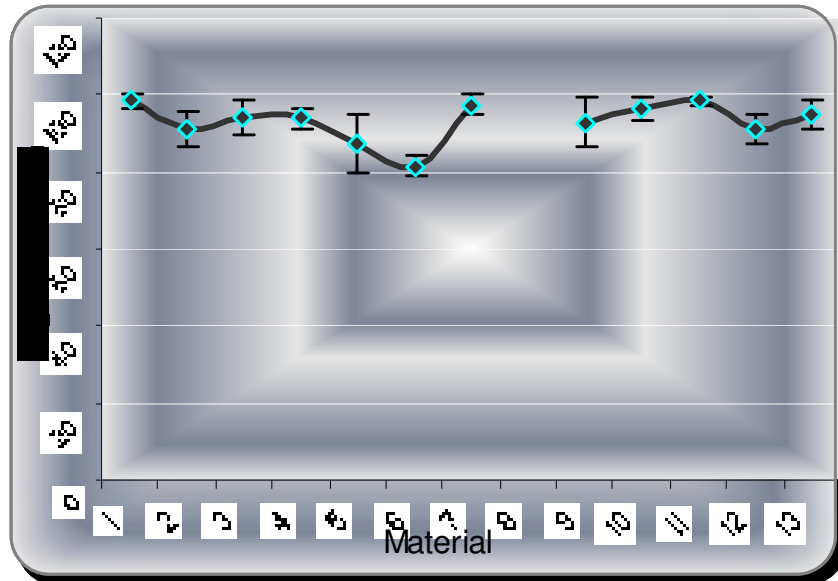
A diferencia de lo que se esperaba, el vigor de las semillas no mostró una relación positiva que era lo que se esperaba con respecto a la resistencia o susceptibilidad a contaminación por aflatoxinas; en las tres pruebas realizadas para evaluar este parámetro ya que los coeficientes de correlación obtenidos fueron bajos en los tres casos. Esto concuerda por lo reportado por Benitez 2007, que realizó la caracterización y diferenciación fenotípica de 43 genotipos en cuanto a resistencia al estrés hídrico en relación a la contaminación por aflatoxinas. Y Cobielles 2007, realizó la caracterización y clasificación de los mismos 43 genotipos de maíz, con base a vigor y su resistencia a la contaminación por aflatoxinas; estos dos autores buscaron relación entre el vigor y la tolerancia a contaminación por aflatoxinas en características fenotípicas y pruebas moleculares, no encontrando relación entre estas variables.

6.5. Longevidad

Según Powell (1995), la prueba de deterioro controlado permite distinguir el vigor entre lotes de semillas que están sufriendo una disminución en su supervivencia, por estar todas las semillas sometidas a niveles similares de deterioro por alto contenido de humedad y elevada temperatura. El deterioro controlado a un contenido de humedad constante, refleja el método de almacenamiento de muchas especies en sacos de papel aluminio más que en almacenamiento

abierto, reflejando su potencial de almacenamiento, lo que también ocurre con el envejecimiento acelerado.

Figura 9. Porcentaje de germinación de 13 genotipos de maíz sometidos a prueba de deterioro controlado.



El material 8 no fue sometido a esta prueba esto por que no hubo suficiente material biológico disponible para su realización. Los genotipos sometidos a esta prueba mostraron diferencias altamente significativas con (** $P \leq 0.01$) esto se observa en el Cuadro 8; Basados en la comparación de medias se formaron tres grupos de los cuales se observa que los genotipos 1, 7, seleccionados como genotipos resistentes junto con el genotipo 11 genotipo susceptible obtuvieron el valor por arriba de 97.5% de germinación mientras que en el grupo de materiales resistentes el genotipo 6 obtuvo 81.5 % (Figura 9) lo que no indica la existencia de relación entre las dos variables analizadas además de que el valor de $r = -0.3456$ y $r^2 = 0.1194$ corroboran esta deducción.

Basados en los resultados obtenidos en este trabajo, la asociación o relación de las dos variables estudiadas, longevidad y producción de aflatoxinas no fue posible establecer, ya que la ausencia de correlación y las diferencias altamente significativas entre los dos grupos clasificados como resistentes y susceptibles,

corroboran lo antes mencionado con respecto al uso de datos provenientes de las pruebas de germinación, vigor y longevidad en la selección de genotipos resistentes a la infección del grano por *A. flavus*; ya que se pensaba que la contaminación con aflatoxinas debía estar relacionada directamente con el vigor de las semillas.

Como menciona Moreno (1996), algunas causas de la variabilidad del vigor de las semillas se señalan las siguientes: genotipo, medio ambiente y nutrición de la planta, estado de madurez en el momento de la cosecha, tamaño, peso y peso volumétrico, daño físico, deterioro y envejecimiento, patógenos. Por lo tanto, la contaminación del grano de maíz con aflatoxinas, es mucho más complejo que el solo considerar la calidad biológica de las semillas. En tal caso muchos otros factores físicos, genéticos y bioquímicos, no involucrados directamente con los factores que aquí fueron medidos son también parte del complejo fenómeno de la contaminación de aflatoxinas en el grano de maíz en el campo.

VII CONCLUSIONES

- ✓ No se encontraron diferencias biológicas entre los materiales de maíz resistentes y susceptibles a la contaminación por aflatoxinas; y no existió una relación entre alto vigor y resistencia a contaminación por aflatoxinas, por lo cual se rechazan las hipótesis planteadas

- ✓ La microbiota presente en materiales de maíz resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas no tuvo relación alguna entre la contaminación de la semilla por otros microorganismos.

- ✓ De los trece materiales con que se trabajaron se formó un grupo de nueve resistentes y otro de cuatro susceptibles con respecto a la producción de aflatoxinas.

- ✓ Se encontró que existe gran variabilidad en cuanto a calidad fisiológica en los materiales evaluados; sin encontrar diferencias entre los grupos de maíz resistente y susceptible a contaminación por aflatoxinas.

- ✓ Los genotipos de maíces resistentes y susceptibles a contaminación por aflatoxinas presentaron diferencias significativas entre ellos al caracterizarlos biológicamente. Por lo que queda demostrada la diversidad genética entre los materiales estudiados. Dicha diversidad genética se ve asociada a las diferencias significativas y los niveles de variación producidos en las pruebas realizadas para evaluar la resistencia a contaminación por aflatoxinas.

VIII. Bibliografía

Abarca M.L., bragulat M. R., Castella g., Accensi f., Cabañes f. J., 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev. Iberoamericana micol, 17 s63-s68.

Aguilar C.J.A. 1989. Efecto de la época de cosecha y de l secado natural sobre la calidad fisiológica de la semilla de maíz. Tesis, M.C. Colegio de Postgraduados, pp 22.

Alva R.E.,S. 1999. Caracterización y selección en maíz por su calidad fisiológica de semilla. Tesis, M.C. Colegio de Postgraduados, pp7-15.

Alvarado C., A., 2005. Micotoxinas en alimentación animal. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. www.monografias.com

Antón A., Lizaso J., 2001. "Hongos y micotoxinas". Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaría. Tomo XXX Folio 1-25.

Anderson R., A. 2006. Detoxification of aflatoxin-contaminated corn. Agricultural Research Service, U.S. Departament of Agriculture, Peoria, Illinois.

Andrade B., H.J. 1992. Mejoramiento del vigor en semillas de maíz y su relación con emergencia y rendimiento. Tesis, M.C. Colegio de Postgraduados. p14,18.

Anguiano J., C. 2003. Caracterización química, fisicoquímica y de biodisponibilidad del almidón en harinas de maíz criollos. Tesis, Instituto Tecnológico de Acapulco, Instituto Politécnico Nacional.

Anguiano G.L., V. y V. A., Guzmán D., 2005. Inactivación de aflatoxina y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. Revista de la salud publica, septiembre- octubre, N° 5.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. The Association: Arlington, VA. 395p

AOSA. 1995. Association Official Seed Analysts. Seed Vigor Testing Handbook, Contribution N° 32 to de Handbook on Seed Testing. 93 p.

Arias U., R. 2005. Evaluación de la eficiencia en la acumulación de materia seca en plántulas de híbridos de maíz (*Zea mays*) de valles altos. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp4-16.

Arroyo T.G., A. 1995. "Cuantificación de aflatoxinas e identificación de hongo *Aspergillus flavus* productor, en el maíz contaminado en el Estado de Tamaulipas". Tesis, UNAM, Facultad de Química. pp. 23-29.

Benitez E., G. 2007. Identificación de genes de resistencia a sequía y su relación con la contaminación con aflatoxinas en maíz. Tesis, M.C. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Pp 2-4, 84-79.

Borrell J. y Gimeno G. 2002. Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. [www.puc.sweduc/selecciones avícolas/esp.com](http://www.puc.sweduc/selecciones_avicolas/esp.com).

Bucio V.C.M.1999. Consideraciones agronómicas en la síntesis de aflatoxinas en maíz en el bajío Guanajuatense". Tesis M.C., Colegio de Postgraduados. pp 9-22.

Cabrera Y.,M. 2003. Evaluación del vigor de semilla de los híbridos de maíz puma 1075 y PUMA 1076 con relación al tamaño de semilla. Tesis, UNAM Facultad de Estudios superiores Cuautitlán.

Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes, capítulo 4 *Aspergillus*, Micología de los alimentos curso de posgrado del doctorado Regional de ciencias y tecnología en Argentina. Universidad Nacional de Salta. www.unsa.edu.ar/matbib.

Christensen, C.M. 1972. Microflora and seed deterioration. En: Viability of seeds. Ed. E.H. Roberts. Chapman and Hall, London.

Christensen, C.M., y D.D. Sauer. 1982. Microflora. En: Storage of cereal grains and seeds. University of Minnesota Press.

Claridades Agropecuarias No. 138. 2005. Almacenamiento de granos. SAGARPA. Pp.13-13.

Cobielles C. G. 2007. Identificación de genes relacionados a vigor, longevidad y contaminación con aflatoxinas en semillas de maíz. Tesis, M.C. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Pp 50-58.

Contreras U. P. U. 2005. Vigor de semilla con relación a la profundidad de siembra y tamaño de la semilla en los híbridos H-50 y H-48. Tesis, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp.14-20.

Copeland, L.O. and McDonald M.B. 1995. Principles of Seed Science and Technology. 3rd Edition Chapman Hall, New York. USA 409 p.

Cruz G.F. 1993. El metabolismo del ADN y el vigor de las semillas de maíz. Tesis, M.C. Colegio de Postgraduados. pp 5-10.

CIMMYT, 1995. Manejo de los ensayos e informe de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz del CIMMYT. México, D.F.

Davies N.D. y Diener U.L. 1986. Production of aflatoxinaB1 and Aflatoxina G1in chemically.

Delouche, J. C. 1985 .Nuevos caminos en investigación sobre tecnología de semillas. In: Memorias Tecnológicas de Semillas. CIAT. Colombia. p.34.

FAO. 2003. El maíz en la nutrición humana. www.fao.com

FAO. 2007. Documentos de la FAO, Maíz www.fao.com

FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2007, Infoaserca. gob 2005. www.faostat.com

French, E.R., Teddy.H., 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica

García G., Martínez R., Melgarejo J., 2001. Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el estado de Sonora, Informe técnico. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. pp.187-193

García P.,M.A. 2007. Selección recurrente en maíz Roque I para mejorar calidad genética, fisiológica y tolerancia a aflatoxinas. Tesis, M.C. Instituto Tecnológico de Roque. Celaya, Guanajuato. México. pp 75-80.

Gimeno A. 2003. Principales factores condicionales para el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas. <http://www.engormix.com/nuevo/micotoxinas.asp>.

Gutiérrez D.L., Gümes G. M. J. 1999. Manejo Postcosecha de maíz en el Estado de Morelos. Memoria INIFAP. P 1-6.

Guzmán P.D., 2001. Mitos y realidades de las aflatoxinas. Avance y perspectiva vol. 20, Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato de Cinvestav, noviembre-diciembre.

Hernández R.A.V. 2003. Efecto de la producción de aflatoxinas en granos de maíz de cuatro variedades diferentes. Tesis, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, pp 8-16.

Hispanista. La importancia de Maíz Mexicano y la Producción e Importación de Maíz en México. www.hispanista.com, 2004.

ISTA (International Seed Testing Association). 1996. International rules for seed testing. Rules 1996. Seed Science and Technology 24 Supplement 24:1- 335.

ISTA (International Seed Testing Association). 1999. International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology, 27: supplement, 333.

INFOASERCA, SAGARPA. 2006. Estadísticas Agricultura- Maíz.

Juárez C.,R. 1997. Caracterización física de 10 variedades de maíz (*Zea mays*) y su influencia en la nixtamalización. Tesis, UNAM, Facultad de Estudios superiores Cuautitlán. pp 4-10.

Kim C.E.I., Campbell B. 1983. Aflatoxins Hazards in Grain / Aflatoxicosis and Livestock College of Agriculture & Biological Sciences, USDA , SOUTH DAKOTA STATE UNIVERSITY.

King S.B. and Wallin J.R. 1989. Methods for Screening corn for resistance to kernel infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. USDA-ARS, departamen of pathology and Weed Science, Mississippi State University.

Lara A.J. 2004. Métodos de determinación, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal". Nutek S.A de C.V. <http://jlara@grupoidisa.com>.

Manzo G.,A. 1982. Efecto de la edad de las semillas sobre el rendimiento y caracteres agronomicos de maíz. Tesis, Universidad de Chapingo. pp 14-16.

McDonald M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science & Technology*: 27(1):177-237.

McDonald M.B. 2002. Standardization of Seed Vigor Test. p 200 – 208. In: McDonlad M.B., y S. Contreras (ed). *Seeds: Trade, Production and Technology*. Proceedings Internacional Seed Seminar. Colección de Extensión. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

MCGEE D.C.; Olanya. M.; Hoyos.; Tiffany L. H.;1996. Populations of *Aspergillus flavus* in the Iowa cornfield ecosystem in years not favorable for aflatoxin contamination of corn grain. Seed Science Center and Departments of Plant Pathology and Botany, Iowa State University, Ames 50011, ETATS-UNIS.

Mehan V.K. 1989. Screening groundnuts for resístanse to Seed invasión by *Aspergillus flavus* and to aflatoxin production. Iternational Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru PO, Andhra Pradesh, India.

Moreno L.J. 2004. Estudio comparativo de *A. Flavus* link y *A. Flavus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo condiciones diferentes de humedad y temperatura. Tesis, M.C. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp 24-27,30-31.

Moreno M. E. 1996. El maíz y las aflatoxinas. En: La Industria de la Masa y la Tortilla. Desarrollo y Tecnología. PUAL. PUE. PUEC. PUIS. PUMA. UNAM. pp. 139-147.

Moreno M. E., Vázquez B. M., Facio P. F. 1992. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. FES Cuautitlán, UNAM; Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas.

Moreno M.,E., Gutiérrez G, M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. 1991.pp 12-25. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Moreno M.,E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos almacenados y derivados. Programa universitario de almacenamiento, UNAM.

Moreno M.,E., Ramírez, G.J., Mendoza, R.M, Valencia, R.G., 1988. Comparison of Mexican Maize Races Stored Under Adverse Humidity and temperature. En : recent Advances in the Conservation and Utilization of genetic Resources: Proceedings of the Global Maize Germoplasm Workshop. CYMMYT, México. Pp. 95-98. ***

Moreno M.,E. 1986. El combate de los hongos de Almacén. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 15-33.

Moreno M.E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. p. 393-425.

Oirsa, 2003. Temas de actualidad, Micotoxinas: Aflatoxinas (Parte II) www.oirsa.org.

Ortiz C.,A. 1992. Manual de procedimiento para el análisis de aflatoxinas. Almacenes Nacionales de Deposito. pp. 85-93.

Ortiz C.,A. 2002. Identificación y control de plagas de almacén. ORION, Ingeniería y desarrollo postcosecha, CD-ROM.

Paliwall, 2001. Maíz en los trópicos Mejoramiento y producción, FAO, Producción y Protección Vegetal.

Payne, J., y D. Bhatnagar, K. C. Ehrlich. 1988. Aflatoxin biosíntesis. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center, NewOrleans, Louisiana, USA.

Perry, D.A. 1984. Manual de Métodos de Ensayos de Vigor. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España. pp. 36-38.

Pixton S.W. 1982. The importance of moisture and equilibrium relative humidity in stored products. Stored Products Information. P.16-29.

Rodríguez I.L. 2005. Capacidad productiva de variedades de polinización libre y ciclo precoz de maíz amarillo para valles altos de México. Tesis, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp.7-9.

Sánchez C. J. 2004. Velocidad de emergencia, acumulación de energía y acumulación de materia seca en híbridos de maíz (*Zea mays*) en dos sustratos. Tesis,UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp.3-15.

Sánchez T., Santos-Chona O.M., 2001. Micotoxinas "Aflatoxinas en humanos". cenatox@infomed.sld.

Santiago R.L.H. 1988. Comportamiento de germinación y vigor de maíz de distinto origen genético sometidos a diferentes temperaturas y sustratos. Tesis, M.C. Colegio de Postgraduados. pp 5.9.

- Tadeo R.,M., Espinosa C., A. 2004. Producción y tecnología de semillas. UNAM. PAPIME. Cuautitlán Izcalli, México. pp 43-52.
- Vázquez M. F. L. 2004. Tolerancia a herbicidas y su efecto en el vigor de genotipos de maíz de calidad proteínica (QPM). Tesis, UNAM, Facultad de Estudios superiores Cuautitlán
- Vega V.D., Ramírez M. P. 2004. "Situación y perspectivas del maíz en México. Tesis, Universidad autónoma Chapingo. pp. 5-9.
- Villaseñor M., 1984. Factores genéticos que determinan el vigor en plántula de maíz.. Tesis, M.C. Colegio de postgraduados, Méx. Pp.24-29.
- Virgen V.J. 1983 Evaluación de vigor de maíz en base a características de semilla y plántula, Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, México.
- Wilson M. D., Gueldner C. R., and H. A. Robert. 1992. Effects of plant metabolites on the *Aspergillus flavus* Group and aflatoxin production. Departament of plant pathology, University of Georgia and USDA-SEA-AR-SGIRL.
- Widstrom A.W. and Zuber M.S. 2000. Prevention and control of aflatoxin in corn (Sources and mechanisms of genetic control in the plant. ARS, USDA, Southern Grain Insects Laboratory, Tifton, Georgia , and University of Missouri.
- Waliyar F., Kumar L., Rao R., Reddy V., 2000. Aflatoxin: *Aspergillus* and Aflatoxin in Groundnut. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. www.aflatoxin.info.
- Zenteno M., 1971 Producción de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus Flavus* aisladas de maíz. Rev. Lat-amer. Microbiol. pp. 263-266.