



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ELICITOR DEL QUITOSÁN
EN PLÁNTULAS DE MAÍZ CONTRA ESTRÉS
DE TIPO BIÓTICO Y ABIÓTICO

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
EVA GUADALUPE LIZÁRRAGA PAULÍN

TUTOR:
Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

COMITÉ TUTORAL:
Dr. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ
Dr. IRINEO TORRES PACHECO



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.

*Gracias Dios por permitirme compartir un nuevo logro con la gente que quiero,
y gracias por permitirme alcanzar una meta más.*

Con cariño, admiración y respeto:

A Chito, Coquito, Nena, Elsy, Dai, Isma y Nadis.

Gracias por su apoyo invaluable e incondicional.
Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Patricia Miranda Castro, por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo, por su enorme contribución para mi desarrollo académico, profesional y mi superación personal.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez y al Dr. Irineo Torres Pacheco, miembros del Comité Tutorial, por sus consejos, cooperación, conocimientos y enseñanzas.

A la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la FES Cuautitlán por el apoyo brindado para la realización de la tesis, especialmente a la M en C. Ma. Cristina Julia Pérez Reyes y a la M en C. Gabriela Sánchez Hernández por el aporte de sus conocimientos en el área de fitopatología; y al Sr. Gustavo Hernández por su cooperación y disposición para el montaje del experimento en el invernadero.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, por seguir siendo el semillero de grandes profesionistas e investigadores en nuestro país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo recibido a través de las becas nacionales para estudiantes de maestría (beca No. 214631).

A la Cátedra de Investigación VIASC-203 "Biotecnología", por el financiamiento para la realización del proyecto de tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Ma. Cristina Piña Barba, Dr. Enrique Salas Téllez, Dra. Alma Virginia Lara Sagahón y M en C. Adriana Tejeda Cruz, por el enriquecimiento del presente trabajo a través de sus acertadas observaciones, comentarios y sugerencias.

A la M en C. María del Rosario Rodríguez Hidalgo y al Dr. César Soto Figueroa por despertar en mí el interés por la investigación, por sus consejos y por exhortarme para realizar mis estudios de Maestría.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la FESC-UNAM, por el aprendizaje diario y sus aportaciones, y especialmente a Darney, Blanca, Lety, Jennifer, Aimé, Nancy, Gina y Yarerí por su cariño y apoyo para la realización de este trabajo.

A mis amigos, particularmente a Joaquín Neri, Marco Medellín, Maricel Pérez e Inés Ramos, por haberme brindado su amistad y apoyo incondicional durante estos dos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen.....	1
Abstract.....	2
2. Objetivos.....	3
3. Hipótesis.....	4
4. Justificación de la Investigación.....	5
5. Introducción	
5.1 Importancia del maíz en México y el mundo.....	6
5.2 El maíz: Generalidades.....	7
5.3 El maíz en la nutrición Humana y Animal.....	9
5.3.1 El maíz de alta calidad proteica.....	10
5.4 Estrés que afectan al maíz.....	11
5.4.1 Estrés biótico.....	12
5.4.1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	13
5.4.1.2 <i>Fusarium moniliforme</i>	14
5.4.2 Estrés abiótico.....	14
5.4.2.1 Humedad y Sequía.....	15
5.4.2.2 pH.....	16
5.5 Repercusión biológica y socioeconómica de los daños al maíz.....	17
5.6 Alternativas para combatir el estrés de los cultivos de maíz.....	19
5.6.1 Combate del estrés biótico.....	19
5.6.2 Combate del estrés abiótico.....	20
5.7 Las defensas de las plantas.....	21
5.8 Elicitores.....	22
5.9 Elicitores aplicados a la agricultura.....	22
5.10 El Quitosán.....	24
5.11 El Quitosán en la agricultura.....	26
6. Materiales y Métodos	
6.1 Materiales.....	28
6.2 Métodos.....	29
6.2.1 Parte 1: Pruebas Preliminares (Estudio <i>in vitro</i>).....	29
6.2.2 Parte 2: Pruebas en Invernadero (Estudio <i>in vivo</i>).....	32
7. Resultados y Análisis de Resultados	
7.1 Parte 1: Pruebas preliminares (Estudio <i>in vitro</i>).....	38

7.1.1	Determinación del contenido de humedad por el método de secado en estufa.....	38
7.1.2	Prueba de Germinación Estándar.....	40
7.1.3	Prueba de Germinación y vigor (Longitud de la plúmula).....	42
7.1.4	Decisión.....	44
7.2	Parte 2: Pruebas en Invernadero (estudio <i>in vivo</i>).....	45
7.2.1	Germinación <i>in vivo</i> de las semillas de maíz QPM.....	45
7.2.2	Estrés Biótico: <i>Aspergillus flavus</i>	46
7.2.3	Estrés Biótico: <i>Fusarium moniliforme</i>	52
7.2.4	Estrés Abiótico: pH ácido-pH alcalino.....	58
7.2.5	Estrés Abiótico: Sequía-Humedad.....	66
7.3	Resumen de los resultados obtenidos mediante el análisis microbiológico cualitativo de las estructuras foliares de las plántulas de maíz.....	75
7.4	Evaluación del Peso Seco de las Plántulas.....	78
8.	Discusión	
8.1	El Quitosán en el combate del estrés biótico en los cultivos de maíz.....	82
8.2	El Quitosán en el combate del estrés abiótico en los cultivos de maíz.....	84
8.3	Elicitores vs. Transgénicos.....	85
9.	Conclusiones.....	87
10.	Perspectivas.....	89
11.	Anexos	
1.	Contenido nutrimental de los maíces blanco y amarillo.....	90
2.	Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de los reactivos involucrados en la experimentación.....	95
3.	Cálculo de la cantidad de agua de riego necesaria para cada unidad experimental.....	99
4.	Análisis estadísticos.....	102
12.	Referencias.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Panorama global de la producción anual mundial de maíz según datos registrados de 2006 a 2008.....	7
Tabla 2. Etapas fenológicas del cultivo de maíz.....	8
Tabla 3. Tratamientos aplicados a las semillas germinadas en el laboratorio.....	30
Tabla 4. Tratamientos aplicados a las semillas cultivadas en el invernadero.....	36
Tabla 5. Contenido de humedad de las semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos.....	38
Tabla 6. Porcentajes de germinación estándar de las semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos.....	40
Tabla 7. Promedios de las longitudes de las plúmulas de las semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos.....	42
Tabla 8. Análisis cualitativo del crecimiento microbiano en las estructuras foliares de las plántulas de maíz provenientes de semillas estresadas de manera biótica.....	75
Tabla 9. Análisis cualitativo del crecimiento microbiano en las estructuras foliares de las plántulas de maíz provenientes de semillas estresadas por modificaciones en el pH del suelo.....	76
Tabla 10. Análisis cualitativo del crecimiento microbiano en las estructuras foliares de las plántulas de maíz provenientes de semillas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de la Quitina y el Quitosán.....	24
Figura 2. Crecimiento de las plántulas de maíz con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas y estresadas por <i>Aspergillus flavus</i>	47
Figura 3. Siembra en agar PDA de las estructuras foliares de las plántulas infectadas por <i>A. flavus</i> y sometidas a los diferentes tratamientos.....	50
Figura 4. Crecimiento de las plántulas de maíz con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas y estresadas por <i>Fusarium moniliforme</i>	52
Figura 5. Siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas infectadas por <i>F. moniliforme</i> y sometidas a los diferentes tratamientos.....	57
Figura 6. Crecimiento de las plántulas de maíz a diferentes condiciones de acidez con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas.....	59
Figura 7. Siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas estresadas por modificaciones en el pH de la tierra de cultivo.....	64
Figura 8. Crecimiento de las plántulas de maíz a diferentes condiciones de riego con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas.....	66
Figura 9. Siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas estresadas por modificaciones las condiciones de riego de de la tierra de cultivo.....	73

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentajes de humedad registrados para cada uno de los tratamientos estudiados. (promedios e intervalos de confianza al 95%, $p=0.028$).....	39
Gráfica 2. Porcentajes de germinación de las semillas registrados para cada uno de los tratamientos estudiados (promedios e intervalos de confianza al 95%, $p=0.48112$).....	41
Gráfica 3. Longitudes de las plúmulas de las semillas de maíz sometidas a los tratamientos estudiados (promedios e intervalos de confianza al 95%, $p=0.00001$).....	43
Gráfica 4. Porcentaje de germinación de las semillas de maíz QPM de acuerdo al tratamiento y a las diferentes condiciones de cultivo.....	45
Gráfica 5. Grosos de los tallos de las plántulas de maíz infectadas por <i>Aspergillus flavus</i> de acuerdo al tratamiento ($p=0.00490$).....	48
Gráfica 6. Longitud total de las plántulas de maíz infectadas por <i>Aspergillus flavus</i> de acuerdo al tratamiento ($p=0.01767$).....	49
Gráfica 7. Longitud de las hojas infectadas por <i>Fusarium moniliforme</i> de acuerdo a la interacción tiempo-tratamiento ($p=0.001$).....	54
Gráfica 8. Longitud de los tallos infectados por <i>Fusarium moniliforme</i> de acuerdo a la interacción tiempo-tratamiento ($p=0.00186$).....	55
Gráfica 9. Longitud de las plántulas infectados por <i>Fusarium moniliforme</i> de acuerdo a la interacción tiempo-tratamiento ($p=0.00004$).....	55
Gráfica 10. Longitud de las hojas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.03923$).....	60
Gráfica 11. Longitud de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.00000$).....	61
Gráfica 12. Grosor de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.00503$).....	62
Gráfica 13. Longitud de las plántulas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.00000$).....	63
Gráfica 14. Longitud de las hojas de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.03923$).....	67
Gráfica 15. Longitud de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.03373$).....	68
Gráfica 16. Longitud de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego según el tratamiento ($p=0.00400$).....	68
Gráfica 17. Grosor de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.00236$).....	69
Gráfica 18. Grosor de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego según el tratamiento ($p=0.01988$).....	69
Gráfica 19. Longitud de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.01430$).....	72

Gráfica 20. Pesos secos de las hojas de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos.....	78
Gráfica 21. Pesos secos de los tallos de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos.....	79
Gráfica 22. Pesos secos de las raíces de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos.....	79
Gráfica 23. Pesos secos de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos.....	80

1. RESUMEN

El maíz es un cultivo de gran importancia en México porque representa el 60% de la producción total de granos y es un cereal que brinda al ser humano hasta el 59% de la energía necesaria para cubrir sus requerimientos nutricionales. Sin embargo, existen varios factores que afectan al maíz, siendo uno de los más importantes el estrés, el cual implica la presencia de uno o varios factores externos que ejercen una influencia negativa sobre el crecimiento vegetal. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto protector del quitosán en plántulas de maíz sometidas a estrés de tipo biótico y abiótico para evaluar su posible efecto elicitor y determinar el tipo de defensa que desarrolla sobre el cultivo. Para ello, después de una serie de pruebas previas de calidad, un grupo de semillas de maíz fue recubierto con una solución de quitosán mientras que otro grupo fue recubierto y adicionado con esferas de quitosán a la misma concentración. Ambos grupos, junto con el control, fueron sometidos de manera independiente a estrés biótico mediante el ataque de los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, mientras que otros grupos se sometieron a estrés abiótico, imponiendo a la tierra de cultivo pH ácido y pH alcalino, y modificando las condiciones de riego para simular condiciones de sequía y humedad en la planta. Después de 5 semanas, se evaluó el crecimiento de la plántula mediante la medición de su longitud total, la longitud de sus hojas y tallos y el grosor de los mismos, registrándose en general mayores dimensiones para el caso de las semillas recubiertas con el biopolímero en solución y menores dimensiones para aquellos cultivos adicionados con esferas de quitosán. Se encontró una diferencia significativa en la longitud de las plántulas sometidas a estrés por acidez en la tierra, además de que sus tallos y estructuras foliares presentaron daños mínimos comparados con el resto de los estreses. Estos resultados nos sugieren que si se impone un pH ácido a la tierra de cultivo y se recubren las semillas con quitosán en solución, se obtendrá una plántula de mejores características. Para evaluar cualitativamente el posible efecto elicitor del quitosán sobre las plántulas y determinar si se desencadenan mecanismos de defensa contra el estrés, se llevó a cabo una prueba *in vitro* en donde se sembraron en agar PDA sus estructuras foliares, lográndose observar resultados prometedores, ya que en la mayoría de los casos, las plántulas provenientes de semillas recubiertas con quitosán presentaron un escaso crecimiento microbiano comparado con aquellas carentes de recubrimiento. Estos resultados sugieren un posible efecto elicitor del quitosán sobre los cultivos de maíz, el cual próximamente será estudiado a nivel molecular.

Palabras clave: Elicitor, quitosán, maíz, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, pH, riego

ABSTRACT

Corn is a very important cultivation in Mexico because it represents the 60% of the total production of grains and it is a cereal which gives de human almost the 59% of the necessary energy for covering his nutritional requirements. Nevertheless, there are many factors that affect corn; one of the most important is stress, which implies the presence of one or some external factors that influence negatively over vegetal growing. The objective of this investigation is to determine the elicitor effect of chitosan in young corn plants under biotic and abiotic stress to evaluate its possible elicitor effect and determine what kind of defense it develops in the cultivation. That's why, after a stock of previous quality tests, a group of corn seeds was recovered with a chitosan solution, while another group was not only covered, but also treated with chitosan spheres at equal concentrations. Both groups, together with the control, were subdued independently to biotic stress given by the fungus *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*, while other groups were subdued to abiotic stress imposing to the soil acid and alkaline pH, and changing the irrigation conditions simulating drought and humidity conditions in the plant. After 5 weeks, an evaluation of the plant growing was made by measuring its total length, the leaf and stem length and the stem thickness, obtaining bigger dimensions for the plants that were covered with the natural polymer and smaller dimensions for the ones which were treated with chitosan spheres. We found a significant difference in the length of the little plants that were subdued to acid stress; moreover its stems and leaves presented few damages when compared with the other stresses. Those results suggest that if we impose acid pH at soil and we recover the seeds with chitosan, we will obtain a plant with better features. For evaluating qualitatively the possible elicitor effect of chitosan over the little plants and to determine if it unchains defense mechanisms against stress, we made an *in vitro* test where a portion of the leaves was cultured in PDA medium obtaining promising results, because in most of the cases, the little plants coming from chitosan recovered seeds presented a few microbial growing if compared with those seeds without recovering. That's why those results suggest a possible elicitor effect of chitosan over corn cultivations, which will be studied soon in a molecular level.

Key words: Elicitor, chitosan, corn, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, pH, irrigation.

1. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto protector del quitosán en plántulas de maíz sometidas a estrés de tipo biótico y abiótico para evaluar su posible efecto elicitor y determinar el tipo de defensa que desarrolla sobre el cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto del quitosán en solución sobre el crecimiento, germinación, vigor y humedad de las semillas a cultivar.
- Evaluar el efecto del quitosán en solución y en esferas sobre la germinación y el crecimiento (grosor de los tallos, longitud total, longitud de las hojas y de los tallos) de las plántulas de maíz *in vivo* bajo condiciones de invernadero.
- Evaluar cualitativamente (*in vitro*) el posible efecto elicitor del quitosán sobre las plántulas de maíz durante su crecimiento, para determinar si el cultivo desarrolla mecanismos de defensa contra estrés de tipo biótico y abiótico.

2. HIPÓTESIS

- El quitosán en solución, aplicado sobre los granos de maíz, no causa efectos negativos sobre el crecimiento, germinación, vigor y humedad de las semillas a cultivar.
- El quitosán aplicado a las semillas favorece de manera significativa el crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz *in vivo* bajo condiciones de invernadero.
- El quitosán actúa como un elicitor sobre las plántulas de maíz durante su crecimiento, por lo tanto, el cultivo es capaz de desarrollar mecanismos de defensa contra estrés de tipo biótico y abiótico.

3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

A través de la presente investigación se propone una alternativa biotecnológica enfocada a la protección de granos y semillas de maíz de alta calidad proteica a través de la adición de un polímero natural (quitosán), que es propiamente una sustancia que no afecta las características propias de los cultivos enriquecidos, sino que al contrario, las enaltece.

Esta alternativa biotecnológica no solamente está enfocada hacia el trabajo de los Botánicos, los Agrónomos o Ingenieros Agrícolas, sino que también se dirige a los grandes y pequeños productores y campesinos, quienes pueden implementar estas técnicas en su labor diaria para producir plantas con mejores características: plantas más vigorosas y longevas, más grandes y resistentes a las condiciones atmosféricas adversas, pero sobre todo la obtención de mazorcas provenientes de semillas protegidas que posteriormente puedan ser cultivadas para mantener los estándares de calidad tras cada cosecha, todo esto sin manipular los genes del maíz, a diferencia de aquellos Organismos Modificados Genéticamente.

De igual manera, se evitarán las pérdidas que año con año ocurren debido a los granos que deben ser desechados como consecuencia de la alta cantidad de contaminantes patógenos que poseen, lo cual también repercute en las ganancias económicas, ya que al disminuir la producción, disminuyen también los ingresos para los campesinos y para los productores.

Estos beneficios se pueden ver reflejados no solamente en el campo, sino también en la Industria, ya que el maíz tiene muchos usos y sus productos secundarios son muy numerosos. La Industria Alimentaria se puede ver beneficiada al producir alimentos tradicionales de mayor calidad (tal es el caso de las tortillas, pan, maíz pozolero precocido, germen de maíz y aceite), e inclusive productos de menor precio (como los jarabes de maíz y glucosa de maíz); la Industria Química puede verse beneficiada produciendo con mayor calidad almidones, pastas adherentes y mucílagos, extractos orgánicos para la elaboración de caucho sintético, o inclusive el combustible a base de “alcohol de maíz” que tanto revuelo a causado en los últimos años.

1. INTRODUCCIÓN

5.1 IMPORTANCIA DEL MAÍZ EN MÉXICO Y EL MUNDO

El maíz es el alimento básico para la población mexicana, por ende, un cultivo de gran relevancia y uno de los cuatro cereales más importantes en el mundo. México, centro de origen del maíz, se caracteriza por presentar una amplia diversidad de genotipos cultivados bajo distintas condiciones ambientales (Lizárraga 2009).

Además de ser la base de la alimentación en muchos países de América Latina, el cultivo del maíz es considerado uno de los principales rubros en el ámbito nacional y mundial, por la importancia que representa este cereal en la dieta alimenticia de las personas y los animales, las grandes extensiones de tierras cultivadas así como la gran cantidad de empleos directos e indirectos que genera toda su cadena de producción, su procesamiento industrial y su comercialización desde la siembra hasta que es consumido por las personas o los animales (Jeglay y Cruz 2006). Es por ello que el maíz es considerado un cultivo estratégico para el sector agrícola, y de ahí surge la necesidad de realizar buenas prácticas de manejo agronómico que permitan obtener productos de excelente calidad y que generen buenas ganancias a los agricultores.

A nivel mundial, el mayor productor de maíz es EUA generando el 43% de la producción, seguido por China y posteriormente por Brasil quienes producen respectivamente 18.8% y 6.9% del grano existente en el planeta (Helbling y col. 2008). México ocupa el quinto lugar en la producción de maíz, generando alrededor de 21.272 millones de toneladas al año, lo cual representa aproximadamente un 2.9% de la producción mundial total de este cereal. *[Tabla 1]*

En México el maíz ha tenido un alto impacto desde los tiempos antiguos, sobre todo, desde la elaboración de la tortilla, que ha sido fuente fundamental de energía para la vida del hombre desde tiempos inmemoriales. La tortilla fue un invento de la cultura Mesoamericana, es decir, la región que incluía a los actuales Estados del Centro, Sur y Sureste de México, los hoy países de Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras y las porciones occidentales de Nicaragua y Costa Rica (Martínez y Martínez 2007).

PAÍS	PRODUCCIÓN de <i>Zea mays</i> L.	
	Millones de toneladas	%
EUA	315.416	43.0
China	137.903	18.8
Brasil	50.613	6.9
Unión Europea	45.478	6.2
México	21.272	2.9
Otros países (Argentina, India, Canadá, Sudáfrica, Ucrania, Indonesia, Nigeria, Filipinas, Egipto y Etiopía)	162.843	22.2
TOTAL DE LA PRODUCCIÓN	733.525	100

Tabla 1. Panorama global de la producción anual mundial de maíz según datos registrados de 2006 a 2008 (Umaran 2006, Panorama Global 2008, CEEES 2008, Helbling y col. 2008).

De la planta del maíz se aprovecha el grano en muchas formas: alimento humano, alimento para el ganado, e industrialmente se emplea para obtener el etanol; también se emplean las mazorcas que enteras son vendidas como elotes cocidos o asados, y desgranadas para la preparación de esquites y para su consumo directo; las hojas de la mazorca se usan para hacer tamales de variados tipos, así como también para envolver tabaco para fumar. Con lo que resta de la planta, se obtiene el rastrojo como forraje seco para el ganado que es empleado en las épocas en que no llueve; el ensilado se produce mediante la trituración integral de la planta verde, (incluyendo al elote con grano macizo), posteriormente el producto se almacena en silos donde se fermenta de manera controlada. El ensilado es forraje fundamental para la industria lechera en regiones como Coahuila y Durango (Martínez y Martínez 2007).

5.2 EL MAÍZ: GENERALIDADES

Los pueblos precolombinos plantaban maíz depositando las semillas en un agujero y espolvoreándolas con ceniza de madera, luego añadían restos de algún animal muerto para que fungiera como fertilizante y finalmente cubrían todo con tierra (Lizárraga 2009). Desde ese entonces se tenía conocimiento de este cereal, pero fue hasta los tiempos de la colonia cuando comenzó a estudiarse más a fondo, identificando a la especie como tal.

ETAPAS FENOLÓGICAS DEL CULTIVO DE MAÍZ	
ETAPAS VEGETATIVAS	
Etapa cero	EMERGENCIA DE LA PLÁNTULA: (La plántula emerge a los 4 ó 5 días después de la siembra).
Etapa uno	4 HOJAS TOTALMENTE EMERGIDAS: (2 semanas después de la emergencia de la plántula).
Etapa dos	8 HOJAS TOTALMENTE EMERGIDAS: (4 semanas después de la emergencia de la plántula). Período de rápida formación de hojas; una deficiencia de nutrimentos en este estado reduce seriamente el crecimiento de las hojas, se presenta una alta demanda y se inicia una máxima utilización del nitrógeno.
Etapa tres	12 HOJAS TOTALMENTE EMERGIDAS: (6 semanas después de la emergencia de la plántula).
Etapa cuatro	16 HOJAS TOTALMENTE EMERGIDAS: (8 semanas después de la emergencia de la plántula). Esta etapa, especialmente las tres últimas semanas, es el período más expuesto para el desarrollo de la planta de maíz. Los elevados requerimientos de elementos nutritivos, agua y productos del metabolismo, hacen que en este período cualquier deficiencia o defecto del funcionamiento sean particularmente serios. Además, en este momento el daño causado al polen o la estructura de la mazorca tiende a ser de carácter permanente y con pocas probabilidades de recuperación, incluso en condiciones favorables. Este es el período en que las deficiencias de nutrimentos (especialmente de nitrógeno) o de agua, el daño causado por los insectos y la superpoblación, causan los mayores trastornos.
Etapa cinco	EMERGENCIA DE LOS ESTIGMAS (BARBAS): (60 días después de la emergencia de la plántula).
ETAPAS REPRODUCTIVAS	
Etapa seis	GRANO EN ESTADO DE AMPOLLA: (12 días después de la aparición de los estigmas).
Etapa siete	GRANO EN ESTADO PASTOSO: (24 días después de la aparición de los estigmas).
Etapa ocho	INICIO DE LA DENTACIÓN. (Algunos granos se observan dentados 36 días después de la aparición de los estigmas).
Estado nueve	TODOS LOS GRANOS ESTÁN DENTADOS. (48 días después de la aparición de los estigmas).
Etapa diez	MADUREZ FISIOLÓGICA. (60 días después de la aparición de los estigmas).

Tabla 2. *Etapas fenológicas del cultivo de maíz* (Jeglay y Cruz 2006).

Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. Las panojas (a menudo, una por tallo) son las estructuras donde se desarrolla el grano en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1 000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1 000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42% del peso seco de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado. Hay varios tipos de grano, que se distinguen por las diferencias de los compuestos químicos depositados o almacenados en él (Grolleaud 1997).

El maíz es un cultivo que requiere un periodo mínimo de crecimiento de 120 días. A lo largo de este tiempo, el maíz transcurre por diferentes etapas tanto vegetativas como reproductivas. A este conjunto de etapas se les denomina “etapas fenológicas”, las cuales se enlistan en la *Tabla 2* presentada en la página anterior.

Como puede apreciarse, el crecimiento del maíz es un proceso complejo, el cual es conveniente ir evaluando de etapa en etapa para poder determinar si la planta está teniendo un desarrollo normal o si es necesario agregar nutrimentos o modificar los riegos para que se logre su crecimiento ideal. También es importante decir que, dependiendo de las condiciones medioambientales en las que se encuentre la planta, la duración de sus etapas fenológicas puede variar un poco, por lo que es conveniente tener un amplio conocimiento de la interacción de los factores planta-ambiente-manejo, que es la clave para aumentar la calidad y el rendimiento no solo del maíz, sino de cualquier cultivo.

5.3 EL MAÍZ EN LA NUTRICIÓN HUMANA Y ANIMAL

Como ya se ha mencionado, el maíz es un cultivo de gran importancia en nuestro país porque representa el 60% de la producción total de granos. Sin embargo, también es esencial mencionar que su trascendencia radica en que este cereal brinda al consumidor hasta el 59% de la energía necesaria para cubrir los requerimientos nutricionales promedio del ser humano (Espinosa y col.

2005). El maíz además es rico en otros nutrientes, como los carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, cuya composición varía dependiendo del tipo de maíz que se consuma (USDA 2008). [Anexo 1].

La proteína de maíz, y en general la de los cereales, es de bajo valor nutricional cuando se compara con la proteína de origen animal. Esta deficiencia es el resultado de un desbalance de aminoácidos y de un bajo contenido proteínico (Azevedo y col. 2006). En el caso de maíz, la mayor cantidad de la proteína se encuentra en el endospermo (75 a 85%) y es deficiente en dos aminoácidos esenciales: lisina y triptofano, los cuales son necesarios para las funciones metabólicas, el crecimiento y el desarrollo de todos los animales (Huang et al. 2004, Espinosa y col. 2005).

Para aumentar el valor nutricional del maíz y como una alternativa para combatir los problemas de desnutrición y baja producción en muchos lugares en donde el cultivo de este cereal es importante, en los últimos años se ha trabajado con los llamados maíces de “Alta Calidad Proteica” (QPM por sus siglas en inglés), los cuales contienen hasta 100% más lisina y triptofano que los maíces ordinarios, igualando incluso su calidad proteínica a la de la leche (Bressani 1994).

5.3.1 EL MAÍZ DE ALTA CALIDAD PROTEICA

Las investigaciones para producir maíz QPM se han realizado en México desde 1996 encabezadas por Surinder K. Vasal, genetista del el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y Evangelina Villegas, bioquímica ex investigadora del CIMMYT; todo ello en coordinación con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Mendoza-Elos y col. 2006, Espinosa y col. 2005).

El aprovechamiento de los maíces QPM es de 90% en comparación con el 39% de los maíces comunes. Por ello es que también pueden utilizarse en la alimentación de aves y cerdos, ya que se ha encontrado que con una menor cantidad de alimento se puede incrementar el peso que se logra con el grano de calidad normal (Espinosa y col. 2005).

Se han desarrollado numerosas líneas progenitoras de QPM, con las cuales se han formado una gran cantidad de híbridos y variedades, los cuales han sido promovidos en países como Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Honduras, Brasil, China, India, Sudáfrica, Ghana y Zimbabue entre otras. Para México, el INIFAP definió un grupo de variedades e híbridos evaluados intensivamente en todo el país, de los cuales se eligieron los mejores para producir semilla y generar información en distintas líneas. Con ellas, se han hecho investigaciones importantes relacionadas con el mejoramiento genético, la producción de tecnología de semillas, forrajes, plagas de granos almacenados, manejo agronómico, transferencia de tecnología, y el estudio de su efecto en la alimentación humana y la dieta de animales así como sus análisis de calidad (Cuevas-Rodríguez et al. 2003, Shewry 2007).

Cabe mencionar que existen varios problemas que han impedido la libre comercialización del maíz QPM al compararlos con los otros maíces. Entre los principales obstáculos se tiene la poca aceptación del maíz QPM por los consumidores debido al aspecto suave del grano, secado lento, susceptibilidad a plagas y enfermedades en almacén, facilidad de contaminación con los maíces normales, etc. No obstante, hoy en día la mayoría de estos problemas han sido resueltos a través de los programas de mejoramiento genético. En contraparte, la expresión del gen *Opaco-2*, llega a duplicar las cantidades de los aminoácidos lisina y triptofano, y lo convierte en maíz con valor nutritivo superior al maíz normal (Arnason et al. 1993, Espinosa y col. 2005).

5.4 ESTRESSES QUE AFECTAN AL MAÍZ

El maíz es un cereal que puede cultivarse prácticamente en cualquier sitio, ya que es altamente resistente y no es exigente en cuanto a las condiciones climáticas se refiere. Sin embargo, existen varios factores que afectan al maíz. Uno de los más importantes el estrés, el cual implica la presencia de uno o varios factores externos que ejercen una influencia negativa sobre el crecimiento vegetal. Según sea la naturaleza del factor causante del estrés, se puede distinguir entre estrés biótico (producido por seres vivos como insectos, bacterias u hongos) y abiótico (producido por condiciones medioambientales como sequía, calor y pH).

5.4.1 ESTRÉS BIÓTICO

Se entiende por estrés biótico a todas aquellas condiciones biológicas o microbiológicas que involucran la presencia de seres vivos y que afectan al cultivo en cuestión.

Una de las mayores amenazas para los cultivos de cereales en nuestro país lo constituye la presencia de hongos, ya que crecen sobre materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos. Al desarrollarse, producen algunos metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para las plantas e incluso para los animales que los consumen. Las especies de microorganismos que afectan a las plantas dependen del clima y de la región geográfica en donde se encuentren. Para su desarrollo requieren de una humedad ambiental relativa del 90 al 100% y un contenido de agua en las semillas del 22 al 23% con un intervalo de temperatura de 0 a 30°C, aunque algunos pueden crecer a 35°C o más (Christensen 1987).

La colonización de las partes aéreas de las plantas por los microorganismos comienza tan pronto como son expuestas al aire. Las bacterias suelen aparecer primero, luego las levaduras y finalmente los hongos patógenos. La cosecha perturba el ecosistema y las condiciones relativamente estables de almacenamiento entrañan un profundo cambio en la composición de la microbiota (Lacey 1989).

Para el caso del maíz, existe una gran cantidad de agentes bióticos que pueden dañarlo, destacando no solo los hongos, sino también algunas especies de insectos. De ellos, el que mayor daño causa a la planta de maíz es *Sitophilus zeamais*, mejor conocido como “gorgojo del maíz”. Debido a su gran capacidad de vuelo, infesta los cereales desde el campo, por lo que es extraordinariamente destructivo. Se le encuentra principalmente en las zonas cálidas húmedas, tropicales y subtropicales. Se considera una plaga primaria porque los adultos son capaces de perforar los granos y las larvas se desarrollan en el interior del grano. Se le ha detectado ocasionalmente en el maíz importado de Norteamérica, pero también se ha encontrado en sitios de almacén en Latinoamérica, como es el caso de Chile y México (Salvadores y col. 2007). De ahí la importancia de crear mecanismos que impidan el ataque de insectos, y con ello, la disminución en las pérdidas de producción.

En cuanto a los hongos se refiere, son principalmente dos las especies que afectan mayoritariamente al maíz: *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*.

5.4.1.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es un hongo filamentoso, saprobio y común del suelo que contribuye a los procesos de descomposición de la materia orgánica especialmente en sitios de alta humedad, pues superan los niveles tolerados por otros grupos de hongos. Los miembros de este género se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Frecuentemente son aislados del suelo, especialmente de áreas tropicales y subtropicales, de forrajes y vegetación en descomposición, de semillas y granos almacenados y de varios tipos de productos comestibles. En el suelo, su distribución parece no estar limitada por el pH ni por la profundidad de siembra. Se ha encontrado también la presencia de este hongo en el rizoplaneo de trigo y en la rizósfera de avena, cebada, maíz, arroz, algodón, caña de azúcar, café, tomate, cebolla, rábano, guisante y cacahuate entre otras (Bean 1989).

En muchos casos es frecuente encontrar este hongo en las semillas o los productos de las plantas justo después de la cosecha y durante su almacenamiento, por lo tanto se encuentra también en la harina de granos y cereales o en otros productos vegetales procesados. De hecho, la presencia de este hongo solamente es perceptible cuando aparecen las mazorcas, manifestándose con una coloración verdosa, de apariencia polvosa que se establece en los granos. A nivel de plántula, la presencia de este hongo no es evidente, sin embargo se sabe que cuando la planta tiene una carga fúngica alta, presenta enanismo y las hojas y tallos se adelgazan produciendo plántulas débiles que en muchas ocasiones no dan suficiente sostén a las mazorcas (Widstrom 1996).

En su mayoría, *Aspergillus flavus* es patógeno de plantas y en menor proporción lo es de los animales y del hombre. Sin embargo, en muchas ocasiones se comportan como hongos oportunistas generando serias intoxicaciones debido a la producción de varias micotoxinas, entre las que destacan las aflatoxinas B1, B2, B2a, G1, G2 y M1, que son un grupo de metabolitos secundarios que tienen efectos carcinogénicos, hepatotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores en quien los consume en altas concentraciones (Keeler and Anthony 1983, Bolet y Socarrás 2005).

5.4.1.2 *Fusarium moniliforme*

Fusarium moniliforme es un hongo que al igual que *A. flavus*, constituye una amenaza para el maíz y quien lo consume, ya que también produce metabolitos secundarios dañinos llamados fumonisinas, de entre las cuales destacan la B1 y la B2 (Reid et al. 1999). Los efectos en la salud del consumidor son muy semejantes a los causados por las aflatoxinas; sin embargo, las fumonisinas se presentan en menor cantidad en el cuerpo humano.

F. moniliforme tiene la característica de ser transmitido tanto vertical como horizontalmente a la siguiente generación de plantas mediante la infección clonal de semillas y planta (debris). Es por ello que esta infección es difícilmente controlable, ya que no se elimina con el simple tratamiento de las semillas con fungicidas, sino que la semilla se tendría que someter a tratamientos genéticos para que de esa manera perdiese la capacidad de ser contagiada a nivel generacional (Bacon et al. 2001).

Cuando la planta de maíz está infectada por *F. moniliforme*, es evidente la repentina coloración de los tallos con una tonalidad que va desde el morado hasta el violeta, y que se va propagando poco a poco hacia las hojas, las cuales primeramente presentan máculas moradas que con el transcurso de los días se van expandiendo a lo largo de la hoja hasta colorear fragmentos completos, culminando con la necrosis de la hoja después de secarla completamente. Por esta razón se dice que *F. moniliforme* es un hongo sistémico (Bacon et al. 2001). Aunque las semillas que se vayan a cultivar tengan una apariencia totalmente sana, es importante almacenarlas a bajas temperaturas porque a pesar de pasar por rigurosos controles de calidad, traen consigo esporas de *F. moniliforme* que pueden germinar fácilmente aun en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, (ya que su crecimiento se da a 28°C) causando la podredumbre de los granos infectados y contagiando a los sanos.

5.4.2 ESTRÉS ABIÓTICO

Se conoce como estrés abiótico a todas aquellas condiciones climáticas o medioambientales que afectan a los cultivos.

En nuestro país existe una gran diversidad de factores medioambientales que afectan directa o indirectamente a los cultivos. México tiene la característica de ser un país con una gran diversidad climática, lo cual favorece el cultivo de una gran cantidad de especies vegetales que se cosechan con éxito y en grandes cantidades año con año. Sin embargo, por efecto de la contaminación atmosférica y el calentamiento global, los campesinos y agricultores se enfrentan diariamente a problemas relacionados con la modificación antropogénica de las condiciones climáticas como lo son la falta de lluvia, el exceso de bióxido de carbono en el aire o la presencia de lluvia ácida, que en muchas ocasiones resulta tóxica para los cultivos cuando éstos se encuentran en su primera fase de crecimiento afectando el porcentaje de germinación de las semillas (Aguirre 2001).

5.4.2.1 HUMEDAD Y SEQUÍA

La cantidad de agua de riego que requiere el cultivo del maíz es un factor muy importante para lograr su óptimo crecimiento y máxima productividad. Debido a las altas temperaturas y las pocas lluvias causadas por el cambio climático, el maíz puede presentar un estrés hídrico, que propiamente es una condición de déficit de agua que induce a las plantas a la sequía.

La sequía es una condición de deshidratación que implica la pérdida de la mayoría del agua libre del protoplasma y condiciona la supervivencia a partir del agua ligada (agua asociada a la matriz celular), pudiendo conferirle un daño letal a la planta (Ramanjulu and Bartels 2002). El daño letal es causado porque el estrés hídrico restringe la fotosíntesis debido a las limitaciones bioquímicas, así como también la alteración de la conductividad estomatal que se ve fuertemente influenciada por la presencia y concentración de ácido abscísico, una fitohormona presente en el xilema de la planta y que está directamente relacionada con la cantidad de nudos radiculares presentes, los cuales a su vez varían de especie en especie, por lo que algunos genotipos son más tolerantes a la sequía según su fisiología (Laffite 2001).

No obstante, todo exceso es dañino. La planta de maíz requiere de riegos rigurosos para el óptimo aprovechamiento de los nutrientes que se encuentran en el suelo; sin embargo, si el riego es demasiado, la planta puede presentar condiciones de pudrición debidas al excedente de agua que la tierra no es capaz de filtrar, por lo que el fluido se queda atrapado en el suelo tapando los poros

de la tierra, provocando la formación de lodos que tienen la capacidad de almacenar el agua durante varios días sin renovarla, generando condiciones de contaminación y excesiva humedad que además es aprovechada por bacterias y hongos oportunistas que al crecer son capaces de colonizar las plantas desde la raíz, consumiendo los nutrientes que los cultivos requieren, por lo que la planta disminuye su crecimiento permitiendo posteriormente que los microorganismos la parasiten produciéndole entonces un estrés biótico que en la mayoría de los casos es irreversible por ser un daño de origen sistémico. De hecho se puede generar podredumbre desde que se siembra la semilla, impidiendo la óptima germinación de la misma y con ello pérdidas económicas considerables.

Por esta razón, para poder conocer la capacidad de riego del cultivo, es necesario tener en cuenta las condiciones nutritivas y fisicoquímicas de la tierra en la que se va a cultivar, ya que muchos nutrientes son solubles solamente en determinadas concentraciones de agua; de la misma manera, el riego debe ser adecuado para evitar la formación de lodos y el drenaje debe ser óptimo para el mayor aprovechamiento de la carga nutritiva que se involucre en el cultivo (Aguirre 2001).

5.4.2.2 pH

El pH es usado generalmente como el parámetro químico diagnóstico más fundamental en la evaluación de aguas y suelos. Aunque este parámetro es raramente muy bajo o muy alto como para implicar efectos nocivos directos de las especies químicas H^+ y OH^- sobre los microorganismos y sistemas radiculares de los cultivos, es sin embargo indicador de los efectos nocivos indirectos causados por los valores externos de pH, ya que por ejemplo, a pH ácido, algunos iones metálicos presentes en los suelos se vuelven tóxicos, mientras que en pH ligeramente alcalino se encuentran problemas de baja solubilidad de los iones o altos valores de concentraciones de sodio y sulfuros metálicos (Aguirre 2001).

En experimentos conducidos en soluciones nutritivas, se ha podido demostrar que la variación del pH de 4 a 9 en las soluciones no presenta influencia marcada sobre la absorción de iones. Solo un

valor de $\text{pH} < 4$ produce trastornos en el desarrollo radicular, y a valores de $\text{pH} > 9$ se produce la asimilación deficiente de fósforo (Aguirre 2001).

De aquí resulta que el efecto del pH sobre el desarrollo y crecimiento vegetal se encuentra más bien asociado con la influencia que ejerce sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. La mayoría de los cultivos arables o de labranza (económicamente importantes) presentan valores de pH óptimos de desarrollo, que de alguna manera reflejan el estado de diversos factores edáficos, que en últimas circunstancias, dictan la adaptabilidad de las plantas a las condiciones de acidez de los suelos (Aguirre 2001).

De acuerdo a lo reportado por Aguirre (2001), el pH óptimo de crecimiento de maíz oscila entre 5.5 y 7.5, es decir, su intervalo de potencial de hidrógeno es relativamente amplio, lo que permite la siembra en una gran variedad de suelos. Así, si se tiene la esperanza de obtener cosechas satisfactorias y rendimientos redituables, el cultivo de las plantas requiere el ajuste del pH a valores cercanos al óptimo para cada especie vegetal. Cuando el valor de pH no puede ser modificado, o no es práctica o económicamente factible hacerlo, se deben elegir cultivos tolerantes que se adapten mejor a las condiciones de acidez de los suelos.

5.5 REPERCUSIÓN BIOLÓGICA Y SOCIOECONÓMICA DE LOS DAÑOS AL MAÍZ

Desde que el maíz fue descubierto en la antigua Mesoamérica, el hombre se ha enfrentado a una serie de problemas importantes con respecto a los daños que el cultivo sufre desde que es plantado hasta que es cosechado para su posterior almacenamiento. Como ya se ha mencionado, los estreses son los factores más importantes que hay que controlar para evitar la pérdida del cultivo, así como los posibles daños a la salud de los consumidores.

Debe de considerarse que las pérdidas más significativas son aquellas que ocurren después de la cosecha y que se relacionan con la diversidad de los productos, con las operaciones que se suceden a lo largo del sistema post-cosecha y con los depredadores y otros parásitos de los productos. También abarca lo relacionado con las condiciones físicas, técnicas y económicas que

favorecen la acción de los agentes de deterioro y, en consecuencia, el agravamiento de las pérdidas (Grolleaud 1997).

El primer problema que enfrenta México es el porcentaje de humedad del grano, ya que el maíz es un cultivo de zona tropical húmeda, que al momento de la cosecha, puede tener más de 30% de humedad. En estos casos el grano se pone a secar en áreas techadas, sin embargo, la pérdida de humedad máxima es de alrededor del 5%, caso contrario a lo que ocurre en países como Estados Unidos en donde se tienen cámaras especiales de secado que permiten una reducción de humedad de por lo menos un 10%. El segundo problema, lo constituye la falta de mano de obra campesina, lo cual provoca que la cosecha en ocasiones quede en pie más del tiempo necesario, generando mayores riesgos de pérdida debido al quiebre de los tallos secos por los vientos y como consecuencia, permitiendo que las mazorcas pesadas caigan a la tierra causando daño mecánico a los granos que son hospedados a su vez por hongos oportunistas, los cuales pueden crecer durante el almacenamiento debido a las condiciones no controladas de humedad. Por otra parte también se encuentra el riesgo de ataque a las plantas por pájaros, roedores e insectos, como el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) o el bruco de los granos de café (*Araecerus fasciculatus*), que depositan sus huevos en los granos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 2000).

Si se analizan estas repercusiones de manera numérica, se puede decir que durante el almacenamiento, según la FAO, se pierde hasta un 3% de los granos cuando estos se encuentran sin envoltura; los insectos y los pájaros que atacan al maíz producen pérdidas irre recuperables que causan pérdidas en el almacenamiento de hasta un 15%, mientras que las semillas que no alcanzan a germinar por una gran diversidad de motivos representan un 2% de pérdida (Grolleaud 1997).

Sumando todos los factores ya mencionados, se tiene una pérdida total aproximada del 20% en una cosecha anual, lo cual es una cifra realmente alarmante considerando la capacidad productiva de nuestro país. Este decremento se ve reflejado en la Industria Alimentaria y en los precios al consumidor, encareciendo el producto de manera considerable para poder recuperar las pérdidas.

Debido a esta grave problemática, se buscan alternativas viables para mejorar la producción del maíz, incluyendo nuevas opciones de manejo del cereal para disminuir los decrementos en la producción y con ello obtener granos con alta calidad y al más bajo costo.

5.6 ALTERNATIVAS PARA COMBATIR EL ESTRÉS DE LOS CULTIVOS DE MAÍZ

A lo largo de los últimos años, gracias al desarrollo de áreas como la Biotecnología y la Biología Molecular, se han estudiado una serie de alternativas importantes para poder mejorar las condiciones de los cultivos y la calidad de los mismos. Algunas de ellas ya están siendo utilizadas, mientras que otras se han quedado únicamente como buenas ideas al no ser económicamente factibles.

5.6.1 COMBATE DEL ESTRÉS BIÓTICO

Por citar algún ejemplo, para combatir el ataque de *Fusarium moniliforme* en los cultivos de maíz, investigadores de EUA (Bacon et al. 2001), crearon un sistema de control biológico utilizando una bacteria endofítica: *Bacillus subtilis*, que ha demostrado ser una gran promesa para lograr la reducción en la acumulación de fumonisinas durante la fase de crecimiento endofítico. Esto se debe a que dicha bacteria ocupa exactamente el mismo nicho ecológico dentro del alcance de la planta por lo que es considerado un homólogo ecológico a *F. moniliforme*, y el mecanismo inhibitorio de acción opera en el principio de exclusión competitivo. La aplicación de una bacteria a la planta para el control de micotoxinas es definitivamente una excelente idea, sin embargo, hay que tomar en cuenta dos aspectos importantes: En primer lugar, si se quisiera aplicar esta innovación en el campo mexicano, se tendrían que considerar los gastos de capacitación para los campesinos, las cepas suficientes para cubrir toda la demanda de cultivos y equipo de seguridad para los trabajadores, por mencionar algunos; gastos que el gobierno no aceptaría absorber. En segundo lugar, puede ser que esta innovación biotecnológica haya sido un éxito a nivel de investigación, sin embargo, no podemos pasar por alto que aunque *Bacillus subtilis* no es considerado patógeno humano, tiene la capacidad de contaminar los alimentos debido a las esporas que produce, las cuales incluso pueden sobrevivir la calefacción extrema que a menudo es

usada para cocinar el alimento. De igual manera, esas esporas pueden mantenerse en las mazorcas, y cuando sus granos sean cultivados en la siguiente temporada, las esporas estarán inoculadas en las nuevas semillas favoreciendo su desarrollo de generación en generación.

Por otra parte, en lo que se refiere a *A. flavus*, ha sido una tarea difícil el combatir la producción de aflatoxinas en las plantas de maíz. Además, se ha comprobado que una vez formadas las micotoxinas no se pueden eliminar durante el procesamiento culinario o industrial, aunque en unos pocos casos sí se reduce su contenido. La mayor cantidad de toxina suele estar concentrada en unos pocos granos, y si se logra separarlos, se reduce la proporción de micotoxina en los subproductos. A diferencia del maíz, existen algunas semillas que reducen su cantidad de aflatoxinas de manera considerable al ser sometidas a tostado, tal es el caso de los cacahuates que pierden alrededor de 40% de aflatoxina B1 y los granos de café que pierden cerca del 80% de ocratoxina A. Sin embargo, ya se ha probado exitosamente que el tratamiento del maíz quebrado con NaOH disminuye significativamente el contenido de aflatoxinas, mientras que la preparación del grano entero con CaOH reduce solo un 40% de las mismas (Carrillo 2003).

5.6.2 COMBATE DEL ESTRÉS ABIÓTICO

De cierta manera, se ha encontrado que el estrés abiótico es más fácil de combatir que el estrés biótico. En cuanto a la sequía se refiere, los campesinos y el gobierno de nuestro país han sumado esfuerzos para diseñar sistemas de irrigación en los campos que permitan que los cultivos cuenten con el agua necesaria en caso de que las lluvias no sean suficientes para cubrir la demanda hídrica de la planta. Es más difícil hallar en el campo condiciones de excesiva humedad en la tierra, sin embargo, estas anomalías sí se han presentado en nuestro país años atrás debido a la excesiva lluvia. Para ello, suelen emplearse sustancias desecadoras comerciales que reducen la cantidad de humedad que entra a la planta a través de las raíces.

En cuanto al ajuste en la acidez de la tierra, las antiguas técnicas se continúan utilizando. Para el caso de pH muy ácidos, estos se alcalinizan encalando la tierra con carbonato de calcio, lo cual permite elevar el pH de la tierra a bajos costos, además de que esta sustancia es empleada también contra el ataque de algunas plagas específicas sobre todo en el norte de nuestro país.

Caso contrario, cuando la basicidad de la tierra se encuentra elevada y es necesario disminuir el pH, es efectivo el uso de materia orgánica en forma de fertilizantes y abonos, ya que la carga microbiana que estos contienen, al entrar en contacto con el agua de riego, favorecen la formación de nitratos, los cuales son asimilados por la planta y por la tierra disminuyendo el pH de la misma de manera considerable sin causar daños a los cultivos (Aguirre 2001).

5.7 LAS DEFENSAS DE LAS PLANTAS

Las plantas cuentan con una gran cantidad de mecanismos de defensa a nivel celular y molecular para combatir el ataque de organismos patógenos o condiciones medioambientales adversas. Los genes de resistencia proveen un mecanismo por el cual la planta reconoce al patógeno y desencadena muchas respuestas de defensa en contra de éste. Tales respuestas pueden ser la fortificación de la pared celular, la producción de fitoalexinas, la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, flujos rápidos de Calcio y otros iones, la explosión oxidativa celular y la respuesta hipersensible o la muerte celular programada en el sitio de la infección (Egea-Gilabert et al. 2003, Boyes et al. 1996, Belkhadir et al. 2004, Ronald 1998).

Sin embargo, los mecanismos de defensa en plantas no solo pueden ser inducidos por el mismo organismo, sino que también pueden ser estimulados mediante la adición de otro tipo de moléculas que favorezcan el desarrollo de respuestas de defensa. Las estrategias que se emplean para ello se basan en la utilización de genes de defensa como transgenes. El origen de estos genes de defensa puede ser de una planta (genes de defensa vegetales, entre los que cabe mencionar los genes PR o "Pathogenesis-Related"), o bien genes provenientes de otros organismos. Es por ello que se han desarrollado diversas metodologías para lograr la identificación de genes que participan en la respuesta natural de defensa de las plantas en situaciones de infección por patógenos o ataque por insectos fitófagos (genes cuya expresión se induce en respuesta a herida), y a la utilización de los mismos en la mejora de plantas mediante transformación genética (Angelova et al. 2006).

5.8 ELICITORES

En el año de 1996, se descubrió la existencia de agentes inductores de mecanismos de defensa mejor conocidas como “elicitors”, los cuales propiamente son moléculas que estimulan la activación de estos mecanismos en plantas. Los elicitores llevan a cabo un procedimiento a nivel celular en donde la célula de la planta percibe y transduce señales biológicas para activar las respuestas de defensa (Hahn 1996). Estos inductores se han clasificado en función de su origen y estructura molecular, resultando en elicitores bióticos, abióticos, hormonas, proteínas, glicoproteínas, y oligosacáridos.

Existen proteínas de unión a elicitores específicos que actúan como receptores fisiológicos en las cascadas de transducción de señal, variando su especificidad dependiendo del sistema en estudio. Este hecho nos permite conocer las bases moleculares que originan los intercambios de señales entre las plantas hospederas y los patógenos microbianos, que tienen como consecuencia la activación de tales mecanismos de defensa (Radman et al. 2003, Angelova et al. 2006, Hahn 1996).

Conforme la ciencia ha avanzado, se han encontrado una gran cantidad de elicitores los cuales funcionan de diferentes maneras. Un grupo muy importante lo constituyen los oligosacáridos, que son carbohidratos de cadena corta y que se caracterizan por su actividad prebiótica. Muchos oligosacáridos alteran la permeabilidad de la membrana celular y promueven la producción de metabolitos secundarios que la planta aprovecha para combatir el daño. De ahí la importancia del estudio de los elicitores aplicados a la agricultura de nuestro país.

5.9 ELICITORES APLICADOS A LA AGRICULTURA

Los elicitores no solamente permiten que los mecanismos de defensa en plantas se activen durante su crecimiento, sino que también se mantienen después de la cosecha durante su almacenamiento. La mayoría de los granos, al estar expuestos al ataque de insectos durante el almacenamiento, merman su cantidad final de producción, lo cual provoca pérdidas importantes en la economía del país.

Aún cuando se trabaje con las plantas y los cultivos bajo condiciones óptimas, los tejidos que forman el explanto sufren siempre de estrés (deseccación, daños mecánicos, daños en la desinfección, cambios en los potenciales hídrico, salino y osmótico al ser incubados en el medio de cultivo, cambios de pH, etc.), provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos. Estas sustancias provocan una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas, reacciones de estrés en las células vecinas de las dañadas, e incluso una muerte prematura de células específicas de una zona determinada o del lugar de la infección, lo cual es un mecanismo de defensa semejante a la apoptosis. Físicamente, ésta se manifiesta con el ennegrecimiento de la planta, inhibición del crecimiento o necrosis (Benhamou 1996).

En respuesta al estrés o daño mecánico, en general el metabolismo fenólico presenta tres tipos de reacciones: La síntesis de productos fenólicos monoméricos (fitoalexinas); la síntesis de derivados polifenólicos; y la oxidación de componentes fenólicos preformados, dando lugar a quinonas y a material polimerizado (ligninas) (García-Mateos y Pérez-Leal 2003). La síntesis de monofenoles puede conducir a la acumulación en tejidos no dañados de grandes cantidades de productos ya preformados, o dar lugar a la aparición de nuevos productos, las fitoalexinas, cuyo papel en los mecanismos de protección contra enfermedades es bien conocido. Así, una acumulación de material polimerizado, tipo lignina, va a actuar como una barrera física contra las invasiones microbianas y las quinonas y fitoalexinas van a actuar inhibiendo el crecimiento microbiano tras la infección (Vivanco y col. 2005). En la mayoría de las ocasiones, la eficiencia del elicitor aplicado a la planta es evidente incluso desde las primeras etapas de desarrollo, ya que se ha demostrado que se favorece el crecimiento óptimo de la planta, cuyas raíces y tallos son usualmente más fuertes; se evidencian ataques menos agresivos de los patógenos involucrados, e incluso muchas veces se producen alimentos de mejor calidad en general (Keeler and Anthony 1983, García-Mateos y Pérez-Leal 2003).

En Latinoamérica se han adicionado elicitores a cultivos como el arroz, frijol y soya, de tal manera que se han logrado estudiar los efectos de tal protección, y en algunos casos también se han hecho estudios moleculares de los genes que se ven afectados por la inclusión de elicitores en las plantas. Los resultados arrojados por tales estudios han sido buenos, dando pie así a que se

desarrollen nuevas técnicas para determinar el tipo de resistencia presente en el organismo vivo (Rivero y col. 2004, Rodríguez-Pedrozo y col. 2006).

5.10 EL QUITOSÁN

Dentro de los elicitores correspondientes al grupo de los oligosacáridos, destaca por su importancia el quitosán, también llamado quitosano. El quitosán es un biopolímero que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas (Lárez 2003).

La quitina (cuyo nombre sistemático es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa) es un polisacárido de alto peso molecular el cual constituye el material fundamental en los exoesqueletos de crustáceos como las jaibas y los camarones, algunos insectos y arácnidos. Después de la celulosa, es el biopolímero más importante y abundante en la naturaleza (Lárez 2003, Devlieghere et al. 2004).

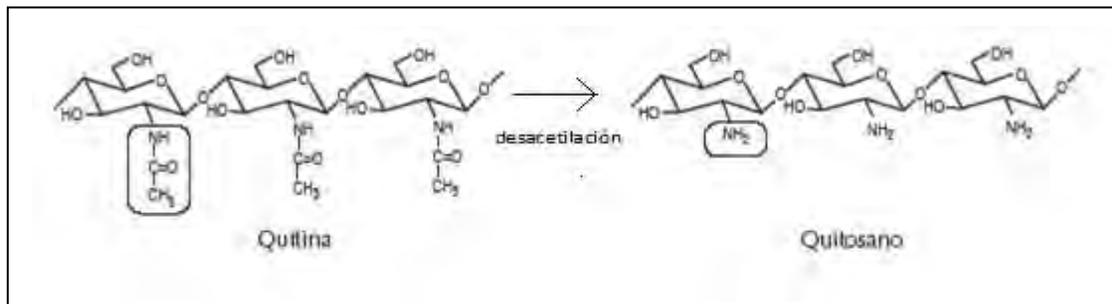


Figura 1. Estructuras químicas de la Quitina y el Quitosán

Debido a su estructura química, la quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido, pero su desacetilación parcial [Figura 1] produce la formación del quitosán, un polisacárido lineal con distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción. Los grupos amino libres del quitosán permiten que éste sea soluble en agua acidificada, lo cual le permite tener una

gran variedad de aplicaciones y gran cantidad de presentaciones (Brzeski 1983, Sandford 1983, Muzzarelli and Muzzarelli 2005).

El quitosán se caracteriza por sus propiedades antifúngicas y antimicrobianas, además puede utilizarse en solución, en forma de película, esferas, hidrogeles, nanopartículas, fibras y recubrimientos, lo cual lo hace útil para gran diversidad de usos en distintas áreas: (Miranda-Castro 2000).

- a) Biomedicina: Debido a su nula toxicidad, se emplea para hacer suturas biodegradables, membranas de hemodiálisis, sustituyentes artificiales de la piel, es agente cicatrizante en quemaduras, se emplea para sistemas liberadores de fármacos, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores, etcétera (Knapczyk et al. 1983, Singh and Ray 2000, Miranda-Castro et al. 2003, Miranda-Castro 2004).
- b) Cosmética: Para la elaboración de cremas para el cuerpo y tratamientos faciales así como para espumas de afeitar.
- c) Biotecnología: Debido a su biocompatibilidad, se ha empleado para la inmovilización de algunas células y enzimas (como la glucosa isomerasa); también se emplea en las camas de los bioreactores para coleccionar metales mediante reacciones de quelación (Hirano et al. 1983, Bautista-Baños et al. 2005).
- d) Tratamiento de aguas: Se usa como un efectivo floculante que permite la precipitación de sustancias indeseables para la purificación de aguas de desecho industrial.
- e) Industria Química: Se emplea en la Industria del papel, textil y alimentaria (como soporte para la inmovilización enzimática en la producción de maltosa, como agente clarificante en bebidas, espesante en alimentos, agente preservante y de oxidación controlada) entre otras (Miranda-Castro 2003, 2004).
- f) Productos Dietéticos: Su administración oral se emplea para disminuir las concentraciones de colesterol en la sangre y como adelgazante al tener la capacidad de atrapar las grasas en el estómago (Muzzarelli and Muzzarelli 2005).
- g) Agricultura y Ganadería: Para el recubrimiento de frutas y semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, formulación de pesticidas, etcétera (Struszczyt et al. 1983, Hirano et al. 1986, Rodríguez-Pedroso y col. 2006, Miranda 2003, Miranda 2007).

5.11 EL QUITOSÁN EN LA AGRICULTURA

Desde la década de los noventa, el quitosán se ha empleado para recubrir frutas y vegetales debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, así como su capacidad para formar películas, las cuales favorecen la preservación de los productos debido a la modificación de la atmósfera interna y a la disminución de las pérdidas por transpiración. Además, el recubrimiento otorga al fruto mayor firmeza y promueve la disminución de la carga microbiológica normal (Devlieghere et al. 2004, Miranda 2003).

Gracias al exitoso resultado del quitosán como biocida, una gran cantidad de investigadores alrededor de todo el mundo comenzaron aplicar el quitosán en semillas agrícolas bajo condiciones de almacenamiento, encontrando una disminución favorable de hongos de almacén incluso en condiciones de alta humedad, y con ello, una disminución de la cantidad de micotoxinas desarrolladas en el grano. (Rivero y col. 2004, Miranda et al. 2007)

Sin embargo, una de las mayores necesidades agrícolas es la protección no solo de las semillas, sino de las plántulas contra enfermedades causadas por patógenos (Barka et al. 2004). Se considera que el quitosán tiene la capacidad de inducir la acumulación masiva de sustancias fungitóxicas en los lugares de aplicación, o bien constituirse en una barrera que impida el flujo de nutrimentos hacia el patógeno (Benhamou et al. 1998). Además, la aplicación de quitosán ha mostrado efectos positivos en el crecimiento de las plantas, tanto en la estimulación de la germinación de las semillas como en el crecimiento de las raíces y hojas. Incluso en algunos casos se ha observado que la estimulación de la germinación de semillas por tratamiento con quitosán ha logrado elevar el porcentaje de germinación a los niveles requeridos para la certificación (Bhaskara et al. 1999).

La capacidad inductora del quitosán no solo puede ser aprovechada para proteger a la planta, sino también se puede utilizar para incrementar el rendimiento de algunas sustancias comercialmente importantes, como lo son algunos metabolitos secundarios como el aceite esencial D-limoneno en algunos cítricos y el mentol en la menta (Chang et al. 1998, Lockwood et al. 2007).

Desde hace algunos años se ha comprobado que el quitosán induce reacciones de defensa en algunas plantas, sensibilizándolas para responder más rápidamente al ataque de patógenos. Entre las sustancias cuya inducción se ve favorecida por la presencia de quitina o quitosán destacan las fitoalexinas, proteínas relacionadas a la patogénesis, inhibidores proteicos y ligninas, la producción de quitinasas y glucanasas, la lignificación en hojas dañadas y la generación de peróxido de hidrógeno (Lárez 2008). Algunos autores plantean que el quitosán interactúa con el ADN celular y genera múltiples reacciones bioquímicas en la planta, provocando como consecuencia la rapidez en la respuesta de la planta ante el ataque de los patógenos (Sathiyabama and Balasubramanian 1998).

El recubrimiento de quitosán en semillas como el arroz, el frijol y la soya ya se ha aplicado con éxito produciendo buenos resultados en las plántulas bajo condiciones específicas (Kaku et al. 2006); de ahí surge el interés por llevar a cabo estudios de inducción de mecanismos de defensa en el maíz, el cultivo más importante de nuestro país.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

La presente experimentación constó de dos etapas: La primera consistió en una serie de pruebas *in vitro* para determinar el posible efecto elicitor del quitosán y su influencia en el desarrollo, crecimiento y germinación de las semillas en estudio; la segunda etapa fue un estudio *in vivo* en donde el experimento se escaló del laboratorio al invernadero para tener una noción más aproximada del comportamiento de las unidades experimentales en condiciones controladas.

6.1 MATERIALES

El material biológico que se utilizó consistió en un grupo de semillas de maíz de alta calidad proteica (QPM) [LM8M CGL123WERG521 L-8] originario de Celaya, Guanajuato, México, con un contenido de humedad de 11.7% y un porcentaje de germinación del 100%. En lo que se refiere al quitosán, (PM=1836.277 g/mol) éste fue obtenido de acuerdo a los protocolos y técnicas diseñados en el Laboratorio de Biotecnología de la FES Cuautitlán, UNAM (Miranda-Castro 2000). Todos los reactivos químicos usados [Anexo 2] que se irán mencionando a lo largo de la metodología, fueron de grado reactivo y alta pureza.

Para la imposición de las condiciones de estrés biótico en las semillas de maíz, se empleó la cepa de *Aspergillus flavus* UNIGRASASP68 obtenida de mazorcas de maíz procedentes de la zona del Bajío, (especie productora de aflatoxinas) y la cepa de *Fusarium moniliforme* UNIGRASFUS44 obtenida de mazorcas de maíz procedentes del Estado de Michoacán, México (especie productora de fumonisinas). Ambas cepas fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 PARTE 1: PRUEBAS PRELIMINARES (ESTUDIO *in vitro*)

A) PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BIOPOLIMÉRICA

Para esta investigación se empleó una solución de Quitosán al 2% la cual se preparó disolviendo 10g del biopolímero en 500mL de agua acidificada con ácido acético, manteniéndose en agitación durante 24 horas y finalmente ajustando el pH a 5.0, para asegurar que, al ser aplicado al grano, el biopolímero pudiera ser absorbido por éste. Puesto que estudios previos referentes al uso de este biopolímero como inhibidor del crecimiento de algunos hongos patógenos demuestran la efectividad del quitosán para este fin aún a una concentración del 1% (Miranda 2007), en este trabajo se empleó una concentración mayor (2%). Se utilizó un quitosán de peso molecular relativamente bajo para que el polímero en solución penetrara más fácilmente en las semillas tratadas.

B) PREPARACIÓN DE LAS ESFERAS DE QUITOSÁN

Las esferas se prepararon goteando la solución anterior en NaOH al 3%. Una vez formadas, las esferas fueron filtradas, lavadas con agua para retirar el exceso de NaOH y secadas durante aproximadamente 36 horas, tiempo en el cual se solidificaron. Las esferas resultantes fueron de aproximadamente un milímetro de diámetro, listas para ser introducidas de manera sistémica en el cultivo (*Ver Sección 6.2.2 D*).

C) RECUBRIMIENTO DE LAS SEMILLAS CON LA SOLUCIÓN BIOPOLIMÉRICA

Las semillas se sumergieron en la solución de quitosán al 2% durante 5 minutos con agitación constante, y luego fueron filtradas y secadas para eliminar el exceso de humedad adquirida por el recubrimiento, ya que es esencial considerar que el quitosán tiene propiedades hidrofílicas importantes.

D) TRATAMIENTOS

Debido a que el quitosán es un compuesto altamente hidrofílico, tiene la capacidad de proporcionar un alto porcentaje de humedad a los granos recubiertos. Por esta razón, fue necesario hacer varias pruebas empleando no solo el biopolímero, sino también involucrando reactivos o técnicas para disminuir el contenido de humedad en las semillas [Tabla 3].

El Polietilenglicol (PEG) a bajas concentraciones se emplea en la Industria Alimentaria y Agroalimentaria para suprimir la humedad en algunos productos y cultivos, y a bajas concentraciones no tiene efectos negativos en el desarrollo de los plántulos ni en la salud del consumidor (Miranda 2003). Por esa razón, se decidió mezclar el quitosán al 2% junto con PEG 4000 al 0.3% y al 0.6%, y con estas nuevas soluciones recubrir a los granos para evaluar las características y las propiedades de la semilla. De igual forma, para no afectar de gran manera al grano con la introducción de químicos, se llevó a cabo un secado "natural" de éste, tal como los productores hacen en el campo. Por esta razón, se secaron en estufa las semillas ya recubiertas con solución de quitosán al 2% a 29°C durante 24 horas para después ser almacenadas y practicar las pruebas de calidad correspondientes.

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	SECADO
1	Control	Sin secado
2	QN 2%	Sin secado
3	QN 2% + PEG 0.3%	Químico
4	QN 2% + PEG 0.6%	Químico
5	QN 2%, T=29°C, 24 hrs.	Natural

Tabla 3. Tratamientos aplicados a las semillas germinadas en el laboratorio.

E) PRUEBAS DE CALIDAD EN LAS SEMILLAS

Para poder determinar si la aplicación de quitosán es una alternativa viable para inducir mecanismos de defensa en las plantas de maíz, primeramente es importante comprobar que el efecto del biopolímero sobre el crecimiento, germinación y vigor de las plántulas no sea negativo. Por tal motivo, para cada uno de los cinco tratamientos se llevaron a cabo tres pruebas de evaluación de calidad en las semillas las cuales se describen a continuación. Tales pruebas fueron practicadas por triplicado para poder obtener resultados estadísticos adecuados.

E.1) DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD POR EL MÉTODO DE SECADO EN ESTUFA (Moreno 1996)

Para esta primera prueba, se emplearon grupos de 10g de semillas de maíz. Inicialmente se pesaron las cajas de aluminio para secado registrándose los pesos de cada una de ellas (W Caja). Posteriormente se pesaron cada una de las cajas con sus correspondientes 10g de maíz, registrándose los pesos para cada una de las repeticiones (W Caja + SH). Las muestras se incubaron a 103°C durante 72 horas para de esta manera eliminar el exceso de humedad presente en la semilla. Transcurrido este tiempo y tras enfriar a temperatura ambiente, se pesaron nuevamente las cajas con los granos ya secos (W Caja + SS). Finalmente se obtuvieron las diferencias de peso correspondientes para así determinar la cantidad de humedad presente en las semillas empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{CH semilla} = (M2-M3) \left(\frac{100}{M2-M1} \right)$$

Donde:

%CH semilla = Porcentaje de contenido de humedad en la semilla

M1= Peso (g) de la caja de aluminio completa (W caja)

M2= Peso (g) de la caja de aluminio completa y las semillas antes del secado en estufa (WC+SH)

M3= Peso (g) de la caja de aluminio completa y las semillas después del secado en estufa (WC+SS)

E.2) PRUEBA DE GERMINACIÓN ESTÁNDAR (Moreno 1996)

Para cada tratamiento, en esta prueba se humectaron dos hojas de papel anchor y se colocaron sobre la mesa de trabajo. Sobre ellas se distribuyeron a distancias semejantes 50 semillas de maíz, colocando el embrión de las mismas hacia abajo para lograr uniformidad en el crecimiento. Posteriormente se cubrieron las semillas con otra hoja de papel anchor húmeda para luego enrollarlas a manera de taco. Por último, los tacos fueron incubados a 25°C durante 4 días para finalmente llevar a cabo el conteo de las semillas germinadas (G), de las plántulas normales (PN), plántulas anormales (PA), semillas muertas (SM) y semillas duras (SD), que sirvieron para determinar los promedios de los porcentajes de germinación de las semillas.

E.3) PRUEBA DE GERMINACIÓN Y VIGOR (LONGITUD DE LA PLÚMULA) (Moreno 1996)

Para cada tratamiento, sobre una hoja de papel anchor se trazaron líneas horizontales de extremo a extremo, de dos en dos centímetros hasta completar los 13 cm. En la parte media de la hoja, se colocó una tira de cinta adhesiva sobre la cual se distribuyeron 25 semillas de maíz con el embrión colocado hacia la parte inferior. Sobre ellas se coloraron dos hojas más y posteriormente se enrollaron formando un taco, el cual fue humedecido de manera homogénea al chorro de agua, haciendo cuatro repeticiones para cada tratamiento. Después los tacos fueron incubados a 25°C durante 7 días para finalmente obtener los promedios de longitud de las plúmulas en base al crecimiento individual de cada una de ellas.

F) *ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS*

Se realizó un análisis de varianzas para experimentos con un factor (el tipo de tratamiento), y diseño completamente aleatorio utilizando el programa computacional Statistica®.

6.2.2 **PARTE 2: PRUEBAS EN INVERNADERO (ESTUDIO *in vivo*)**

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos en la primera parte de la investigación, se decidió emplear el mejor tratamiento para continuar con las pruebas en invernadero. Como se podrá ver más adelante en la sección de los resultados, el tratamiento ideal fue aquel en el que se simuló un secado natural en las semillas de maíz recubiertas con quitosán (semillas de maíz recubiertas con QN al 2% y secadas a 29°C durante 24 horas), por ese motivo, las pruebas *in vivo* se realizaron empleando únicamente este tratamiento.

A) *DISEÑO DEL EXPERIMENTO*

Para esta segunda parte de la experimentación se utilizó un diseño experimental en parcela dividida de dos factores: el tratamiento y el tiempo. Se consideró como una unidad experimental una maceta con diez semillas de maíz QPM sembradas en ella. Cada experimento se efectuó por

triplicado. Las variables de respuesta (longitud de las hojas, longitud de los tallos, grosor de los tallos y longitud total de la plántula) se midieron cada ocho días durante 5 semanas. La parcela completa está representada por cada maceta. Este diseño se utilizó en 4 experimentos diferentes en los que se evaluó el efecto de:

- I. Estrés biótico por *Aspergillus flavus*
- II. Estrés biótico por *Fusarium moniliforme*
- III. Estrés abiótico por pH ácido o alcalino
- IV. Estrés abiótico por condiciones de riego modificadas

B) *PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES PARA LA EXPERIMENTACIÓN*

-LIMPIEZA DEL INVERNADERO

El estudio *in vivo* se realizó en el invernadero de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Previo a la siembra, se llevó a cabo una exhaustiva limpieza del área de trabajo para así asegurar que las condiciones del lugar fueran lo más cercanas a la esterilidad, y de esta manera evitar interferencias en los resultados originadas por la contaminación microbiológica ambiental.

- PREPARACIÓN DE LA TIERRA PARA EL CULTIVO DE MAÍZ

La tierra empleada ya había sido trabajada para otros cultivos de maíz, por esta razón se sabe que era una tierra de calidad para estos fines. Para continuar manteniendo las condiciones de esterilidad, la tierra fue deshierbada, cribada, homogenizada y finalmente esterilizada en autoclaves a 120°C y 15 lb de presión durante 1 hora. Para asegurar la desinfección total, se llevó a cabo un proceso de tindalización.

C) *DISEÑO TEÓRICO DEL CULTIVO EN INVERNADERO*

Para llevar a cabo un cultivo ideal que cubriera todos los requerimientos hídricos de la planta y que se pudiera desarrollar de manera óptima, se hicieron los cálculos pertinentes (Moreno-

Martínez 1996) para determinar la cantidad de agua de riego necesaria para cada unidad experimental [Anexo 3]. Considerando que la capacidad de cada una de las macetas fue de 7 kg de tierra, los cálculos obtenidos nos arrojaron los siguientes datos:

- Capacidad de retención de agua del suelo: 87.32%
- Contenido de humedad del suelo (Peso húmedo): 13.14%
- Contenido de humedad del suelo (Peso seco): 14.68%
- Cantidad diaria de agua de riego por Unidad Experimental: 2400 mL

D) PREPARACIÓN DEL MATERIAL MICROBIOLÓGICO Y CULTIVO EN INVERNADERO

- RESIEMBRA DE LAS ESPECIES FÚNGICAS

Para llevar a cabo la imposición de los estreses bióticos, se emplearon dos cepas fúngicas: *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*. La primera especie se resembró en agar Czapek mientras que la segunda fue resembrada en Agar Dextrosa Papa (PDA). Ambas fueron crecidas a 28°C durante 8 días para obtener hongos esporulados.

- PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

La suspensión de esporas fue preparada según lo descrito por Gilchrist, Fuentes y Martínez (1995). Para tal fin se empleó una solución de Tween 80 al 0.05% y después de la preparación de la solución, las esporas fueron contadas mediante una cámara de Neubauer, dando un concentración final de 10,000 esporas/mL.

- SIEMBRA DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ

En cada maceta se sembraron 10 semillas de maíz QPM a una profundidad de 3 cm. El pH final de la tierra después de haber sido preparada fue de 6.88, por lo tanto, se trata de una tierra neutra. La temperatura de la tierra al momento del cultivo fue de 28°C.

- INOCULACIÓN DE LAS SEMILLAS (ESTRÉS BIÓTICO)

Las semillas que se estresaron de manera biótica fueron divididas en dos grupos: las semillas sanas y las semillas que previamente fueron sometidas a daño mecánico. Ambos grupos fueron inoculados aplicando directamente a cada semilla una alícuota de 10 mL de la solución de esporas preparada previamente, esto es, en total se llevó a cabo una una adición de 100 000 esporas por semilla. Posteriormente las semillas fueron cubiertas con la tierra y las macetas fueron tapadas con bolsas de plástico para que, por efecto de la humedad, se asegurara la infección de la semilla por el hongo.

- APLICACIÓN DE LAS ESFERAS DE QUITOSÁN

Las esferas de quitosán previamente preparadas fueron adicionadas directamente sobre las unidades experimentales correspondientes (*Ver Tabla 4*). Esto se logró colocando uniformemente sobre la semilla (sembrada a 3 cm de profundidad) un total de 15 esferas de quitosán, las cuales fueron humedecidas con 1mL de agua y posteriormente cubiertas con tierra al igual que el resto de las unidades experimentales.

- IMPOSICIÓN DE LAS CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO

En cuanto al estrés abiótico se refiere, las condiciones de riego modificadas consistieron en simular condiciones de sequía y condiciones de humedad. Para el primer caso, las unidades experimentales se sometieron a riegos de 2400 mL cada 3 días, mientras que las que simularon condiciones de humedad fueron regadas diariamente con 4800 mL de agua. Por otra parte, la modificación del pH de los cultivos se logró, por un lado, mediante la acidificación de la tierra con ácido fosfórico al 0.1%, disminuyendo el potencial de hidrógeno hasta 5.30, mientras que por el otro lado, la alcalinización se logró imponiendo las propiedades de un suelo calcáreo mediante la adición de carbonato de calcio 0.02M, logrando un incremento del pH hasta 8.00 (Aguirre 2001).

En la *Tabla 4* que a continuación se presenta, se resumen los tratamientos para cada tipo de estrés:

TRATAMIENTO	ESTRÉS BIÓTICO	ESTRÉS ABIÓTICO
Control (-)	Semilla sin estrés y sin recubrimiento	Semilla sin estrés y sin recubrimiento
Control (+)	Semilla con estrés y sin recubrimiento	Semilla con estrés y sin recubrimiento
Tratamiento 1	Semilla con estrés y con recubrimiento de QN	Semilla con estrés y con recubrimiento de QN
Tratamiento 2	Semilla con daño mecánico, con estrés y recubrimiento de QN	Semilla con estrés, esferas y con recubrimiento de QN
Tratamiento 3	Semilla con daño mecánico, con estrés, esferas y recubrimiento de QN	

Tabla 4. *Tratamientos aplicados a las semillas cultivadas en el invernadero.*

- EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES (5 SEMANAS)

La evaluación del crecimiento y desarrollo de las plántulas se llevó a cabo mediante la observación de los aspectos físicos generales y de las mediciones semanales, durante 5 semanas, del número de semillas germinadas, longitud de las hojas, longitud de los tallos, grosor de los tallos y longitud total de la plántula.

E) *ANÁLISIS POST-CULTIVO*

- EXTRACCIÓN DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES DE LA TIERRA DE CULTIVO

Ya transcurridas las 5 semanas de cultivo y evaluación, las plántulas fueron extraídas de la tierra tratando de no dañar las raíces. Una vez extraídas, fueron lavadas y se cortaron las hojas, tallos y raíces para ser almacenados en congelación de manera independiente, ya que este material podrá ser usado para la identificación de los genes que se expresan diferencialmente como consecuencia de la adición del quitosán a la semilla para la activación de mecanismos de defensa.

- DETERMINACIÓN DE PESO SECO

Parte del material no fue congelado, sino que fue sometido a secado para determinar el peso seco de las plántulas de acuerdo a los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas. Para ello, las estructuras de la planta fueron almacenadas de manera independiente en bolsas de papel e

incubadas durante 72 horas a 103°C para finalmente ser pesadas y registrar los pesos correspondientes.

- SIEMBRA EN AGAR DE ESTRUCTURAS FOLIARES

Finalmente, se cortó una pequeña porción de la estructura foliar de las plántulas y se colocó en cajas petri con agar PDA. Se incubó a 28°C durante 8 días para observar el crecimiento microbiano.

F) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Como se explicó en la *Sección 6.2.2.A*, cada uno de los cuatro grupos con sus respectivos tratamientos fue analizado de manera independiente mediante un análisis de varianzas (ANOVA) para experimentos con observaciones repetidas empleando el programa computacional Statistica®.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 PARTE 1: PRUEBAS PRELIMINARES (ESTUDIO *in vitro*)

7.1.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD POR EL MÉTODO DE SECADO EN ESTUFA.

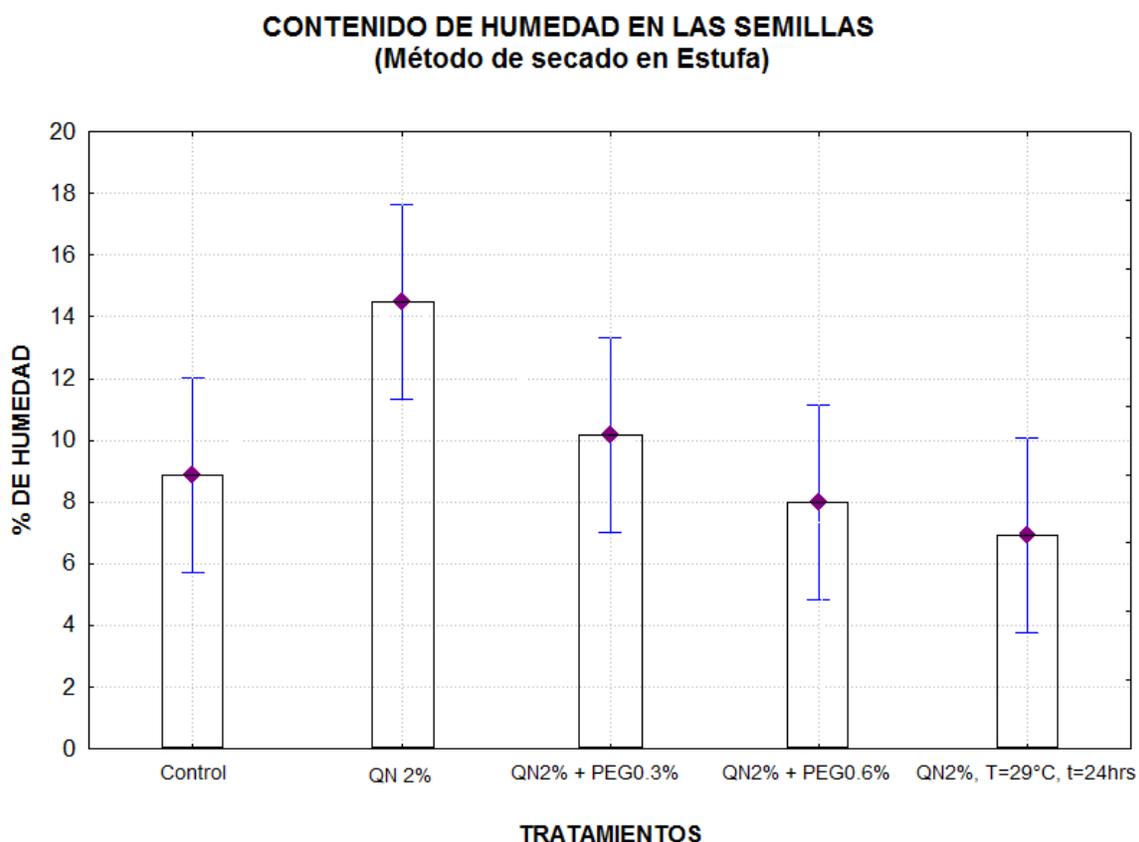
A continuación se muestran los resultados obtenidos de acuerdo a los cálculos efectuados para determinar el contenido de humedad de las semillas de maíz por el método de secado:

CAJA	TRATAMIENTO	M1 (W CAJA, g)	M2 (WC+SH, g)	M3 (WC+SS, g)	W SEMILLA (g)	AGUA (g)	CH SEMILLA (%)	\bar{x}
1	Control	14.25	23.9	23.15	8.9	0.75	7.772020725	8.87086681
2		15.15	25.5	24.5	9.35	1	9.661835749	
3		13.35	23.7	22.75	9.4	0.95	9.178743961	
4	QN 2%	13.5	23.9	22.4	8.9	1.5	14.42307692	14.4876829
5		13.9	24.6	23.05	9.15	1.55	14.48598131	
6		13.7	24.35	22.8	9.1	1.55	14.55399061	
7	QN 2% +	12.925	24.525	23.25	10.325	1.275	10.99137931	10.1814294
8	PEG 0.3%	14.1	24.5	23.1	9	1.4	13.46153846	
9		13.65	23.5	22.9	9.25	0.6	6.091370558	
10	QN 2% +	14.1	23.675	23.15	9.05	0.525	5.483028721	7.96591089
11	PEG 0.6%	13.2	24	22.875	9.675	1.125	10.41666667	
12		14.25	24.44	23.625	9.375	0.815	7.998037291	
13	QN 2% +	15.125	26.35	25.35	10.225	1	8.908685969	6.9246738
14	T=29°C	13.55	23.1	22.3	8.75	0.8	8.376963351	
15	t=24 hrs	13.3	21.9	21.6	8.3	0.3	3.488372093	

Tabla 5. Contenido de humedad de las semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos, en donde M1= Peso (g) de la caja de aluminio completa (W caja); M2= Peso (g) de la caja de aluminio completa y las semillas antes del secado en estufa (WC+SH); M3= Peso (g) de la caja de aluminio completa y las semillas después del secado en estufa (WC+SS); W=Peso (g) de la semilla; CH=Contenido de Humedad y \bar{x} =Media de los contenidos de humedad para cada tratamiento.

Como puede apreciarse en la *Tabla 5*, el contenido de humedad de las semillas varía de acuerdo al tipo de tratamiento aplicado para su recubrimiento. De acuerdo al análisis de varianzas correspondiente (empleando un valor $\alpha=0.05$) puede verse que el tratamiento que le confirió mayor humedad a las semillas corresponde al recubrimiento con solución de quitosán (*Gráfica 1*), mientras que el tratamiento que le confirió menor porcentaje de humedad a las semillas fue aquél

que involucró el secado “natural”, existiendo una diferencia significativa entre ambos tratamientos [Anexo 4 Parte 1.1a].



Gráfica 1. Porcentajes de humedad registrados para cada uno de los tratamientos estudiados (promedios e intervalos de confianza al 95%, $p=0.028$)

Al analizar la *Gráfica 1*, se puede ver que las semillas recubiertas con quitosán presentan una humedad promedio superior al control en un 5.6%. Pese a que no existe diferencia significativa entre las medias de estos dos tratamientos, el recubrimiento con quitosán al 2% no se considera un tratamiento viable ya que la semilla, con un porcentaje de humedad tan elevado (14.48%), es muy susceptible para ser atacada por patógenos. En el caso de los tratamientos en los que se empleó el PEG 4000 como un supresor de humedad de carácter químico, la combinación del QN con PEG al 0.6% resulta muy efectiva, pues la humedad proporcionada por el biopolímero disminuye igualando a la media presentada por el control. Sin embargo, el secado “natural” resultó ser el tratamiento óptimo para lograr la máxima supresión de humedad, presentando una diferencia significativa de aproximadamente el 5.56% al compararse con la humedad medida para las semillas recubiertas con QN.

7.1.2 PRUEBA DE GERMINACIÓN ESTÁNDAR

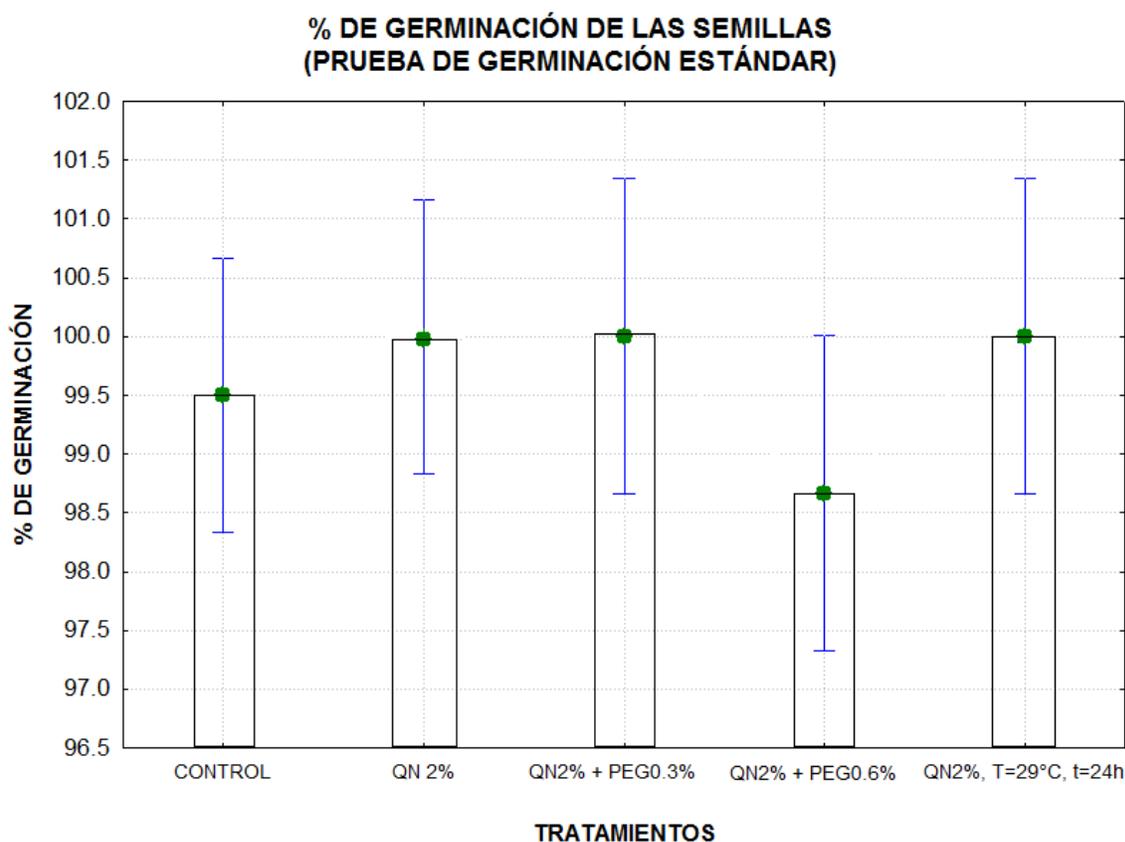
Observando de manera cualitativa los resultados obtenidos después de cuatro días de germinación de los maíces en estudio, pudo apreciarse claramente que la plántula presentó un sistema radicular bien desarrollado, ya que tanto las raíces primarias como las raíces secundarias fueron lo suficientemente gruesas y largas, especialmente aquellas correspondientes a las semillas que habían sido recubiertas con QN al 2% y aquellas a las que además se les sometió a secado natural. Las semillas recubiertas en combinación con PEG, se caracterizaron por producir raíces ligeramente adelgazadas, sin embargo, la longitud promedio de las mismas es semejante al resto de los tratamientos superando los 7cm de largo. Las plúmulas en todos los casos presentaron longitudes mayores a los 3cm. Después del cuarto día, en la punta de la plúmula se observó una coloración verde, lo cual es indicativo del próximo nacimiento del brote inicial, del embrión como tal y de la plántula joven.

TRATAMIENTO	TOTAL DE SEMILLAS	MUESTRA	1° CONTEO		CONTEO FINAL				% DE GERMINACIÓN	\bar{x}
			PN	G	PN	PA	SM	SD		
CONTROL	200	1	50	50	50	0	0	0	100	99.50%
		2	50	50	50	0	0	0	100	
		3	50	50	50	0	0	0	100	
		4	49	49	49	0	1	0	98	
QN 2%	200	5	50	50	50	0	0	0	100	100%
		6	49	50	49	1	0	0	100	
		7	50	50	50	0	0	0	100	
		8	49	50	49	1	0	0	100	
QN 2% PEG 0.3%	75	9	25	25	25	0	0	0	100	100%
		10	25	25	25	0	0	0	100	
		11	25	25	25	0	0	0	100	
QN 2% PEG 0.6%	75	12	25	25	25	0	0	0	100	98.66%
		13	24	24	24	1	0	0	96	
		14	25	25	25	0	0	0	100	
QN 2% T° = 29°C t = 24 hrs	72	15	24	23	24	1	0	0	100	100%
		16	24	24	24	0	0	0	100	
		17	24	24	24	0	0	0	100	

Tabla 6. Porcentajes de germinación estándar de las semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos; en donde PN=Plántulas Normales, G=Semillas Germinadas, PA=Plántulas Anormales, SM=Semillas Muertas, SD=Semillas Duras y \bar{x} =Media de los porcentajes de germinación para cada tratamiento.

Analizando los resultados obtenidos de manera cuantitativa, la *Tabla 6* anteriormente presentada, permite confirmar la alta calidad del maíz que se está estudiando, debido a que en todos los casos el porcentaje de germinación de las semillas con los diferentes tratamientos se aproxima al 100%.

A través del análisis de varianzas correspondiente cuyos resultados se incluyen en el *Anexo 4 Parte 1.1b*, puede apreciarse que en ninguno de los casos existe una diferencia significativa ($p=0.48112$) en el porcentaje de germinación presentado comparado con respecto al grupo control (*Gráfica 2*). De acuerdo a los datos arrojados por esta prueba, puede decirse que cualquiera de los tratamientos que se utilice dará resultados de germinación óptimos, por lo tanto la prueba de germinación estándar no es decisiva para determinar el tratamiento a aplicar en la segunda parte de la investigación.



Gráfica 2. Porcentajes de germinación de las semillas registrados para cada uno de los tratamientos estudiados (promedios e intervalos de confianza al 95%, $p=0.48112$).

Después de los 4 días de evaluación, los granos se mantuvieron en las mismas condiciones durante un par de días más, tiempo en el cual se observó el crecimiento de algunos hongos en las muestras

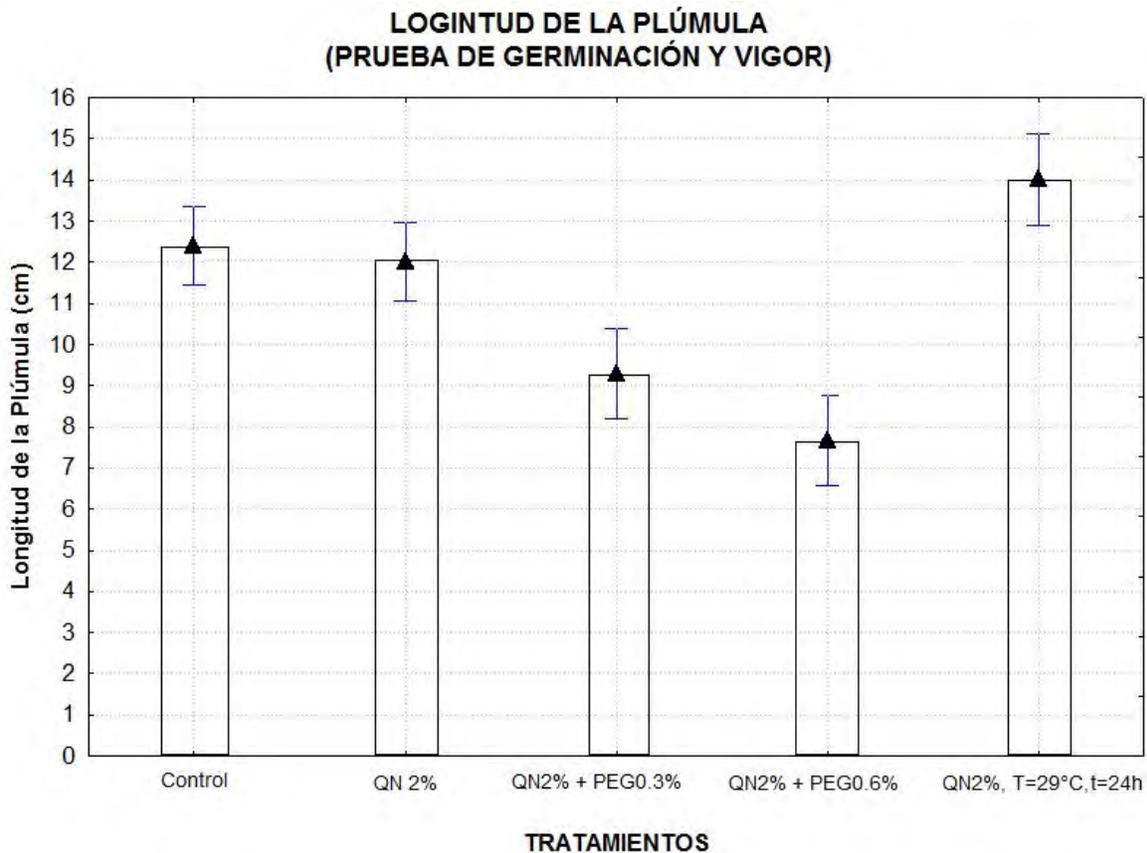
correspondientes al grupo control, mientras que aquellas que fueron tratadas con QN al 2%, ya sea solo o en combinación, presentaron una menor cantidad de hongos en la semilla, dando entonces la pauta a pensar de que el biopolímero puede ser empleado como protector del maíz contra microorganismos patógenos propios del cultivo.

7.1.3 PRUEBA DE GERMINACIÓN Y VIGOR (LONGITUD DE LA PLÚMULA)

Esta prueba fue decisiva para determinar el tipo de tratamiento usado para recubrir los granos en el experimento sin que el recubrimiento afecte las propiedades del cultivo.

TRATAMIENTO	TOTAL DE SEMILLAS	# TACO	SM	SA	SD	Longitud de las plántulas (cm)							Σ (cm)	\bar{x} (cm)	PROMEDIOS (cm)
						3	5	7	9	11	13	15			
CONTROL	25	1	1	0	0	0	0	0	5	9	5	5	284	11.83	12.4115
	25	2	0	0	0	0	1	2	0	7	8	7	305	12.2	
	25	3	0	0	0	0	0	1	2	11	3	8	305	12.2	
	24	4	0	1	0	0	0	1	1	3	6	13	322	13.416	
QN 2%	24	5	0	1	0	0	0	0	7	7	8	2	274	11.41	11.99
	25	6	0	0	0	0	0	1	3	6	4	11	217	12.63	
	25	7	0	0	0	0	1	2	2	8	10	2	285	11.4	
	25	8	0	0	0	0	1	1	3	3	7	10	313	12.52	
QN 2% PEG 0.3%	24	9	0	2	0	2	7	9	3	2	0	0	196	8.16	9.28666667
	24	10	0	1	0	2	1	10	7	4	0	0	264	11	
	24	11	0	1	0	1	4	8	5	3	3	0	209	8.7	
QN 2% PEG 0.6%	23	12	0	1	0	0	3	12	4	2	3	0	153	6.65	7.66666667
	24	13	0	1	0	0	1	3	5	4	8	3	188	7.83	
	24	14	0	1	0	0	2	8	6	2	4	1	196	8.52	
QN 2% T° = 29°C t = 24 hrs	24	15	0	0	0	0	0	0	0	3	5	16	338	14.08	14.012
	23	16	0	1	0	0	0	0	1	1	5	16	325	14.13	
	23	17	0	1	0	0	0	0	1	0	1	20	318	13.826	

Tabla 7. Promedios de las longitudes de las plúmulas de las semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos, en donde SM=Semillas Muertas, SA=Semillas Anormales y SD=Semillas Duras. Los números 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 en el encabezado de la tabla corresponden a los centímetros que midieron las plúmulas de las semillas germinadas, y debajo de cada cifra se encuentra el número de plántulas que registraron esas dimensiones. Σ = Sumatoria total de las longitudes de las plántulas (cm) y $\bar{x} = \Sigma / \text{Total de semillas}$ (cm). La última columna corresponde a los promedios totales de las longitudes de las plúmulas para cada tratamiento.



Gráfica 3. Longitudes de las plúmulas de las semillas de maíz sometidas a los tratamientos estudiados (promedios e intervalos de confianza al 95%, $p=0.00001$).

Como puede apreciarse en la *Tabla 7* y en la *Gráfica 3*, los promedios de longitud de las plúmulas para cada uno de los casos son muy variables: Las menores longitudes registradas corresponden a aquellas semillas tratadas con QN al 2% en combinación con PEG a diferentes concentraciones, mientras que la mayor longitud registrada corresponde a las semillas tratadas y secadas de manera “natural”, las cuales rebasan al control en 1.6cm. El control y las semillas recubiertas exclusivamente con quitosán presentan longitudes semejantes entre sí.

Analizando los datos desde el punto de vista estadístico [*Anexo 4 Parte 1.c*] se puede observar que existe una diferencia significativa ($p=0.00001$) entre las longitudes registradas para aquellas semillas tratadas con QN en combinación con PEG a sus diferentes concentraciones comparándolas con el resto de los tratamientos, motivo por el cual se descarta el secado químico como un posible tratamiento para las semillas de maíz en estudio.

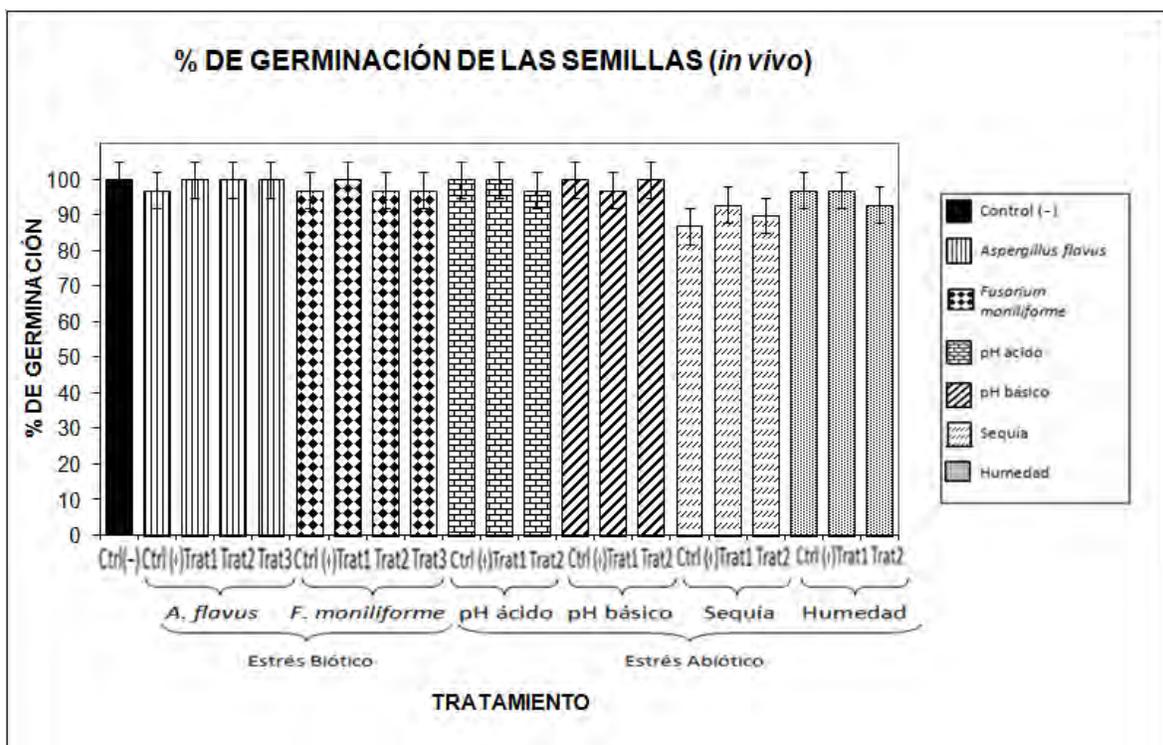
7.1.4 DECISIÓN

De acuerdo a los resultados presentados en las secciones anteriores, se decidió que el mejor tratamiento para lograr la mayor calidad en el cultivo a partir de las semillas estudiadas consistió en recubrirlas con quitosán y secarlas a 29°C durante 24 horas, ya que bajo estas condiciones, presentan un porcentaje de germinación del 100%, un porcentaje de humedad de tan solo 6.9% y una longitud de plúmula de 14 cm, siendo aún mayor que la longitud presentada por las plántulas provenientes de semillas recubiertas con quitosán y sin secado alguno.

6.2 PARTE 2: PRUEBAS EN INVERNADERO (ESTUDIO *in vivo*)

7.2.1 GERMINACIÓN *in vivo* DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ QPM

A continuación se presentan los resultados correspondientes a lo obtenido a lo largo de la experimentación en invernadero. La *Gráfica 4* corresponde al porcentaje de germinación de las semillas cultivadas. Cabe mencionar que estos datos fueron analizados empleando un nivel de significancia de 0.05.



Gráfica 4. Porcentaje de germinación de las semillas de maíz QPM de acuerdo al tratamiento y a las diferentes condiciones de cultivo. El Control (-) es el mismo para todos los estreses.

Como puede apreciarse en la *Gráfica 4*, la mayoría de las semillas presentan un alto porcentaje de germinación. Esta respuesta indica que el tratamiento aplicado a las semillas y las condiciones bajo las cuales fueron cultivadas no interfieren en su capacidad germinativa. Sin embargo, en un análisis detallado, se puede observar que las barras correspondientes al estrés abiótico por sequía presentan un menor porcentaje de germinación comparado tanto con el Control (-) como con el resto de los estreses, lo cual indica que bajo condiciones de escasas de agua, la semilla no es capaz de germinar de manera normal.

Por otra parte, también puede observarse que bajo la mayoría de las condiciones, las semillas recubiertas con QN presentan un mayor porcentaje de germinación comparado con el resto de los tratamientos bajo las mismas condiciones, sin embargo, estos datos no son estadísticamente significativos.

Cabe hacer hincapié en que las especificaciones técnicas de la semilla utilizada indican que su porcentaje de germinación es del 100%, por lo tanto, era de esperarse que independientemente del tratamiento aplicado, las semillas germinaran en su totalidad.

7.2.2 ESTRÉS BIÓTICO: *Aspergillus flavus*

Muchos autores que han trabajado con el hongo *Aspergillus flavus* en cultivos de maíz han reportado que éste es un hongo que se manifiesta directamente en la mazorca; sin embargo, a través de la presente investigación se encontró que existen pequeñas diferencias estadísticamente significativas con respecto a las longitudes de las plántulas, y conforme pasa el tiempo se observan daños físicos en la misma así como algunas variaciones en cuanto a su crecimiento comparadas con el control.

La *Figura 2* muestra las plántulas estresadas con *Aspergillus flavus* después de tres semanas de haber sido cultivadas y sometidas a diferentes tratamientos. Como puede verse, la plántula con mayor longitud y mayor follaje es aquella correspondiente al Tratamiento 1, es decir, aquella cuya semilla fue recubierta con quitosán. La plántula menos desarrollada es la correspondiente al Tratamiento 3, es decir, la que posee esferas de QN. Los Controles presentan aparentemente las mismas longitudes, mientras que el Tratamiento 2 es el que propicia que la plántula tenga hojas más pequeñas, amarillas, cloróticas y muy escasas. Cabe mencionar que las plántulas tratadas con esferas de quitosán presentaron un crecimiento lento, ya que durante la primera semana solamente habían germinado la mitad de las semillas y las primeras hojas presentaron síntomas de enfermedad. Esta manifestación puede ser debida a que las esferas de quitosán alcalinizan en exceso a la plántula (ya que como recordaremos, las esferas fueron elaboradas con solución de Hidróxido de Sodio), impidiendo una adecuada disposición de nutrientes sumada a la nula degradación de las esferas presentes en la tierra.

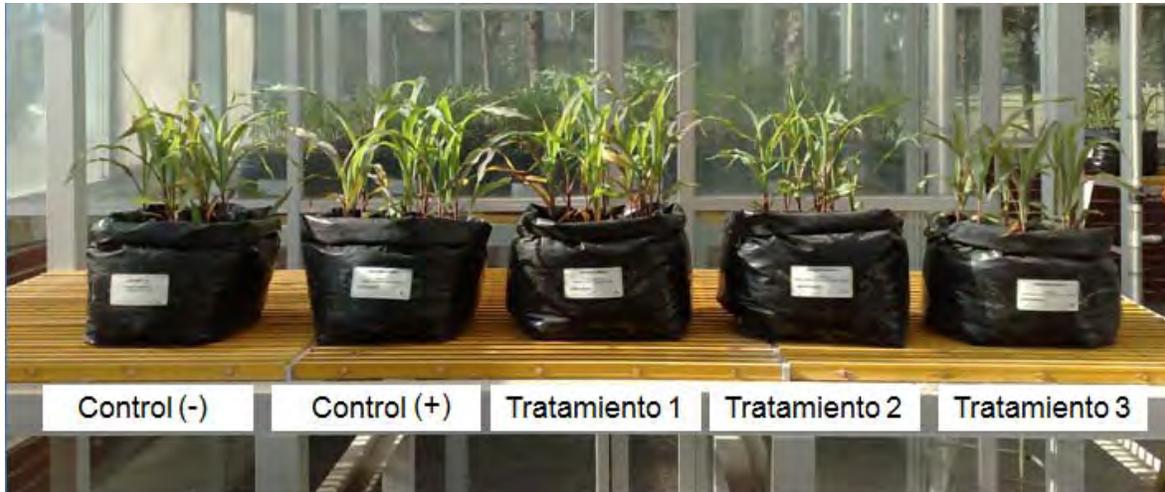
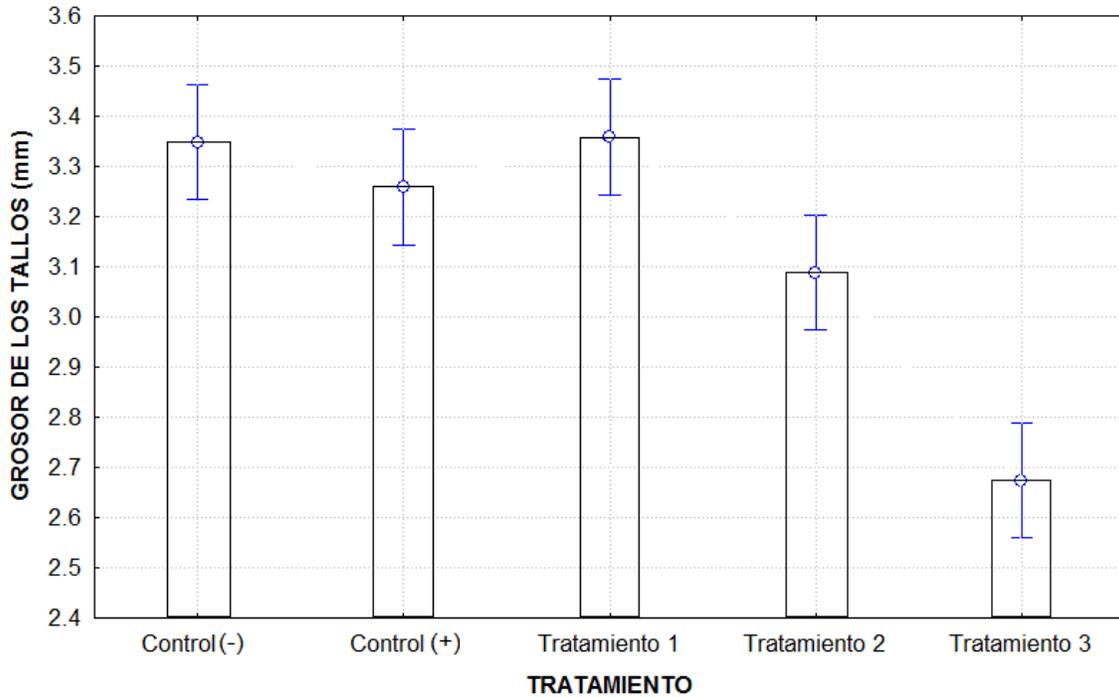


Figura 2. Crecimiento de las plántulas de maíz con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas y estresadas por *Aspergillus flavus*.

En la *Parte 2.1 del Anexo 4*, se muestra el resumen de los análisis de varianzas calculados para las plantas sometidas a este tipo de estrés. Los efectos que están señalados con asterisco, son aquellos cuyo valor de probabilidad es estadísticamente significativo. Debido a que, para todos los casos y para todos los estreses existe más de un efecto significativo y en ocasiones existen interacciones importantes entre los efectos, a continuación sólo se presentarán las gráficas más representativas para cada experimento, es decir, en caso de que exista interacción se presentará únicamente la gráfica correspondiente, mientras que para los efectos aislados solo se presentarán las gráficas que nos aporten datos esenciales para el análisis de los resultados de la presente investigación. Los resultados cuantitativos obtenidos se analizaron empleando diferentes niveles de significancia los cuales oscilaron entre 0.05 y 0.30, de manera que las diferencias significativas entre tratamientos pudieran ser más evidentes. Las pruebas *a posteriori* para determinación de diferencias significativas presentadas en el *Anexo 4 Parte 2*, fueron realizadas empleando un nivel de significancia de 0.05.

En lo que se refiere al estrés biótico por *Aspergillus flavus*, se puede ver que el tiempo es un factor importante en el crecimiento de la planta independientemente del tratamiento aplicado. El grosor de los tallos es la única característica que se ve afectada por el tratamiento, mientras que la longitud de la plántula depende de la interacción existente entre el tiempo y el tratamiento utilizado.

GROSORES DE LOS TALLOS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO (Estrés biótico por *Aspergillus flavus*)

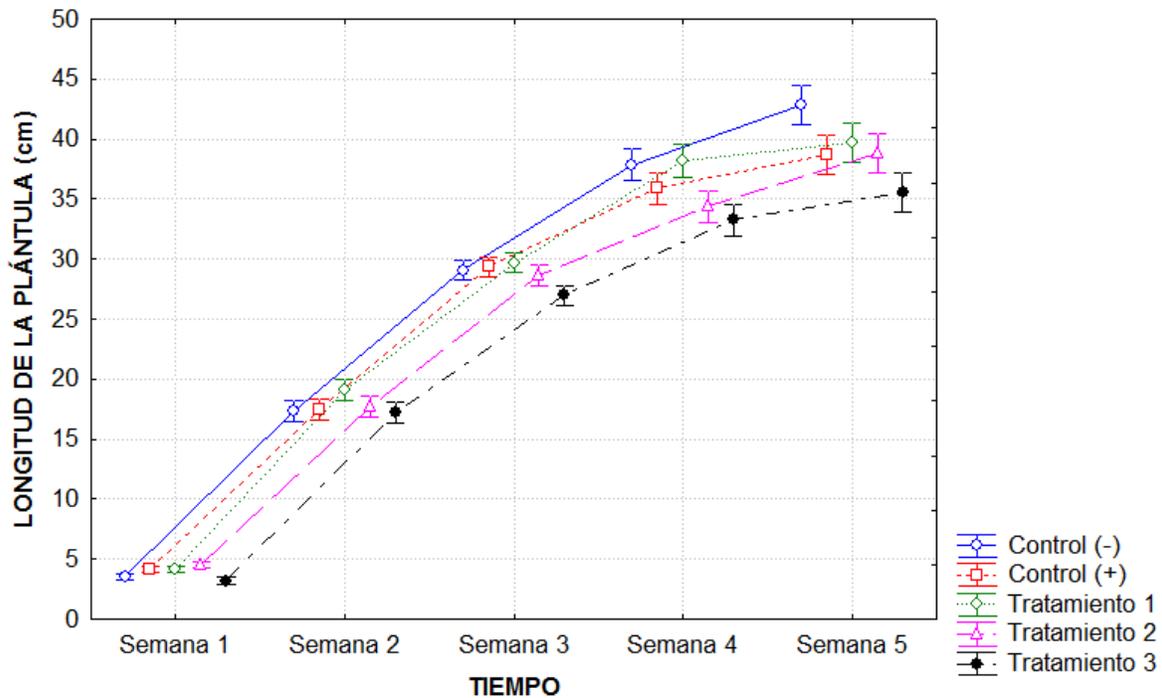


Gráfica 5. Grosos de los tallos de las plántulas de maíz infectadas por *Aspergillus flavus* de acuerdo al tratamiento ($p=0.00490$).

La *Gráfica 5* muestra los promedios de los grosos de los tallos de acuerdo al tratamiento aplicado. Con estos resultados se puede descartar el tratamiento con esferas de quitosán como una posible alternativa para lograr plántulas más largas y con tallos más gruesos, pues este tratamiento es el que da tallos más delgados, seguidos por aquellos correspondientes a las semillas que fueron dañadas mecánicamente, inoculadas y posteriormente recubiertas con quitosán. No existe diferencia significativa entre los grosos de los tallos de las plántulas provenientes de las semillas control y aquellas recubiertas con quitosán; sin embargo el comportamiento de las plántulas con Tratamiento 1 es casi igual al Control (-). Cabe mencionar que tanto para el caso del grosor de los tallos como para las longitudes de éstos y de las hojas, las evaluaciones se hicieron a partir de la segunda semana de crecimiento en la que el cultivo llegó a su primera etapa vegetativa, ya que en la primera semana solo se tenían pequeñas plúmulas (etapa cero) que no arrojaban datos significativos para los fines de esta investigación.

LONGITUDES DE LAS PLÁNTULAS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO CON RESPECTO AL TIEMPO

Estrés biótico por *Aspergillus flavus*
(Interacción tiempo-tratamiento)



Gráfica 6. Longitud total de las plántulas de maíz infectadas por *Aspergillus flavus* de acuerdo al tratamiento ($p=0.01767$).

La Gráfica 6 muestra el desarrollo de la plántula durante las primeras 5 semanas de crecimiento. Con respecto al tiempo, la longitud es logarítmica independientemente del tratamiento aplicado. Puede observarse que durante las primeras dos semanas, la tendencia de crecimiento de las plántulas (sin importar el tratamiento) es muy semejante. En la tercera semana comienzan a verse pequeñas variaciones entre los tratamientos, ya que por ejemplo, el crecimiento de la plántula adicionada con esferas no es tan acelerado como con el resto de los tratamientos, existiendo una diferencia significativa importante comparándola con el Control negativo. En la cuarta semana puede verse que las plántulas originarias de semillas recubiertas con quitosán (Tratamiento 1) presentan una mayor longitud siendo estadísticamente diferente con respecto al Control positivo ($p=0.01767$) y con los Tratamientos 2 y 3; sin embargo, para la quinta semana, la longitud de las plantas se ve afectada, ya que comparándola con el Control negativo, éste es el que presenta una mayor longitud mientras que tanto el Control positivo como el resto de los tratamientos comienzan a detener su crecimiento debido a la presencia del hongo. Es evidente que las

plántulas sometidas al Tratamiento 3 tienen escaso crecimiento de la semana 4 a la semana 5, mientras que las sometidas a Tratamiento 2 siguen creciendo significativamente con respecto a la semana anterior. En el caso de las plántulas sometidas a los Tratamientos 1 y 3, no existe diferencia significativa en el crecimiento de la semana 4 a la semana 5.

A partir de esta gráfica se puede ver que ninguno de los tratamientos es totalmente efectivo para lograr un crecimiento normal en la planta infectada con *Aspergillus flavus* e incluso en el Control positivo es evidente un crecimiento anormal desde la cuarta semana; es por ello que se piensa que este hongo no se manifiesta única y directamente en la mazorca, sino que daña a la planta desde su segunda etapa vegetativa fenológica.

Para llevar a cabo el análisis microbiológico cualitativo, por cada tratamiento se sembraron en cajas petri 3 muestras de estructuras foliares de diferentes unidades experimentales las cuales se incubaron para su estudio posterior. De acuerdo a la *Figura 3*, puede apreciarse que es probable que el QN tenga la capacidad de introducirse de manera sistémica a la planta y manifestarse en las hojas mediante la inhibición del crecimiento fúngico, ya que, comparada con el resto, la placa de agar correspondiente al Tratamiento 1 (semillas con recubrimiento de quitosán) se ve limpia. En la imagen correspondiente al Control (-), puede apreciarse el crecimiento de *A. flavus*, lo cual indica que, a pesar de que la semilla cultivada es de alta calidad, viene contaminada por el hongo, y cuando se aumenta la cantidad de inóculo (como en el caso del Control (+)), es evidente la presencia de otra variedad de *Aspergillus*, pudiendo ser incluso *A. niger* el cual es, al igual que *A. flavus*, un hongo potencialmente dañino cuando es consumido por humanos o animales (Abarca 2000, Bolet y Socarrás 2005).



Figura 3. Siembra en agar PDA de las estructuras foliares de las plántulas infectadas por *A. flavus* y sometidas a los diferentes tratamientos.

Llama la atención el hecho de que en las placas correspondientes al Tratamiento 1, no se evidencia carga microbiológica alguna, por lo tanto existe la posibilidad de que haya habido algún error en la siembra en agar o algún factor externo haya interferido en los resultados, ya que es poco probable que la flora normal de la planta desaparezca por efecto del tratamiento aplicado.

Resumiendo los resultados anteriores se tiene que:

- Cualitativamente, las plántulas que presentan hojas más verdes y con menor manifestación de enfermedad son las tratadas con recubrimiento de QN (Tratamiento 1).
- Una alta concentración de esporas de *Aspergillus flavus* en las semillas de maíz produce plántulas con tallos muy delgados los cuales no se engrosan con la aplicación de quitosán a las semillas.
- El recubrimiento biopolimérico combinado con las esferas de QN no es un tratamiento viable para evitar el daño por *A. flavus* en semillas con daño mecánico en cuanto al grosor de los tallos se refiere, ya que es ésta la primera manifestación de enfermedad en la planta causada por el hongo.
- El crecimiento de la plántula presenta un comportamiento logarítmico independientemente del tratamiento aplicado, sin embargo, este se ve atenuado por la invasión del patógeno.
- Existe diferencia significativa entre las longitudes de las plántulas infectadas con *Aspergillus flavus* y las plántulas sanas.
- No existe diferencia significativa entre las longitudes de las plántulas infectadas y sometidas a los diferentes tratamientos con quitosán, sin embargo sí existe diferencia si se compara con el Control (-).

- *Aspergillus flavus* es un hongo que afecta el desarrollo normal del cultivo desde su segunda etapa fenológica, manifestándose el daño desde la cuarta semana de crecimiento.
- Parece ser que el recubrimiento de QN en las semillas inhibe el crecimiento fúngico y es evidenciado a nivel foliar.
- Las esferas de quitosán en NaOH no son un buen tratamiento para el mejoramiento del crecimiento y desarrollo de las plántulas de maíz.

7.2.3 ESTRÉS BIÓTICO: *Fusarium moniliforme*

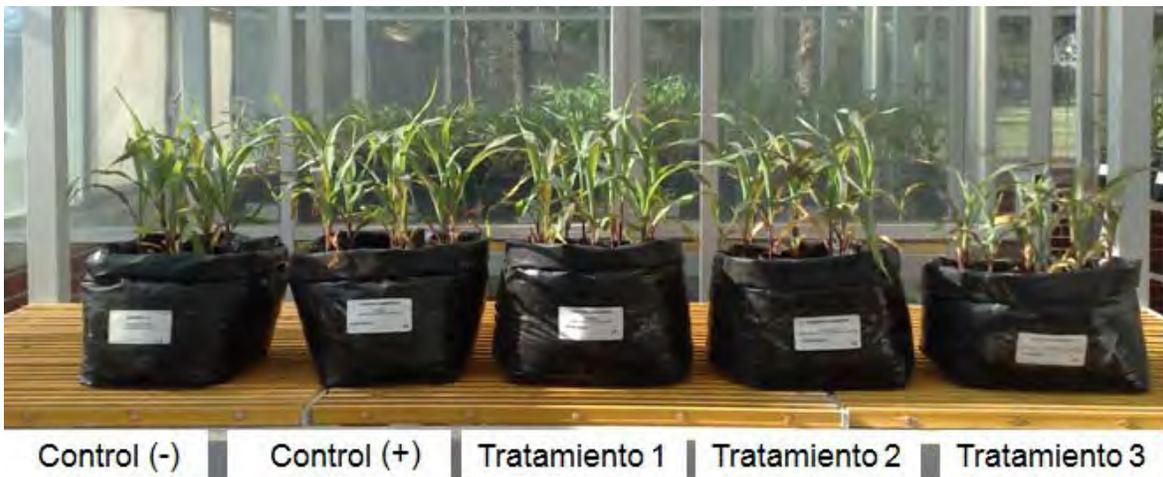


Figura 4. Crecimiento de las plántulas de maíz con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas y estresadas por *Fusarium moniliforme*.

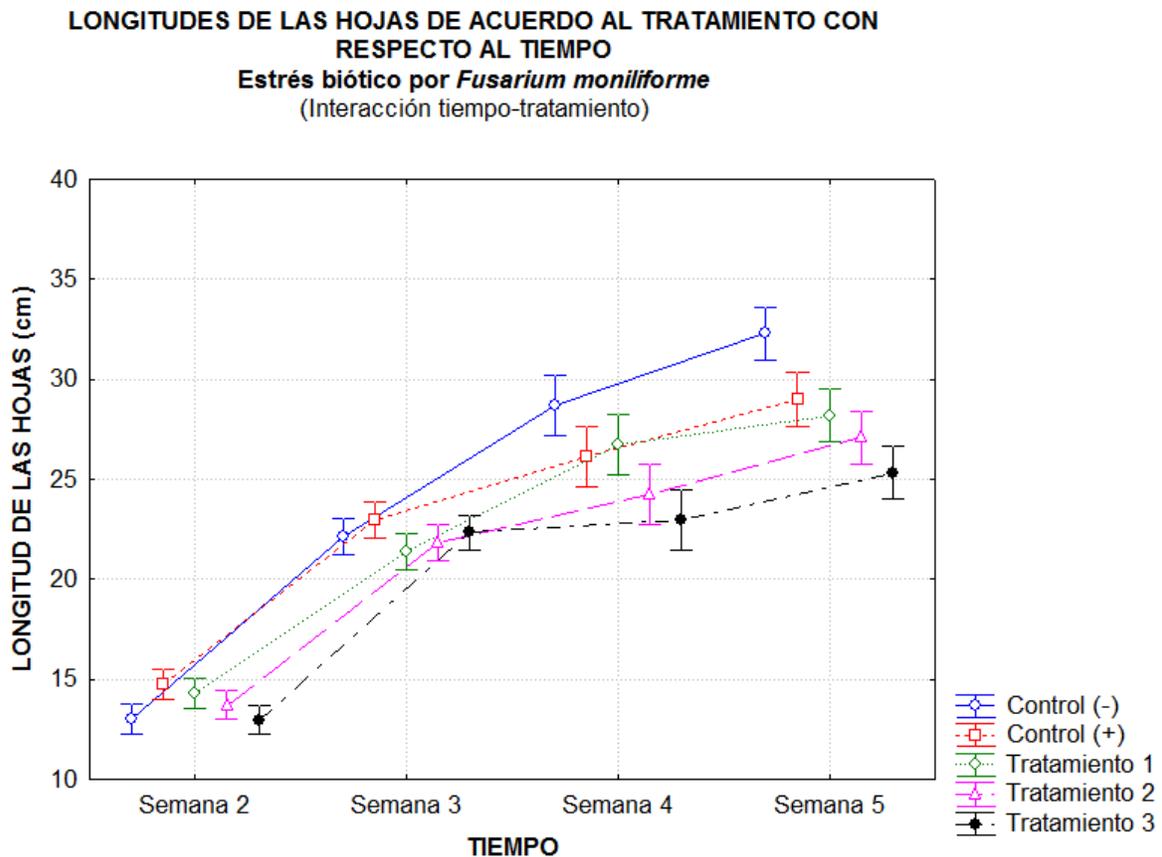
La *Figura 4* muestra el crecimiento de las plántulas estresadas con *Fusarium moniliforme* después de tres semanas de haber sido cultivadas y sometidas a los diferentes tratamientos. Aquí, es evidente que bajo estas condiciones de estrés, la adición de esferas de QN a la planta (Tratamiento 3) no es un tratamiento efectivo para lograr un buen desarrollo de la misma, ya que la longitud de las hojas y tallos es menor que para el resto de los tratamientos; del mismo modo las hojas presentaron síntomas de enfermedad desde la primera semana secándose de manera apresurada, pues en la tercera semana se observan hojas muertas que comienzan a desprenderse de los tallos. En lo que se refiere al resto de los tratamientos, no se observaron diferencias

cualitativas en lo que al desarrollo de la planta se refiere, sin embargo las plántulas sometidas al Tratamiento 1 presentaron hojas más gruesas y con una coloración más verdosa que el resto. Algunas manchas cloróticas lograron observarse en la superficie de las hojas de todas las unidades experimentales después de la tercera semana de crecimiento; de igual forma, comenzaron a aparecer máculas moradas en la primera hoja, que se fueron extendiendo a lo largo de las estructuras foliares de manera considerable a partir de la cuarta semana. Este es un síntoma indicativo del posible ataque por el patógeno involucrado, asociado también a una escasa asimilación de nutrientes por parte de la planta.

En el *Anexo 4 Parte 2.III*, se muestran los análisis de varianzas correspondientes a las mediciones de las plántulas estresadas con el hongo *Fusarium moniliforme*. Bajo estas condiciones, puede apreciarse que, para todos los casos, la plántula crece de manera logarítmica con respecto al tiempo. En lo que se refiere a la longitud de las hojas, los tallos, y las plántulas en general, puede observarse que la interacción entre el tiempo y el tratamiento aplicado es estadísticamente significativa, mientras que para el grosor de los tallos no existe tal diferencia.

Las gráficas de las interacciones significativas nos aportan datos muy interesantes con respecto a este tipo de estrés. En la *Gráfica 7* que a continuación se presenta, se muestran las longitudes de las hojas bajo diferentes tratamientos en función del tiempo, y puede verse que a partir de la segunda semana, el crecimiento de las hojas es muy homogéneo independientemente del tratamiento empleado. Existe un crecimiento acelerado de las hojas de la segunda a la tercera semana de desarrollo; sin embargo en la tercera semana comienza a distinguirse una pequeña modificación en las tendencias de crecimiento de las hojas de acuerdo al tratamiento, pero no existe diferencia estadística significativa entre las longitudes registradas. En la cuarta semana, las longitudes de las hojas de las plántulas sometidas al Tratamiento 3 (adicionadas con esferas de quitosán), detienen significativamente su crecimiento mientras que las plantas sometidas a Tratamiento 1 (recubiertas con el biopolímero) continúan un crecimiento acelerado; sin embargo tampoco existe diferencia significativa entre las longitudes de las hojas de las plántulas sometidas al Tratamiento 1 con respecto a los controles. En el caso de la semana 5, las hojas emergidas de las semillas tratadas no presentan diferencias estadísticas significativas comparadas con la semana anterior, mientras que el control negativo sí presenta esta diferencia, por lo cual puede decirse

que la presencia del hongo *Fusarium moniliforme* altera el crecimiento normal de las hojas del cultivo a partir de la quinta semana de desarrollo.

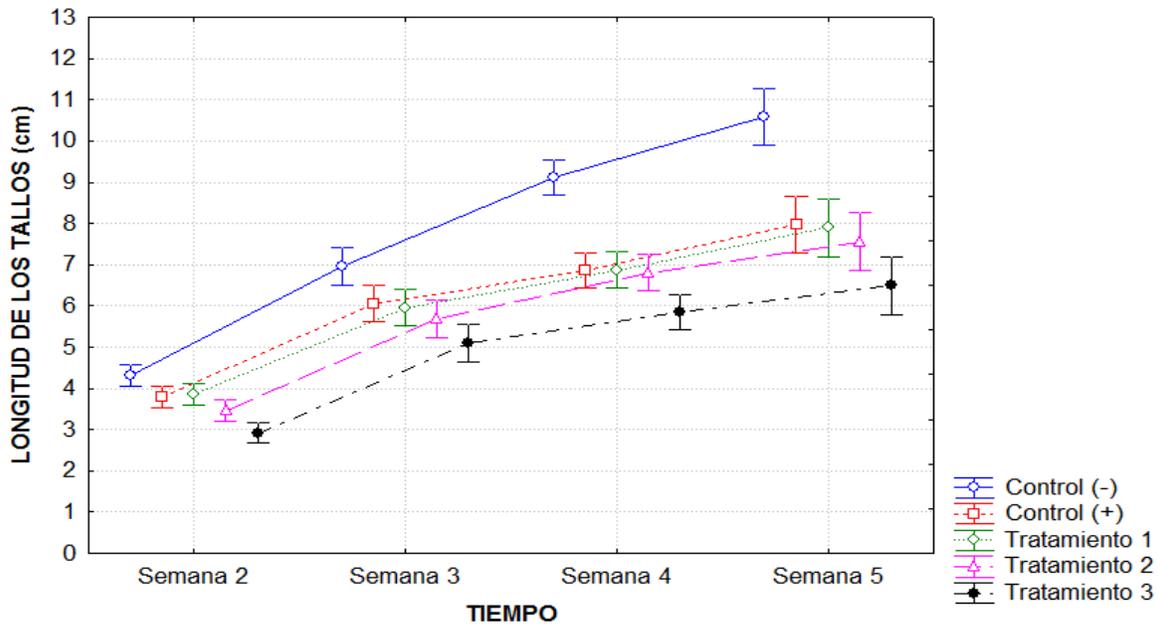


Gráfica 7. Longitud de las hojas infectadas por *Fusarium moniliforme* de acuerdo a la interacción tiempo-tratamiento ($p=0.001$).

Por otra parte, las Gráficas 8 y 9 que a continuación se presentan, muestran tendencias muy semejantes entre sí, sobre todo durante las semanas 4 y 5, lo cual nos da la idea de que la longitud total de la plántula de acuerdo al tratamiento es debida principalmente a las dimensiones de los tallos y no tanto a las de las hojas, ya que la tendencia de éstas difiere a la presentada en la Gráfica 7.

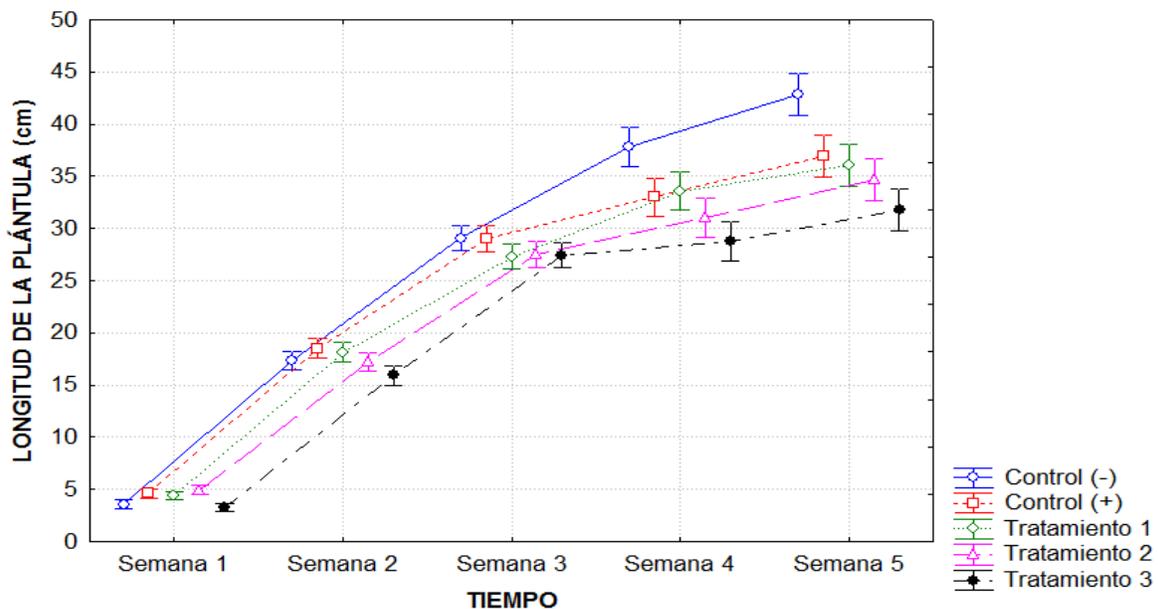
De acuerdo a la Gráfica 8, las longitudes de los tallos se ven afectadas de manera importante desde la segunda semana de crecimiento, existiendo diferencia significativa especialmente en lo que se refiere a las plántulas sometidas al Tratamiento 3, por ello una vez más se descarta el tratamiento con esferas de quitosán como una alternativa viable para favorecer el crecimiento y desarrollo de plántula.

LONGITUDES DE LOS TALLOS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO CON RESPECTO AL TIEMPO
Estrés biótico por *Fusarium moniliforme*
 (Interacción tiempo-tratamiento)



Gráfica 8. Longitud de los tallos infectados por *Fusarium moniliforme* de acuerdo a la interacción tiempo-tratamiento ($p=0.00186$).

LONGITUDES DE LAS PLÁNTULAS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO CON RESPECTO AL TIEMPO
Estrés biótico por *Fusarium moniliforme*
 (Interacción tiempo-tratamiento)



Gráfica 9. Longitud de las plántulas infectados por *Fusarium moniliforme* de acuerdo a la interacción tiempo-tratamiento ($p=0.00004$).

Según la gráfica de longitud de los tallos sometidos a diferentes tratamientos en función del tiempo (*Gráfica 8*), en la Semana 3 la tendencia de crecimiento de los tallos es semejante a la de la semana anterior; sin embargo esta tendencia comienza a modificarse a partir de la Semana 4, en donde los tallos de las plántulas sanas (Control negativo) continúan creciendo significativamente con respecto a la Semana 3. En lo que al control positivo se refiere, no existe diferencia significativa en el crecimiento registrado desde la tercera semana. En el caso de las plántulas emergidas a partir de las semillas sometidas a los Tratamientos 2 y 3, éstas comienzan a detener su crecimiento a partir de la Semana 4, por lo cual, se puede asegurar que el hongo *Fusarium moniliforme* se manifiesta en la planta afectando mayoritariamente el crecimiento normal del tallo entre la primera y segunda etapa fenológica del cultivo.

En lo que se refiere a la *Gráfica 9* en donde se presentan las longitudes de las plántulas con diferentes tratamientos en función del tiempo, como ya se mencionó anteriormente, la tendencia de crecimiento es muy semejante a la de los tallos, ya que en las Semanas 1 y 2 no se observan diferencias significativas en las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos. Asimismo, a partir de la Semana 4 las plantas infectadas (con o sin tratamiento) comienzan a detener su crecimiento. Una vez más se observa que el Tratamiento 3 (correspondiente a las esferas de quitosán) no es efectivo para lograr el crecimiento de la planta, ya que durante las Semanas 3, 4 y 5 no se presentan diferencias significativas en cuanto a su longitud. Por otra parte, las plántulas sometidas a los tratamientos 1 y 2 detienen su crecimiento a partir de la cuarta semana.

Mediante el análisis microbiológico cualitativo (*Figura 5*), en donde se sembraron en las placas de agar 3 muestras de hojas de distintas unidades experimentales por cada tratamiento, puede apreciarse la existencia del hongo *Fusarium moniliforme* en las placas de agar correspondiente al Control (-), el cual se manifiesta con una coloración blanca de aspecto algodonoso. Esto indica, tal como ocurrió con *Aspergillus flavus*, que la semilla pese a su alta calidad se encuentra contaminada con el hongo desde su origen. Llama la atención que en las placas correspondientes al Control (+), se apreció un ligero crecimiento fúngico y bacteriano. Para todos los casos, las hojas provenientes de las semillas recubiertas con quitosán no presentaron crecimiento fúngico, sin embargo es evidente la existencia de una alta carga bacteriana y de levaduras, la cual es mayor a la que presentan las cajas correspondientes al Tratamiento 2 (semillas dañadas mecánicamente y recubiertas con quitosán).

Sin duda el resultado más interesante es el correspondiente al Tratamiento 3, ya que las estructuras foliares presentaron el crecimiento de *Fusarium moniliforme* en las placas de agar. Es sabido que la alcalinidad del suelo favorece la aparición de microbiota nociva (Aguirre 2001), por lo tanto, existe la posibilidad de que las esferas de quitosán en medio alcalino sean empleadas como sustrato o fuente nutritiva por el hongo para poder desarrollarse y de esta manera manifestarse en las hojas de la plántula.

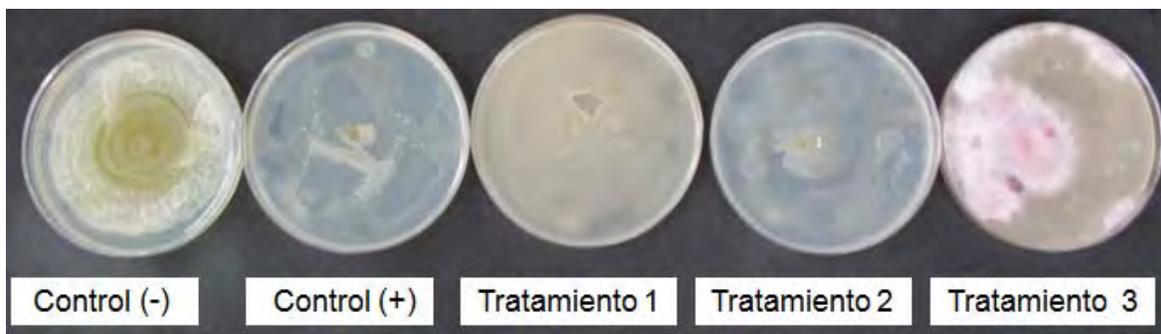


Figura 5. Siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas infectadas por *F. moniliforme* y sometidas a los diferentes tratamientos.

Resumiendo los resultados anteriores se tiene que:

- El recubrimiento de las semillas de maíz con solución de quitosán permite que la plántula desarrolle follaje muy verde y hojas evidentemente más gruesas.
- Las esferas de quitosán en NaOH provocan necrosis en las hojas de las plántulas a partir de la tercera semana de crecimiento.
- La longitud de los tallos de las plántulas de maíz se ve disminuida con la presencia del hongo *Fusarium moniliforme* independientemente del tratamiento aplicado.
- El grosor de los tallos de las plántulas no se altera por el tratamiento aplicado.
- El crecimiento de la plántula presenta un comportamiento logarítmico independientemente del tratamiento, aunque dicho comportamiento se ve frenado por la presencia del hongo a partir de la cuarta semana.

- Estadísticamente, el recubrimiento de QN no favorece el crecimiento normal de la plántula.
- Las pruebas microbiológicas sugieren que el recubrimiento de QN en las semillas (Tratamiento 1) inhibe el crecimiento fúngico manifestado en las hojas de la plántula.
- Las semillas dañadas mecánicamente, con recubrimiento, y esferas de QN (Tratamiento 3), presentan el desarrollo de *Fusarium moniliforme*.
- Las semillas de maíz, independientemente de su calidad, manifiestan la presencia de carga fúngica la cual se evidencia durante su crecimiento y se expresa incluso a nivel foliar.
- Las esferas de quitosán en Hidróxido de Sodio no constituyen un tratamiento efectivo para lograr el crecimiento normal de las plántulas de maíz.

7.2.4 ESTRÉS ABIÓTICO: *pH ácido – pH alcalino*

De acuerdo a lo expuesto en el apartado correspondiente a la Metodología Experimental, las semillas sembradas bajo condiciones carentes de estrés y aquellas que fueron estresadas de manera biótica, se cultivaron en un suelo con pH prácticamente neutro (6.88). Se esperaba que al modificar la acidez de la tierra hasta $pH \approx 5$, la semilla germine con dificultad y la plántula se desarrolle de manera anormal; sin embargo el comportamiento presentado fue totalmente opuesto, lo que podría indicar que existe una mayor disponibilidad de nutrientes en un suelo ácido.

En la *Figura 6*, es evidente a simple vista que en la tercera semana de desarrollo, las plántulas sometidas a condiciones de acidez presentan una mayor longitud y mayor grosor tanto en hojas como en tallos comparándolas con el Control (-). Igualmente presentan mayores dimensiones que las plántulas sometidas a condiciones alcalinas, cuyas longitudes son casi iguales a las que presentan las plántulas sin estrés.

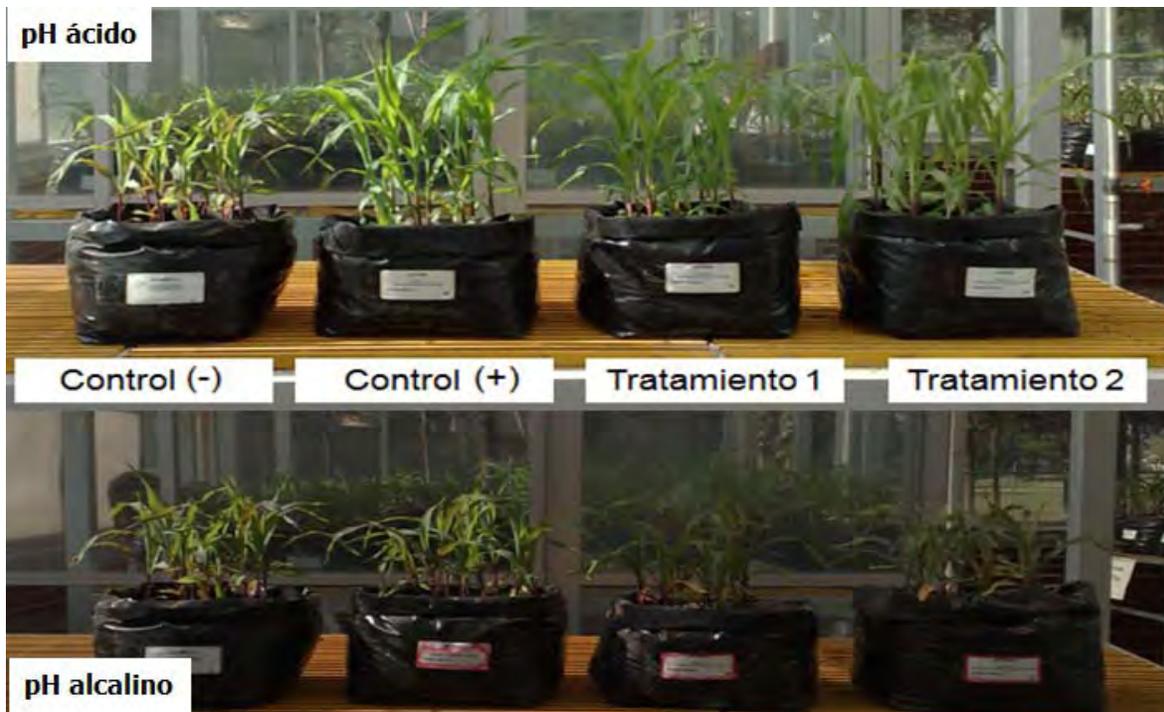
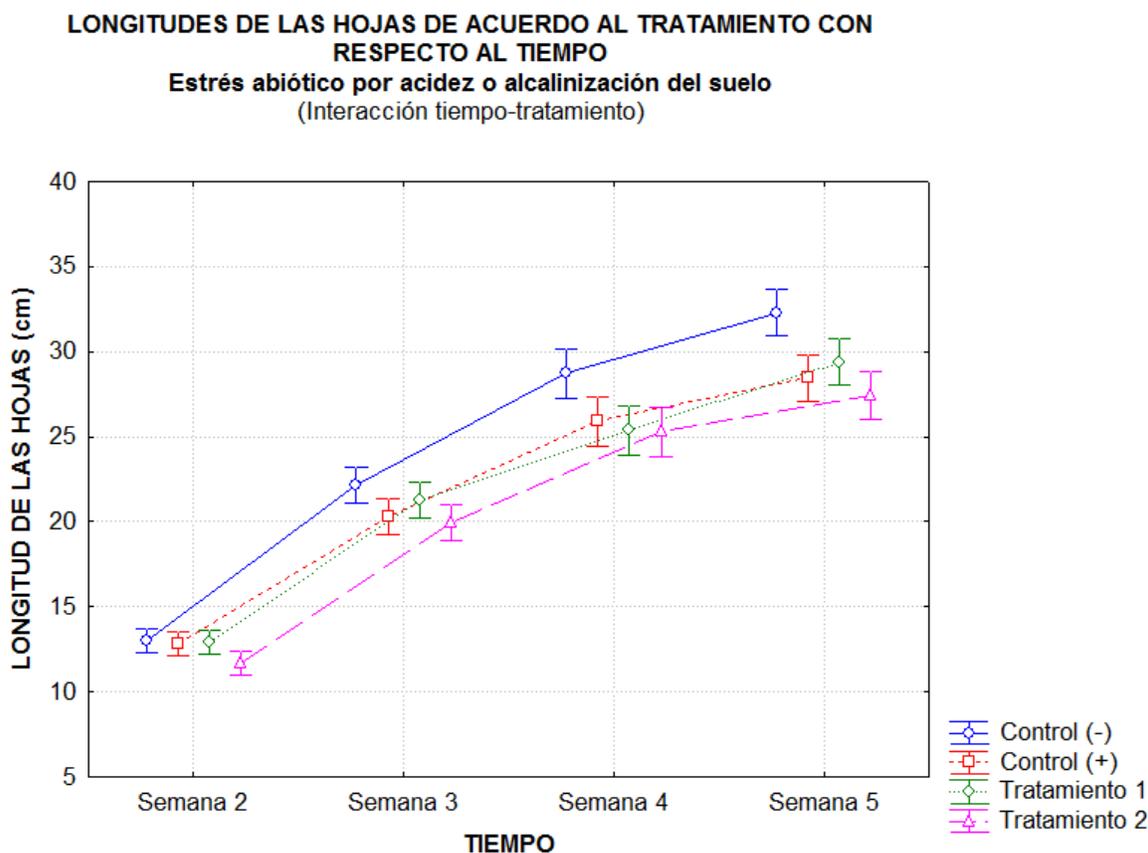


Figura 6. Crecimiento de las plántulas de maíz a diferentes condiciones de acidez con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas. En la parte superior se presentan las plántulas estresadas con acidez, mientras que en la parte inferior se muestran las correspondientes a estrés alcalino.

Cualitativamente, pudo observarse una evolución homogénea de las plántulas sometidas a estrés por modificaciones en el pH del suelo durante su primera etapa fenológica. Sin embargo a partir de la tercera semana, las plántulas ácidas comenzaron a crecer de manera acelerada, mientras que las plántulas sometidas a pH alcalino detuvieron su crecimiento y se manifestaron en las hojas manchas cloróticas y amarillamiento, el cual fue evolucionado hasta la quinta semana en la cual las hojas comenzaron a colorearse de una tonalidad morada e incluso en algunos casos la primera hoja presentó necrosis asociada a una sequía total de la misma. Por el contrario, las plántulas sometidas a pH ácido siempre se mantuvieron verdes y no presentaron síntomas de enfermedad. De igual manera, estas plántulas desarrollaron tallos visiblemente más gruesos y con vellosidades más desarrolladas en todas sus estructuras. Aún después de la quinta semana de desarrollo, las plántulas ácidas no adquirieron coloración morada en ninguna de sus estructuras y presentaron una evidente vigorosidad.

Mediante el análisis de varianzas (*Anexo 4 Parte 2.VII*) puede apreciarse que la mayoría de los efectos resultan ser estadísticamente significativos. En lo que se refiere a la longitud de las hojas

solo es significativa la interacción entre el tiempo y el tratamiento, mientras que para los tallos y la plántula en general, la interacción de los tres factores (tiempo, pH y tratamiento), resulta ser estadísticamente significativa. Debido a que esas interacciones involucran a los tres factores, estas serán las únicas gráficas en las que se enfocará a detalle en las siguientes páginas.

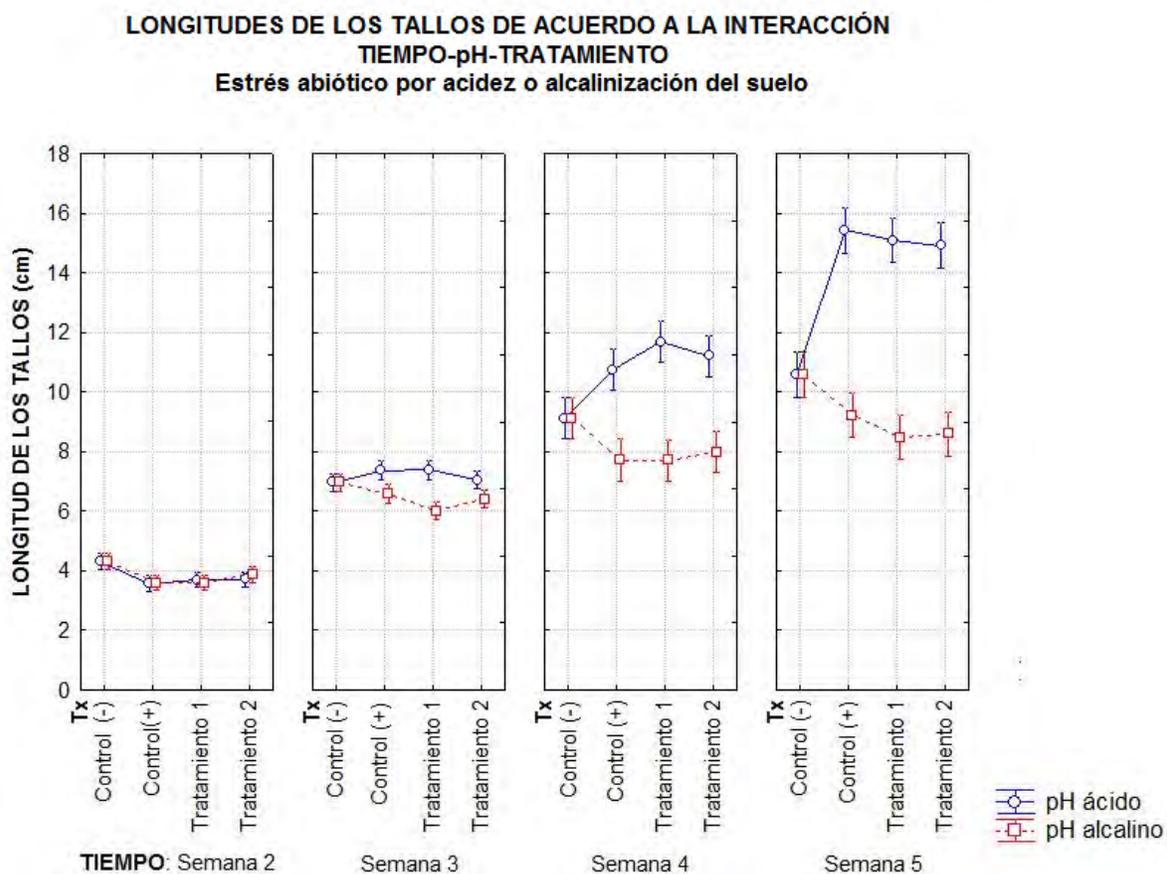


Gráfica 10. Longitud de las hojas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.03923$).

En la *Gráfica 10* puede observarse que la modificación de las condiciones de acidez normal de la tierra provoca un crecimiento atenuado de las estructuras foliares de la plántula. Durante la Semana 2 y la Semana 3, no existe diferencia significativa en la longitud de las hojas en función del tratamiento empleado. Sin embargo, a partir de la cuarta semana, la longitud de las plantas estresadas comienza a variar en menor escala, y para la quinta semana las hojas no presentan un crecimiento tan acelerado como las del Control (-); no obstante, aquellas hojas provenientes de semillas recubiertas con quitosán (Tratamiento 1), son las únicas que a pesar de haber sido

sometidas a estrés presentan una longitud estadísticamente diferente comparada con aquella registrada durante la semana anterior.

Por lo tanto, a pesar de que las hojas estresadas no logran desarrollarse al igual que control negativo, puede verse que el quitosán permite que la hoja continúe un crecimiento logarítmico a pesar de la alteración del potencial de hidrógeno en la tierra de cultivo, lo cual es indicativo del mejor aprovechamiento de los nutrientes a pH ácido.

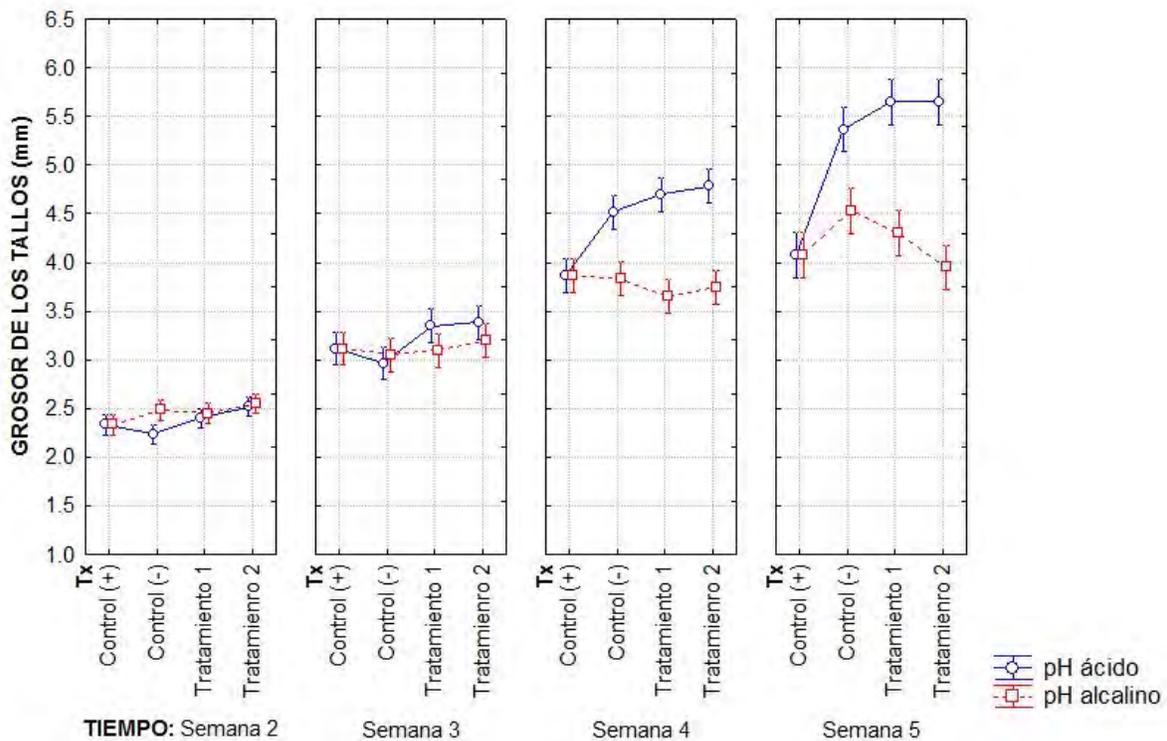


Gráfica 11. Longitud de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.00000$).

En la Gráfica 11 se registran los valores de las longitudes de los tallos en función de las interacciones existentes entre el tiempo de crecimiento, el pH y el tratamiento al que fueron sometidas las plántulas. Como puede apreciarse, durante la Semana 2 los tallos no se ven afectados por el pH de la tierra, sin embargo, a partir de la Semana 3 comienza a presentarse un mayor crecimiento de los tallos de las plántulas sometidas a estrés por pH ácido existiendo una

diferencia estadística significativa comparada con las plántulas sometidas a pH alcalino. Esta diferencia es mayor en la cuarta semana y continúa aumentando durante la Semana 5 en donde la diferencia entre las medias de las longitudes de los tallos es cercana a los 6 cm. Llama la atención que el recubrimiento con quitosán no provoca que exista una diferencia significativa en cuanto al crecimiento de los tallos se refiere con respecto al control negativo. Sin embargo, para el caso de plántulas alcalinas, las medias de las longitudes de los tallos son ligeramente mayores en aquellas semillas tratadas con esferas de quitosán.

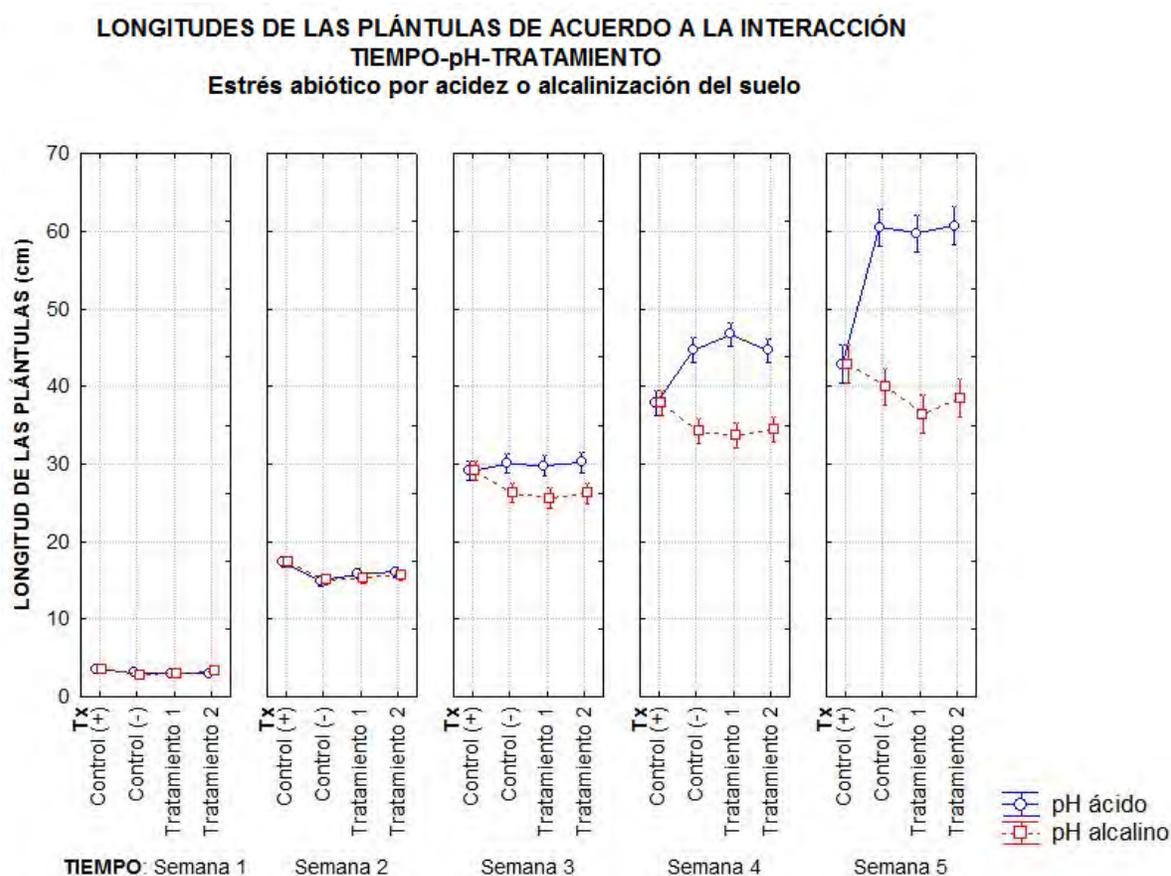
**GROSORES DE LOS TALLOS DE ACUERDO A LA INTERACCIÓN
TIEMPO-pH-TRATAMIENTO**
Estrés abiótico por acidez o alcalinización del suelo



Gráfica 12. Grosor de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.00503$).

De acuerdo a la Gráfica 12, puede verse que desde la Semana 2, las plántulas correspondientes al Control (+) presentan un mayor grosor de los tallos bajo condiciones de acidez comparado con el resto de las plántulas, mientras que aquellas sometidas a estrés por alcalinidad son las que presentan menores dimensiones. En la Semana 3 esta tendencia se ve modificada ya que las

plántulas tratadas con quitosán (tanto en recubrimiento como en esferas) comienzan a producir tallos más gruesos. En la Semana 4 existe una diferencia significativa entre los grosores de los tallos de las plántulas ácidas comparadas con las de pH alcalino, siendo las primeras mucho más gruesas que las segundas; sin embargo, entre tratamientos no existe diferencia significativa alguna. Para la quinta semana se observa que la tendencia de engrosamiento para las plántulas ácidas continúa en aumento mientras que para el pH alcalino es el control positivo quien muestra una mayor longitud pese no haber significancia estadística con respecto al resto de las plantas sometidas a condiciones de pH semejantes. Esta gráfica nos permite observar una vez más que la adecuada acidificación del suelo promueve un adecuado crecimiento de la plántula con un mayor grosor de sus tallos.



Gráfica 13. Longitud de las plántulas estresadas por modificaciones en el potencial de hidrógeno de la tierra de cultivo ($p=0.00000$).

La longitud de la plántula sometida a diferentes pH's está determinada principalmente por las dimensiones de sus tallos, ya que es evidente la similitud entre las Gráficas 11 y 13. En esta última

se observa que durante las Semanas 1 y 2 la longitud de la planta no se ve afectada por las condiciones de acidez o alcalinidad de la tierra, sin embargo a partir de la tercera semana existe diferencia significativa en cuanto a la longitud presentada, la cual es mayor para las plantas ácidas que para las alcalinas. Esta diferencia se va haciendo cada vez mayor y se puede observar que, en la quinta semana, las plántulas ácidas alcanzan una altura de 60cm en promedio mientras que las plántulas alcalinas miden solamente dos terceras partes de la altura total con respecto a las plántulas ácidas. Por lo tanto, la adecuada acidificación de la tierra de cultivo permite que la plántula crezca de manera acelerada y con mejores características físicas.

Debido a que existe evidencia científica de que el desarrollo de especies fúngicas en los cultivos y en las semillas está asociado a las condiciones climáticas y a la acidez del suelo (Aguirre 2001, Bacon 2001), las plántulas obtenidas mediante la germinación de las semillas sometidas a estrés de tipo abiótico también fueron evaluadas mediante un análisis microbiológico cualitativo realizado a partir de los cortes de las estructuras foliares de las plántulas correspondientes.

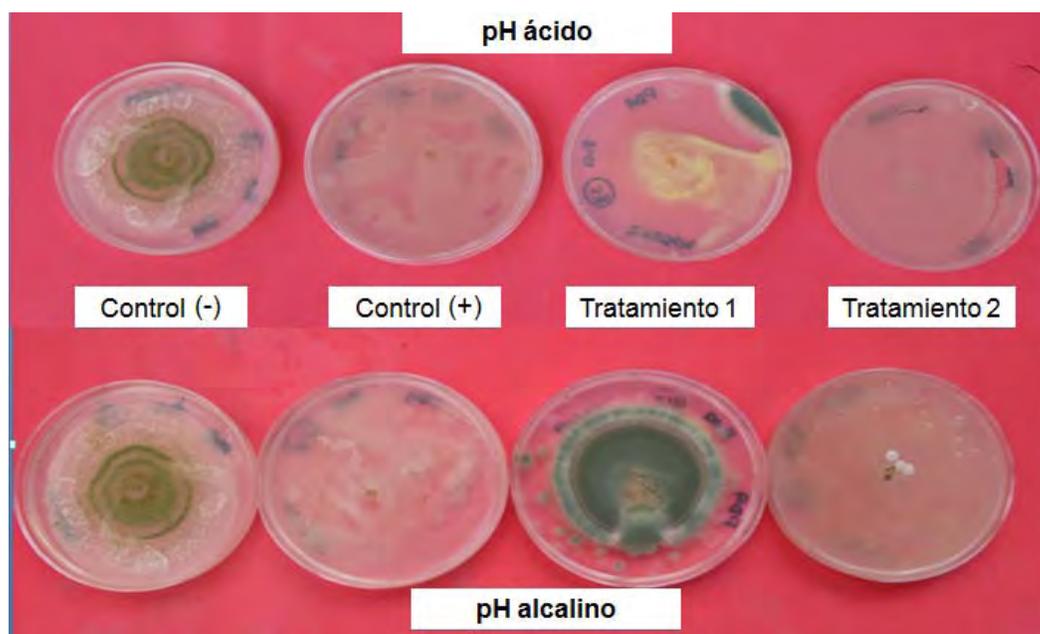


Figura 7. Siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas estresadas por modificaciones en el pH de la tierra de cultivo. En la parte superior se presentan las hojas correspondientes a pH ácido, mientras que en la parte inferior se presentan aquellas que corresponden al pH alcalino.

Mediante el análisis microbiológico cualitativo (Figura 7), en donde se sembraron en las placas de agar 3 muestras de hojas de distintas unidades experimentales por cada tratamiento, puede verse

que el pH ácido *per se* inhibe el crecimiento fúngico, ya que solamente la placa de agar correspondiente al Control (-) presenta desarrollo de hongos. La placa correspondiente al Tratamiento 1 (recubrimiento de la semilla con quitosán) presenta desarrollo bacteriano, mientras que la del Tratamiento 2 (esferas de quitosán) muestra un desarrollo bacteriano aún menor. Para el caso de pH alcalino, éste en combinación con el QN favorece el crecimiento fúngico en agar PDA, y al igual que para el caso del pH ácido, el Tratamiento 2 resulta ser el más efectivo para la inhibición de microorganismos.

Resumiendo los resultados anteriores se tiene que:

- Cualitativamente, las plántulas desarrolladas bajo condiciones de acidez son más verdes y presentan nulas manifestaciones de enfermedad, mientras que aquellas desarrolladas bajo condiciones de alcalinidad presentan daños desde la segunda semana de crecimiento.
- Bajo condiciones de acidez, las hojas de las plántulas presentan longitudes similares independientemente del tratamiento.
- La longitud de los tallos en medio ácido es mayor que la longitud registrada bajo condiciones de pH básico.
- Los tallos más gruesos son aquellos correspondientes al pH ácido en forma general.
- El crecimiento de la plántula bajo cualquiera de las condiciones de acidez presenta un comportamiento logarítmico.
- Las plántulas cultivadas en tierra con pH ácido son más largas que las cultivadas bajo condiciones alcalinas.
- El pH alcalino no favorece el desarrollo normal de la planta. El recubrimiento de QN y las esferas bajo estas condiciones, producen plantas enanas, y conforme pasa el tiempo, las plantas se secan considerablemente.

- Mediante la siembra en agar PDA de las estructuras foliares, puede verse que el pH ácido de la tierra por sí mismo, actúa como inhibidor de los hongos y las bacterias de cultivo.
- En pH ácido, las esferas de QN también tienen propiedades antifúngicas.

7.2.5 ESTRÉS ABIÓTICO: *Sequía – Humedad*

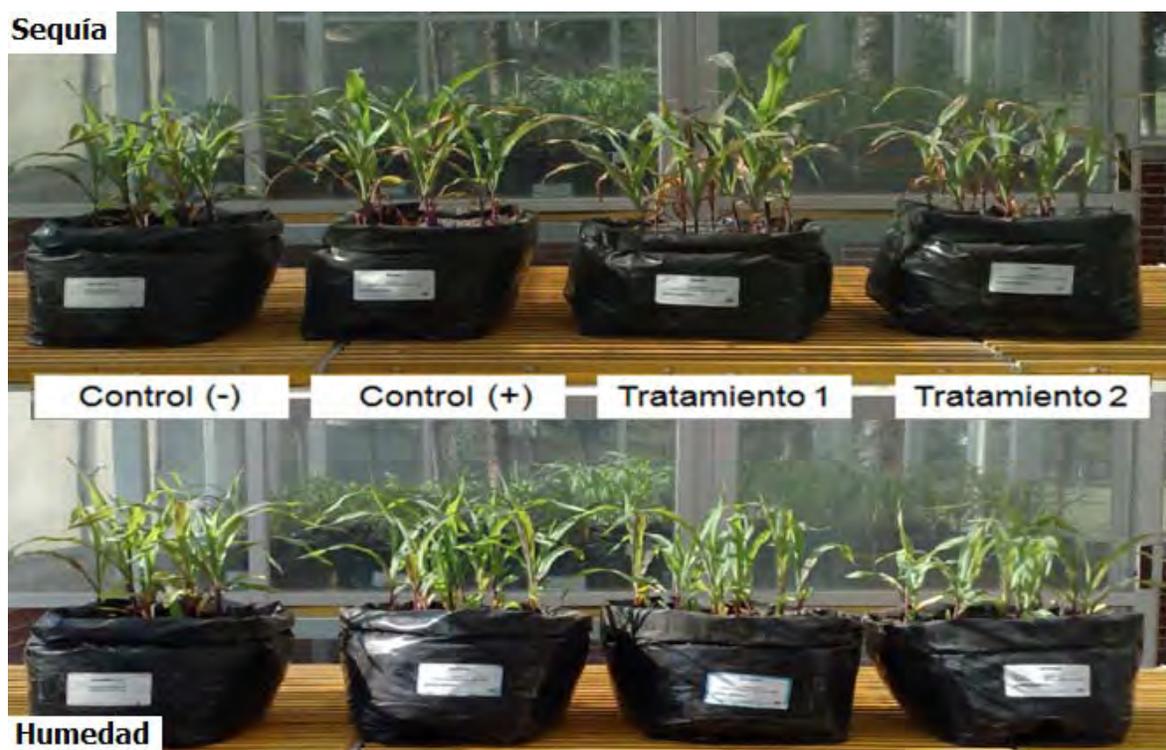
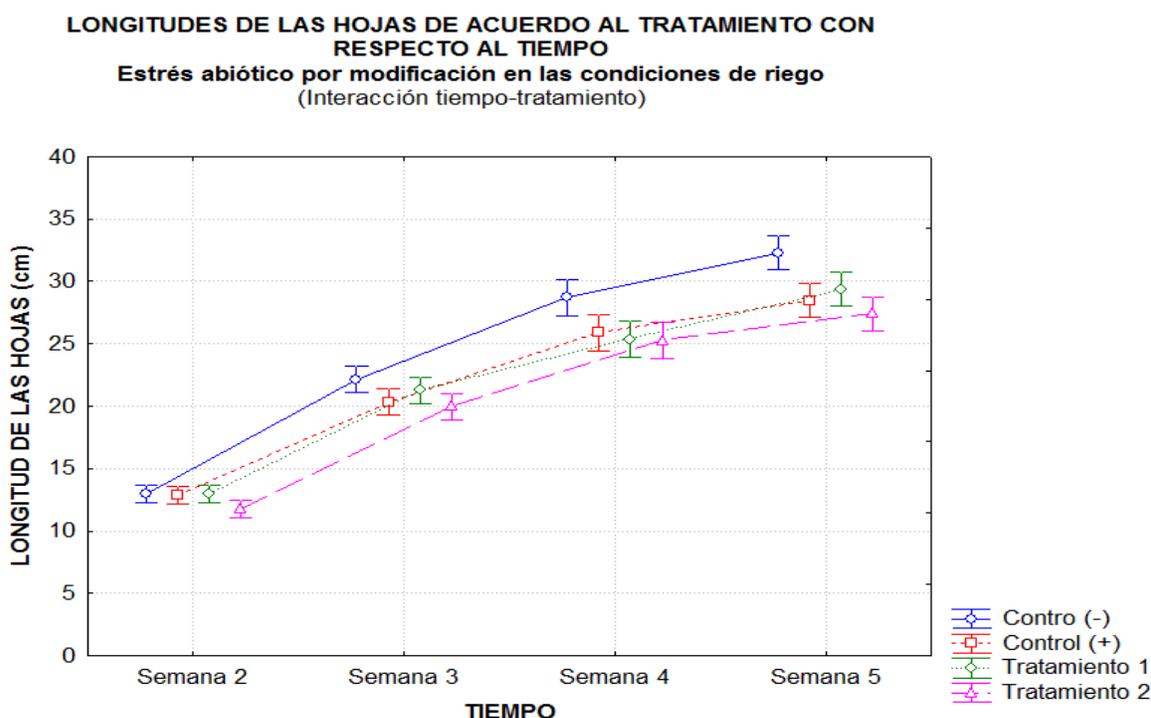


Figura 8. Crecimiento de las plántulas de maíz a diferentes condiciones de riego con distintos tratamientos después de 3 semanas de haber sido cultivadas. En la parte superior se presentan las plántulas estresadas con sequía, mientras que en la parte inferior se muestran las correspondientes a estrés por humedad.

En la *Figura 8* presentada arriba, se muestra el crecimiento de las plántulas de maíz después de tres semanas de desarrollo. Como puede observarse, las plántulas cultivadas bajo condiciones de sequía presentan en promedio una mayor longitud que las que fueron cultivadas bajo condiciones de humedad. La adición de QN a las plantas bajo esta última condición, produce estructuras muy pequeñas cuya longitud es incluso menor que la registrada para el Control (-). Sin embargo, cabe mencionar que este comportamiento no se mantiene estable a lo largo de las semanas, ya que al inicio de la Semana 4, las plántulas sometidas a condiciones de sequía comenzaron a detener su

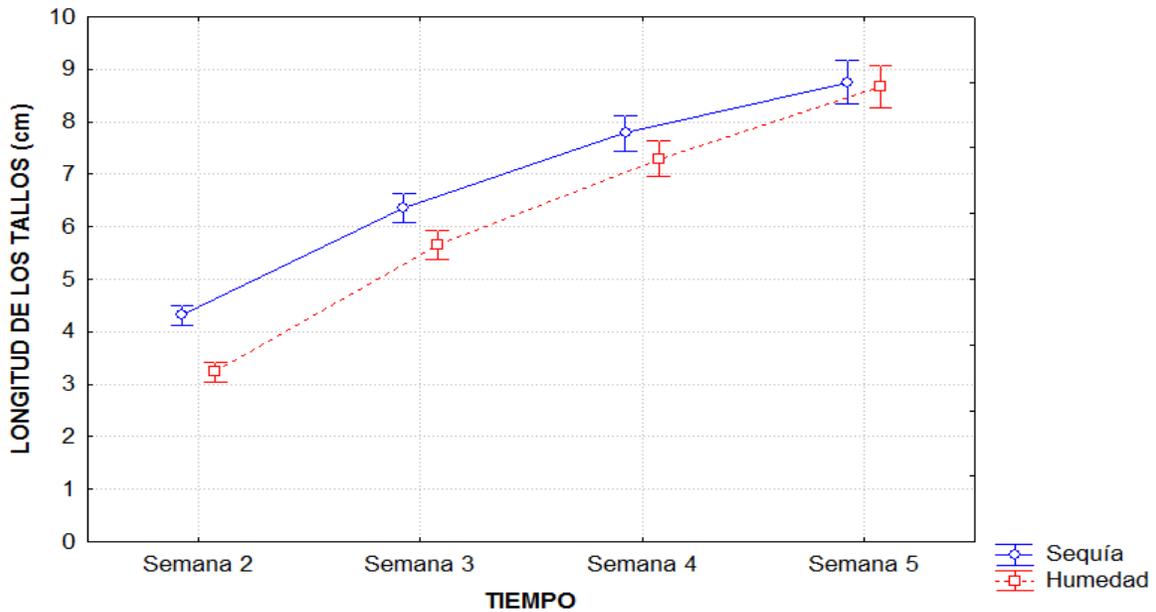
desarrollo, mientras que aquellas sometidas a condiciones de humedad continuaron su crecimiento normal de manera logarítmica. Del mismo modo, en lo que se refiere a las plántulas con riegos espaciados, al cabo de la Semana 3 comenzaron a manifestar síntomas de enfermedad, ya que las hojas se colorearon de una tonalidad morada y las orillas de las mismas presentaron un amarillamiento considerable el cual al cabo de un par de semanas se transformó en franca marchitez; de igual manera los tallos presentaron una coloración muy oscura, la cual corresponde a la manifestación de carencia de nutrientes debido a la escasa absorción de agua a través de las raíces (Stubbs y col. 1986). Asimismo, la plántula se volvió débil y los tallos quebradizos, mientras que el grosor de las hojas se fue adelgazando gradualmente al llegar a la Semana 5.

En el *Anexo 4 Parte 2.XII*, puede apreciarse que muy pocos efectos resultan ser estadísticamente significativos en lo que se refiere al análisis de varianzas de las dimensiones de la plántula. En todos los casos, la interacción significativa es la correspondiente a la relación tiempo-tratamiento, y para el caso de la longitud de los tallos y grosor de los mismos, también es significativa la interacción tiempo riego, lo cual nos indica que la cantidad de agua aportada a la planta es un factor importante para el desarrollo de los tallos con respecto al tiempo.



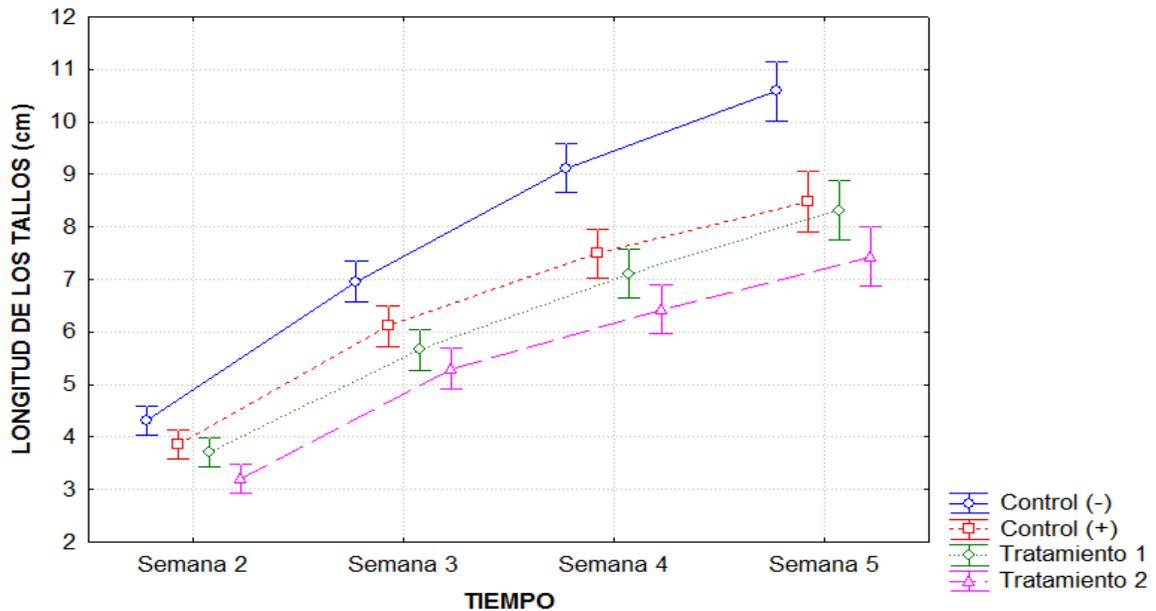
Gráfica 14. Longitud de las hojas de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.03923$).

**LONGITUDES DE LOS TALLOS DE ACUERDO AL TIPO DE RIEGO
CON RESPECTO AL TIEMPO**
Estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego
(Interacción tiempo-riego)



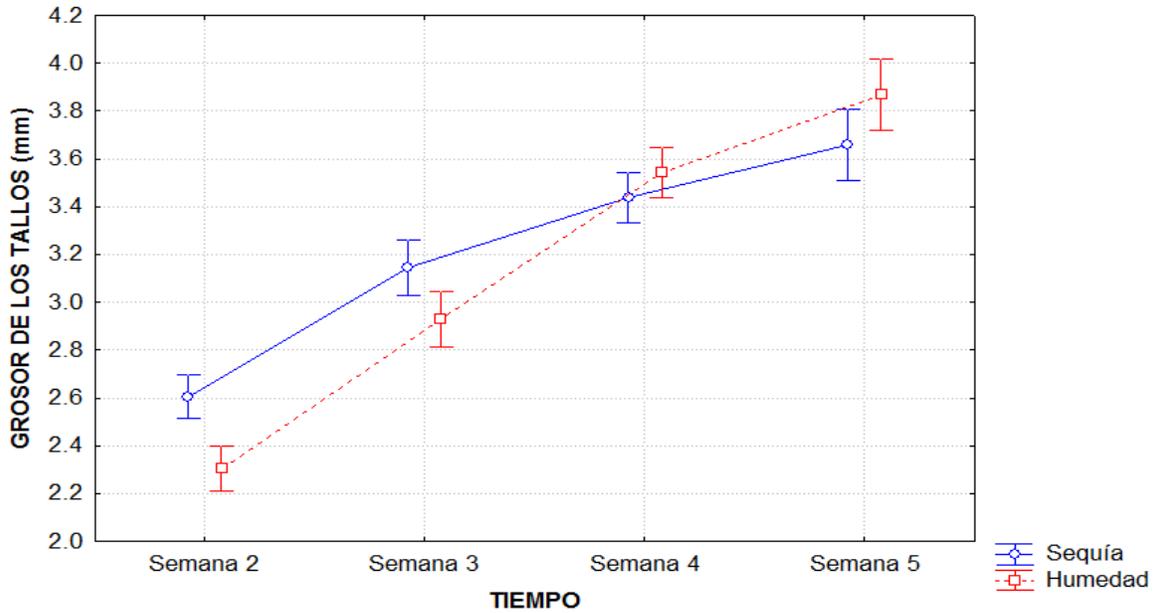
Gráfica 15. Longitud de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.03373$).

**LONGITUDES DE LOS TALLOS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO CON
RESPECTO AL TIEMPO**
Estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego
(Interacción tiempo-tratamiento)



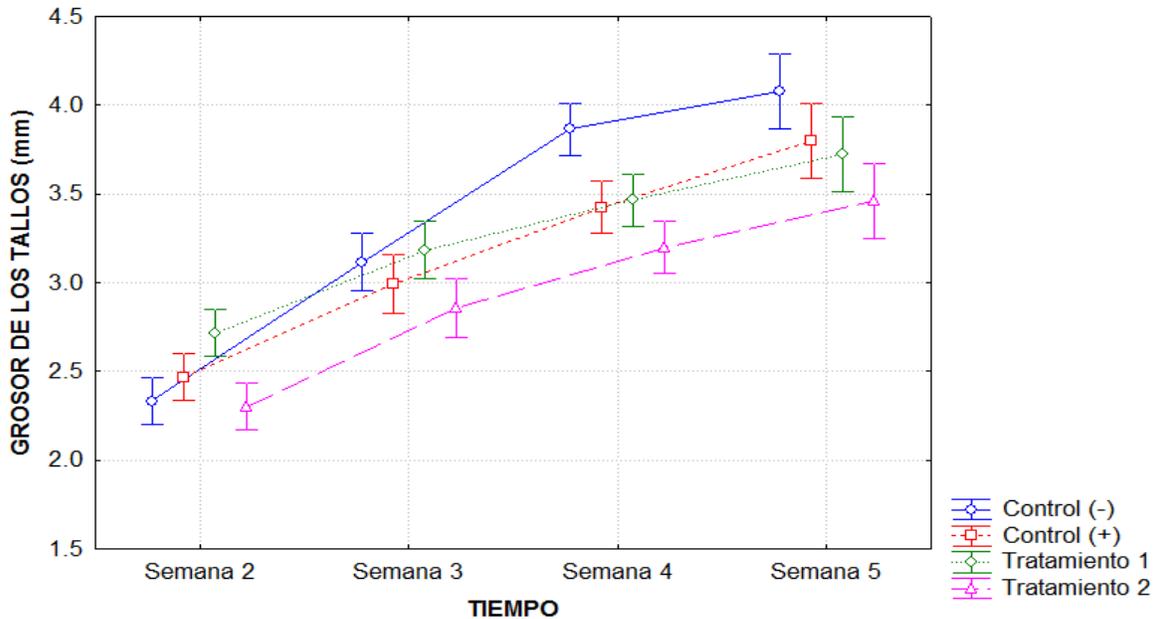
Gráfica 16. Longitud de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego según el tratamiento ($p=0.00400$).

GROSORES DE LOS TALLOS DE ACUERDO A LAS CONDICIONES DE RIEGO CON RESPECTO AL TIEMPO
Estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego
 (Interacción tiempo-riego)



Gráfica 17. Grosor de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.00236$).

GROSORES DE LOS TALLOS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO CON RESPECTO AL TIEMPO
Estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego
 (Interacción tiempo-tratamiento)



Gráfica 18. Grosor de los tallos de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego según el tratamiento ($p=0.01988$).

En la *Gráfica 14* se analiza la longitud de las hojas sometidas a diferentes tratamientos en función del tiempo. Ahí se observa que en las Semanas 2 y 3, independientemente del tratamiento aplicado, las hojas de las plántulas presentan prácticamente las mismas dimensiones; pero a partir de la Semana 4 la longitud de las hojas sometidas a estrés por modificación en las condiciones de riego comienza a decrecer comparada con el Control (-). No es sino hasta la Semana 5 en donde esta tendencia se observa de manera clara, ya que existe diferencia significativa entre las longitudes de las hojas de las semillas estresadas comparadas con aquellas carentes de estrés, siendo estas últimas de mayor longitud. A pesar de que las hojas de las plántulas provenientes de semillas recubiertas con quitosán son ligeramente más altas que el Control (+) y el Tratamiento 2, no existe diferencia significativa entre las dimensiones registradas.

Las *Gráficas 15* y *16*, muestran la longitud de los tallos de las plántulas dependiendo del tratamiento y de las condiciones de riego. En la *Gráfica 15* puede observarse que durante las Semanas 2 y 3 las plántulas sometidas a condiciones de sequía presentan tallos muy altos comparados con aquellas plántulas sometidas a condiciones de humedad. Sin embargo, en la Semana 4 los tallos estresados por sequía van deteniendo su crecimiento, por lo que para la Semana 5 las longitudes de los tallos de las plántulas sometidas tanto a humedad como a sequía son exactamente del mismo tamaño.

En lo que se refiere al tratamiento empleado, a través de la *Gráfica 16* es claro que desde un inicio el estrés por modificación en las condiciones de riego provoca que los tallos no se desarrollen de manera normal, ya que son más pequeños que el Control (-). Esta diferencia es estadísticamente significativa hasta la Semana 4 en donde los tallos de las plántulas estresadas son mucho más pequeños y su crecimiento se va deteniendo con respecto al tiempo. Una vez más mediante estos resultados se descarta la posibilidad de emplear esferas de quitosán en NaOH (Tratamiento 2) para promover el crecimiento normal de las plántulas, ya que como puede verse, los tallos más cortos se producen bajo este tratamiento. De igual manera el tratamiento con recubrimiento de quitosán (Tratamiento 1) no presenta una diferencia significativa en cuanto a la longitud de los tallos se refiere para este tipo de estrés.

Las *Gráficas 17* y *18* muestran los grosores de los tallos de las plántulas dependiendo del tratamiento y de las condiciones de riego. En la *Gráfica 17* puede observarse que los tallos más

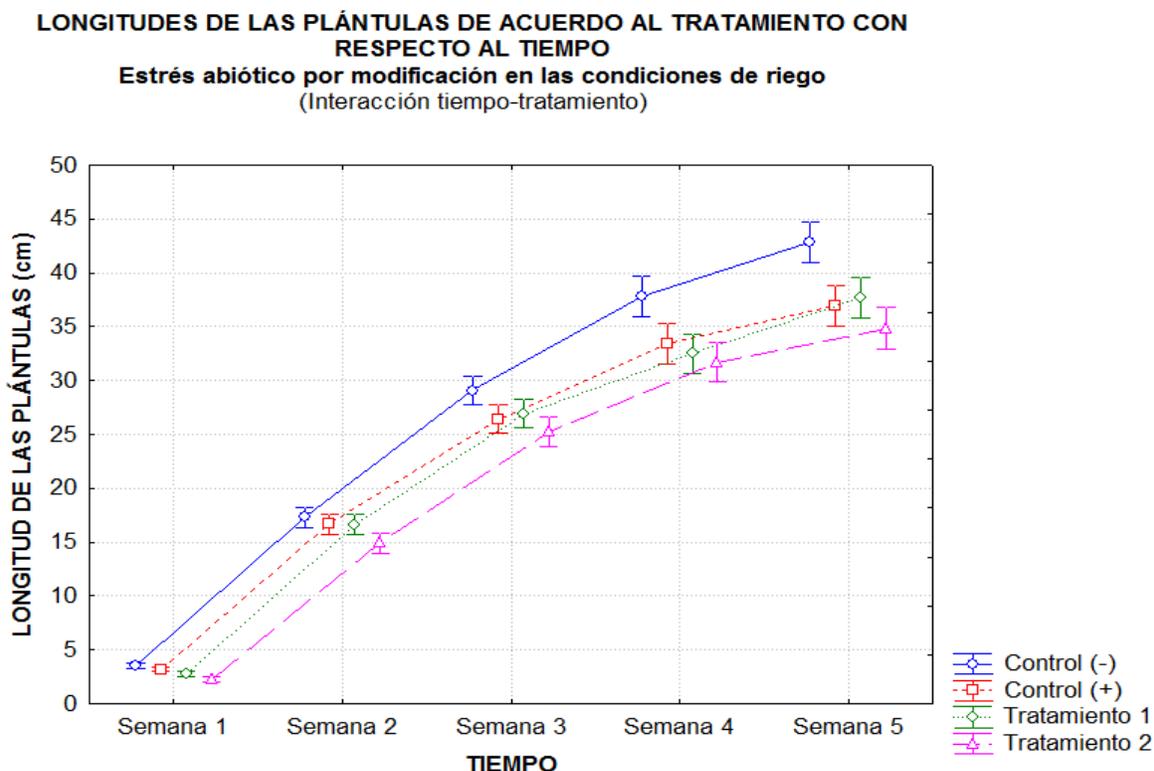
gruesos son aquellos sometidos a condiciones de sequía durante las Semanas 2 y 3; sin embargo a partir de la Semana 4, los tallos sometidos a sequía comienzan a detener su engrosamiento ya que para la Semana 5 el aumento en su diámetro no es estadísticamente significativo con respecto a la semana anterior. No obstante, a partir de la Semana 4, los tallos de las plántulas sometidas a condiciones de humedad se engrosan aún más que aquellos sometidos a sequía. Para la Semana 5 a pesar de que no existe diferencia estadística significativa en lo que se refiere al grosor de los tallos presentado por las plántulas sometidas a condiciones de sequía y humedad, el diámetro de aquellos sometidos a riego con exceso de agua es mayor que para los de escasos.

La *Gráfica 18* muestra que durante la Semana 2, los tallos más gruesos son los provenientes de semillas recubiertas con quitosán, mientras que los más delgados (incluso más delgados que el control negativo) son los que tienen esferas de quitosán (Tratamiento 2). Esta tendencia se mantiene hasta la Semana 4, sin embargo los tallos de las plántulas estresadas tienen mayor diámetro que los del Control (+). Existe una modificación evidente en la Semana 5, en donde los tallos correspondientes a las plántulas con Tratamiento 1 ya no presentan diferencia estadística significativa en cuanto a su grosor comparándolo con la semana anterior.

Finalmente la *Gráfica 19* que se presenta a continuación, muestra la interacción tiempo-tratamiento de las longitudes totales de las plántulas. Durante las Semanas 1 y 2, la longitud de las plántulas es muy semejante, pero para la Semana 3, las dimensiones comienzan a variar en pequeña proporción. En la Semana 4, las plántulas estresadas comienzan en general a detener su crecimiento, mientras que para la Semana 5 existe una diferencia significativa entre la longitud total de las plántulas sin estrés y aquellas estresadas independientemente del tratamiento. La diferencia aproximada entre longitudes es de 10cm.

De acuerdo a los resultados analizados anteriormente, puede verse que en lo que se refiere a la modificación de las condiciones de riego en las plántulas de maíz, la estructura que se ve afectada por este estrés es directamente el tallo, por lo que es éste el que le confiere a la plántula en general la estatura final que llega a tener después de 5 semanas de crecimiento. En este caso, el quitosán no es un tratamiento efectivo para lograr un desarrollo normal de la plántula. Esto se justifica debido a que como recordaremos, el quitosán tiene la capacidad de retener una gran cantidad de agua. Para el caso de las plántulas con riego excesivo, el quitosán, al conferirle una mayor humedad a la semilla, impide que esta se desarrolle de manera normal; sin embargo para el

caso de la sequía, recordaremos que las primeras semanas la plántula creció de manera adecuada pese al estrés hídrico. Esto se explica precisamente por las propiedades de captación de agua del quitosán, ya que la semilla por efecto del recubrimiento tenía la capacidad de almacenar un poco mas de agua y de esta manera poder suministrarla; sin embargo, después de un tiempo el agua se agota y por esa razón la plántula comienza a detener su crecimiento.



Gráfica 19. Longitud de las plántulas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego ($p=0.01430$).

El análisis microbiológico cualitativo de las estructuras foliares de las plántulas cultivadas bajo condiciones de sequía y humedad con diferentes tratamientos se muestra en la *Figura 9*. En el caso de sequía, se aprecia que bajo estas condiciones se favorece el desarrollo tanto de hongos como bacterias (Control (+)); sin embargo las plantas tratadas con quitosán no presentan desarrollo fúngico (Tratamiento 1). Para el caso de las plántulas sometidas a duplicación de riego, se aprecia que las condiciones de humedad son favorables para el desarrollo de hongos y bacterias (entre ellos *Fusarium moniliforme*), pero la adición de esferas de QN a la semilla (Tratamiento 2) produce un efecto protector en las hojas, las cuales no presentan desarrollo microbiano considerable. Estos comportamientos se apreciaron en las 3 muestras de hojas provenientes de distintas unidades experimentales para cada tratamiento.

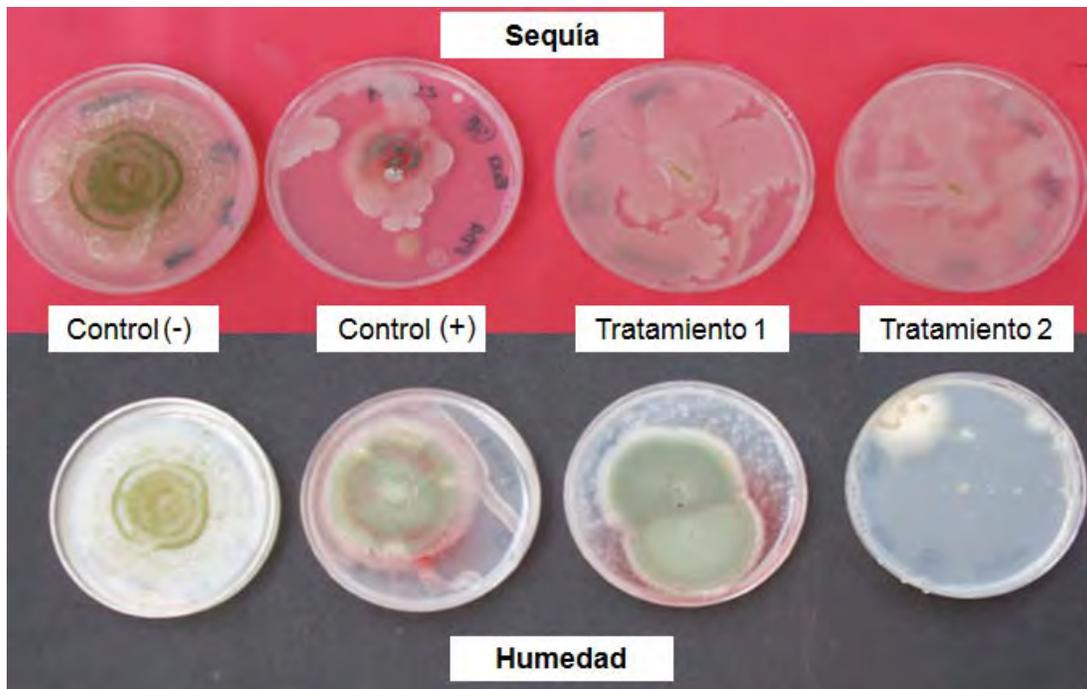


Figura 9. Siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas estresadas por modificaciones a las condiciones de riego de la tierra de cultivo. En la parte superior se presentan las hojas correspondientes a condiciones de sequía, mientras que en la parte inferior se presentan aquellas que corresponden a condiciones de humedad.

Resumiendo los resultados anteriores se tiene que:

- Las plántulas sometidas a estrés por sequía presentan síntomas de enfermedad a partir de la tercera semana de crecimiento debido a la dificultad de asimilación de nutrientes.
- Las longitudes de las hojas de las plántulas sometidas a estrés por humedad o sequía son menores que aquellas carentes de estrés.
- Los tallos bajo condiciones de sequía presentan mayor longitud que el resto durante las primeras 4 semanas. En la quinta semana su crecimiento se estanca y es superado por los tallos sometidos a condiciones de humedad.
- El grosor de los tallos es independiente del tratamiento aplicado y de las condiciones de riego impuestas.

- La modificación en las condiciones de riego repercute en el crecimiento normal de las plántulas, ya que su longitud es significativamente menor comparada con el Control (-).
- La estructura de la planta que se ve directamente afectada por el estrés hídrico es el tallo.
- Debido a las propiedades hidrofílicas del quitosán, las condiciones de humedad del suelo aunadas al tratamiento de las semillas con recubrimiento de QN favorecen el desarrollo de microorganismos en las estructuras foliares de la plántula por lo que, bajo estas condiciones, no es evidente la capacidad antimicrobiana del biopolímero.
- Bajo condiciones de sequía, se favorece el desarrollo de hongos y bacterias en la plántula, sin embargo, en estos sistemas, es posible que la inhibición fúngica se logre mediante la adición de quitosán en la semilla (tanto en recubrimiento como en esferas).

7.3 RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO CUALITATIVO DE LAS ESTRUCTURAS FOLIARES DE LAS PLÁNTULAS DE MAÍZ

En el apartado anterior se presentaron las figuras correspondientes a la siembra en agar de las estructuras foliares de las plántulas estresadas y sometidas a diferentes tratamientos. Para hacer más accesible esta información, a continuación se presenta un resumen tabular de los resultados obtenidos mediante el análisis microbiológico citado. Estos resultados son importantes porque a través de ellos puede evaluarse el posible efecto elicitor del quitosán y la manifestación del mismo no solo en la semilla, sino también en las hojas de la plántula. Por esta razón, se espera que las hojas provenientes de semillas tratadas con quitosán demuestren ausencia de patógenos debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, así como su capacidad de preservación.

TRATAMIENTO		ESTRÉS BIÓTICO	
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
Control (-)	Semilla sin estrés y sin recubrimiento	Crecimiento escaso pero evidente de <i>A. flavus</i> y de <i>F. moniliforme</i>	Crecimiento escaso pero evidente de <i>A. flavus</i> y de <i>F. moniliforme</i>
Control (+)	Semilla con estrés y sin recubrimiento	Presencia de otra variedad de <i>Aspergillus</i> (<i>A. niger</i>)	Crecimiento de colonias bacterianas y presencia de esporas aisladas de <i>A. flavus</i>
Tratamiento 1	Semilla con estrés y con recubrimiento de QN	Nulo crecimiento microbiano*	Crecimiento bacteriano
Tratamiento 2	Semilla con daño mecánico, con estrés y recubrimiento de QN	Crecimiento bacteriano	Escaso crecimiento bacteriano
Tratamiento 3	Semilla con daño mecánico, con estrés, esferas y recubrimiento de QN	Crecimiento fúngico (<i>Penicillium sp</i>)	Crecimiento bacteriano y de <i>F. moniliforme</i>

Tabla 8. Análisis cualitativo del crecimiento microbiano en las estructuras foliares de las plántulas de maíz provenientes de semillas estresadas de manera biótica.

* Existe la posibilidad de que haya habido algún error en la siembra en agar o algún factor externo haya interferido en los resultados.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la semilla que se empleó para la presente experimentación, pese a su alta calidad, trae consigo una carga microbiológica importante, la cual fue manifestada incluso en las hojas de la plántula proveniente de ella. Por esa razón, el Control (-) presenta crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*. De acuerdo a la *Tabla 8*, puede observarse que al recubrir con QN las semillas estresadas con *A. flavus*, es probable que se logre la inhibición del crecimiento microbiano incluso en las hojas, mientras que las semillas que previo al recubrimiento fueron dañadas mecánicamente, logran controlar satisfactoriamente el crecimiento fúngico. Para el caso de *F. moniliforme*, el QN como recubrimiento quizás actúa como un posible elicitor controlando adecuadamente el crecimiento microbiano en las plántulas de maíz.

TRATAMIENTO		ESTRÉS ABIÓTICO (pH)	
		pH ácido	pH alcalino
Control (-)	Semilla sin estrés y sin recubrimiento	Crecimiento escaso pero evidente de <i>A. flavus</i> y de <i>F. moniliforme</i>	Crecimiento escaso pero evidente de <i>A. flavus</i> y de <i>F. moniliforme</i>
Control (+)	Semilla con estrés y sin recubrimiento	Escaso crecimiento bacteriano	Escaso crecimiento bacteriano
Tratamiento 1	Semilla con estrés y con recubrimiento de QN	Crecimiento bacteriano y fúngico moderado (<i>F. moniliforme</i> y flora normal de la planta)	Crecimiento fúngico abundante (flora normal de la planta)
Tratamiento 2	Semilla con estrés, esferas y con recubrimiento de QN	Escaso crecimiento bacteriano	Colonias bacterianas aisladas

Tabla 9. Análisis cualitativo del crecimiento microbiano en las estructuras foliares de las plántulas de maíz provenientes de semillas estresadas por modificaciones en el pH del suelo.

En lo que respecta a la modificación de las condiciones de acidez del suelo, los resultados de la *Tabla 9* sugieren que los tratamientos con QN posiblemente combaten la generación de microorganismos durante el crecimiento de la plántula en condiciones ácidas, mientras que en condiciones alcalinas, es el Tratamiento 2 (recubrimiento y esferas) el que probablemente logra actuar como un elicitor en la plántula.

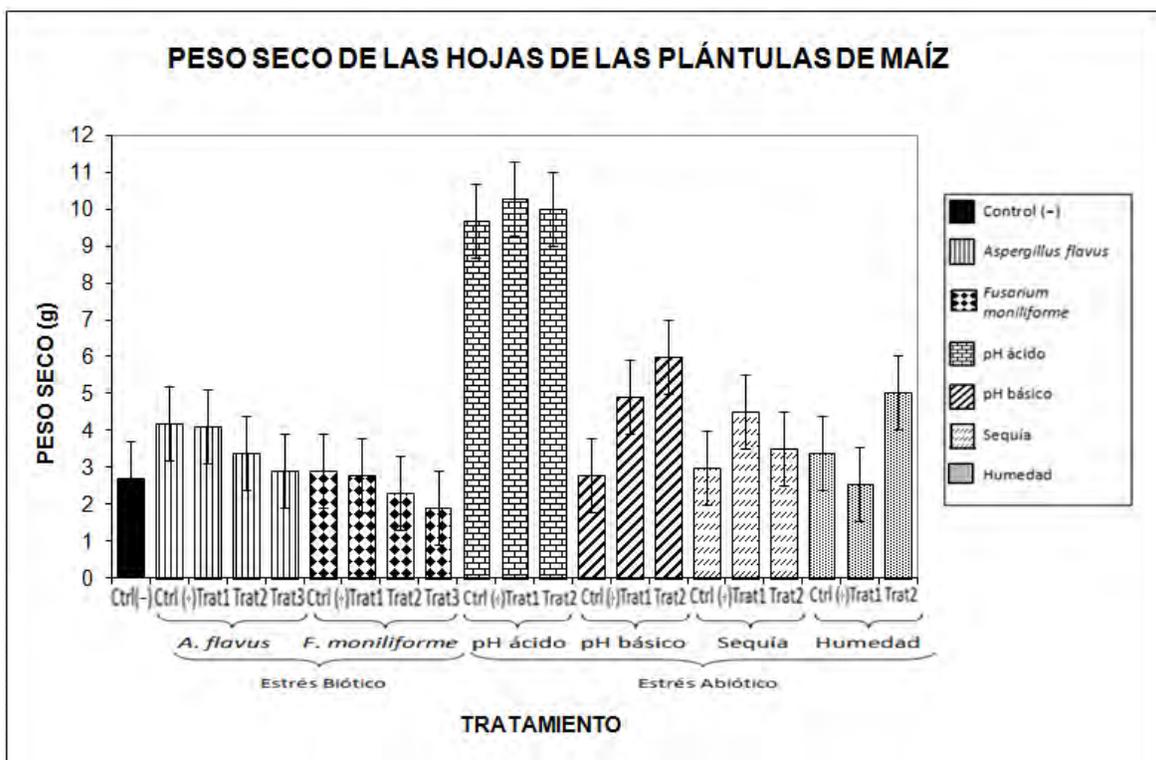
TRATAMIENTO		ESTRÉS ABIÓTICO (riego)	
		Sequía	Humedad
Control (-)	Semilla sin estrés y sin recubrimiento	Crecimiento escaso pero evidente de <i>A. flavus</i> y de <i>F. moniliforme</i>	Crecimiento escaso pero evidente de <i>A. flavus</i> y de <i>F. moniliforme</i>
Control (+)	Semilla con estrés y sin recubrimiento	Crecimiento bacteriano y fúngico moderado (<i>F. moniliforme</i> y <i>A. flavus</i>)	Crecimiento bacteriano y fúngico abundante (<i>F. moniliforme</i> , <i>A. flavus</i> y otros hongos)
Tratamiento 1	Semilla con estrés y con recubrimiento de QN	Escaso crecimiento bacteriano	Crecimiento bacteriano y fúngico abundante (<i>F. moniliforme</i> , <i>A. flavus</i> y otros hongos)
Tratamiento 2	Semilla con estrés, esferas y con recubrimiento de QN	Escaso crecimiento bacteriano	Escaso crecimiento bacteriano

Tabla 10. Análisis cualitativo del crecimiento microbiano en las estructuras foliares de las plántulas de maíz provenientes de semillas estresadas por modificaciones en las condiciones de riego.

De acuerdo a la *Tabla 10*, los microorganismos que se desarrollan en la plántula como consecuencia de la sequía pueden ser combatidos por ambos tratamientos, mientras que para condiciones de humedad, el posible efecto elicitor solo se manifiesta en aquellas plántulas sometidas a tratamiento combinado de recubrimiento y esferas de QN.

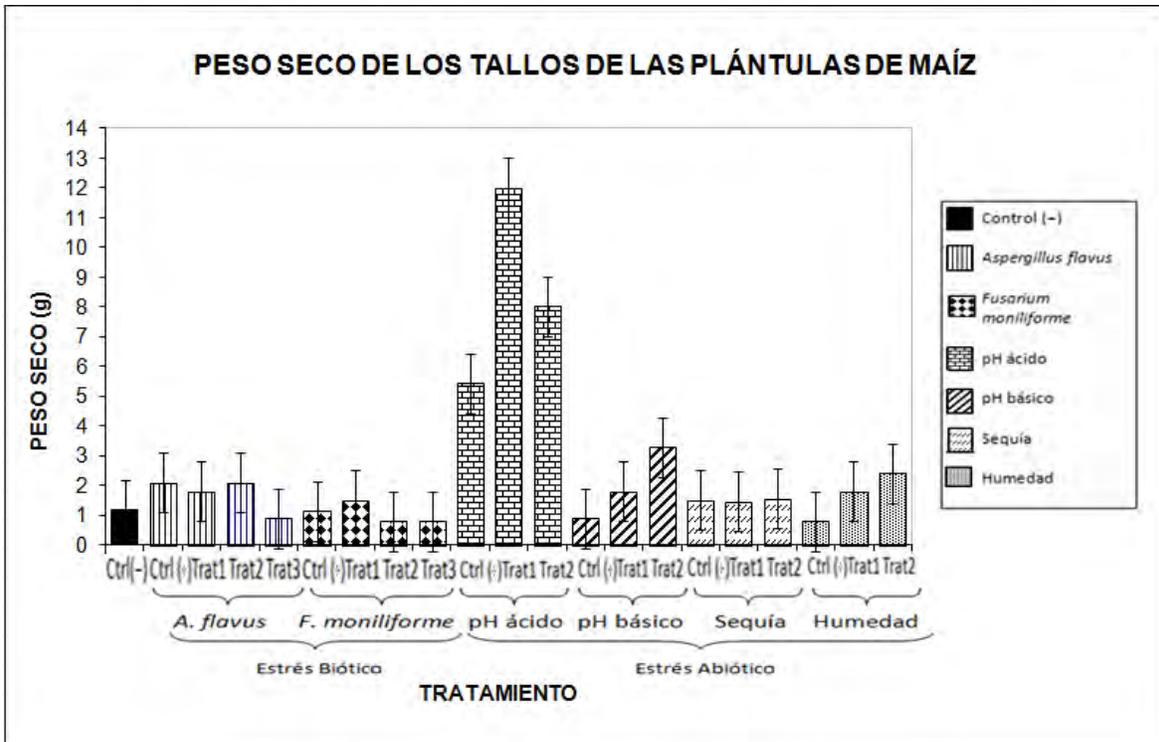
7.4 EVALUACIÓN DEL PESO SECO DE LAS PLÁNTULAS

A continuación se presentan los resultados correspondientes al peso seco de las plántulas y cada una de sus estructuras. Estas gráficas fueron realizadas considerando un intervalo de confianza de 0.95.

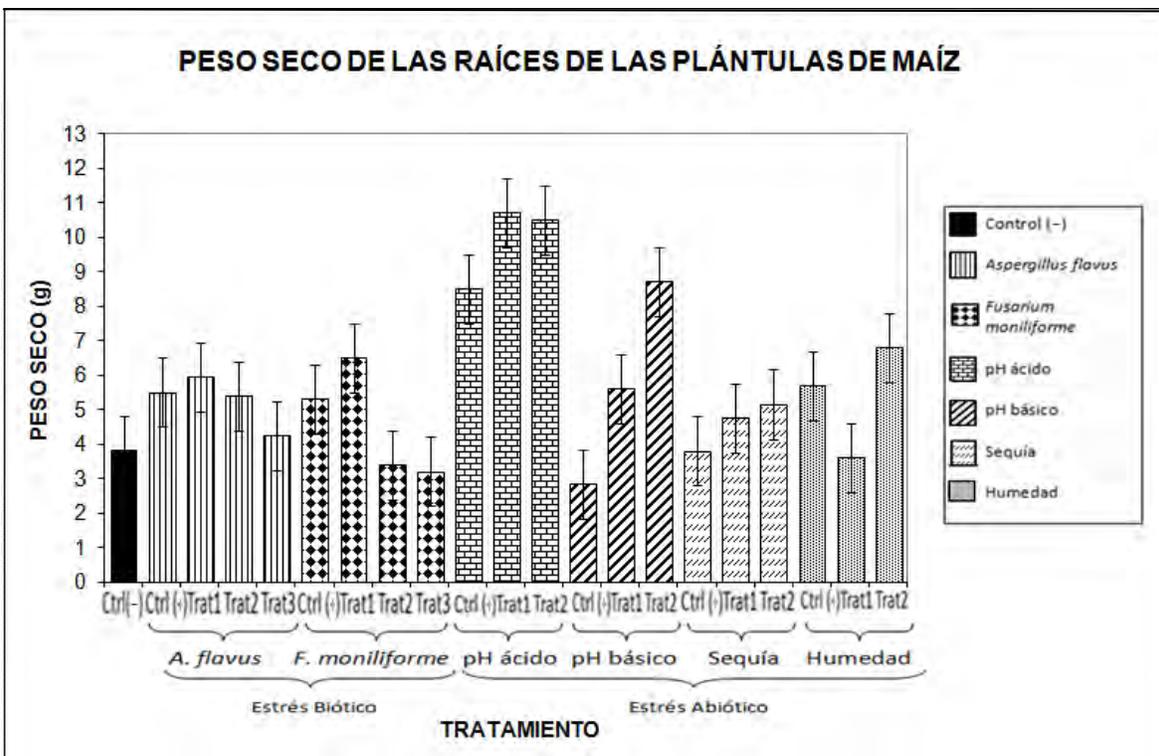


Gráfica 20. Pesos secos de las hojas de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos. El Control (-) es el mismo para todos los estreses.

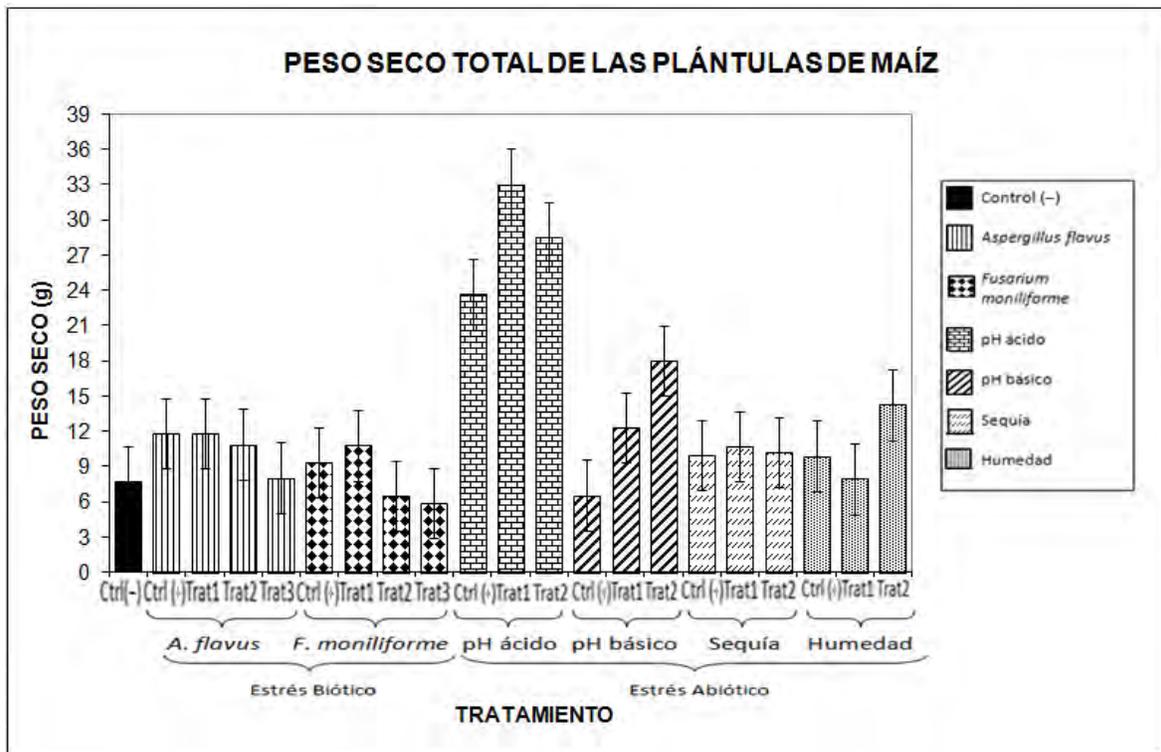
La Gráfica 20 muestra las diferencias en peso seco de las hojas de las plántulas de maíz. En lo que se refiere a los estreses, es evidente que el mayor peso seco lo presentan aquellas hojas correspondientes a las semillas cultivadas bajo condiciones de acidez (barras tabicadas), mientras que las plántulas que presentan menor peso seco (barras con rombos) son aquellas cuyas semillas fueron sometidas a estrés biótico por *Fusarium moniliforme*, registrando incluso pesos más bajos que el Control (-). En cuanto a los tratamientos, (independientemente del estrés) no existe diferencia significativa entre los pesos secos registrados para cada uno de los casos.



Gráfica 21. Pesos secos de los tallos de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos. El Control (-) es el mismo para todos los estreses.



Gráfica 22. Pesos secos de las raíces de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos. El Control (-) es el mismo para todos los estreses.



Gráfica 23. Pesos secos de las plántulas de maíz, bajo todos los estreses y todos los tratamientos. El Control (-) es el mismo para todos los estreses.

En lo que respecta a la medición del peso seco de cada una de las estructuras de la plántula, puede apreciarse que en todos los casos quienes presentan mayor peso son aquellas plántulas sometidas a estrés con pH ácido (barras tabicadas). De acuerdo a los estreses a los que fueron sometidas las unidades experimentales, la Gráfica 21 muestra que el peso seco de los tallos bajo condiciones de acidez supera de manera significativa al peso registrado por las plántulas sometidas a otros estreses, y de igual forma, a pH ácido los tallos provenientes de semillas recubiertas con quitosán (Tratamiento 1) presentan una diferencia de peso significativa con respecto al resto de los tratamientos. Al igual que en las hojas, los tallos que registraron menor peso son los correspondientes a las semillas inoculadas con *Fusarium moniliforme* seguidas por aquellas sometidas a estrés abiótico por sequía.

Para el caso de la evaluación de las raíces, la Gráfica 22 muestra una vez más que las que presentan mayor peso son aquellas estresadas por condiciones de acidez. Las semillas tratadas con recubrimiento de QN y estresadas con *A. flavus* y *F. moniliforme* al igual que aquellas sometidas a estrés por acidez, generaron raíces que registraron mayor peso, mientras que las

raíces de las semillas estresadas mediante condiciones de acidez y alcalinidad registraron mayor peso al estar recubiertas con QN y enriquecidas con esferas.

Finalmente, como puede verse en la *Gráfica 23* anteriormente presentada (en donde se evalúa el peso seco total de las plántulas), se observa y se confirma que el estrés que permite que la plántula desarrolle una mayor cantidad de material vegetal es la imposición de condiciones de acidez a la tierra de cultivo. Existe diferencia de peso entre estreses, ya que el peso seco de las plántulas sometidas a acidez es mucho mayor que el resto de los estreses. También hay que destacar que la barra de mayor longitud es la correspondiente al peso de las plántulas provenientes de semillas tratadas con recubrimiento de QN. Este resultado demuestra entonces que el QN es benéfico para que la planta ácida se desarrolle de manera óptima.

En lo que respecta a los tratamientos, estos no provocan diferencias significativas en los pesos secos de las plántulas sometidas a estrés biótico. Para el caso de los estreses abióticos ocurre lo contrario, ya que a pH ácido las plántulas provenientes de semillas recubiertas con QN presentan mayor peso que bajo el resto de los tratamientos, mientras que aquellas sometidas a condiciones de alcalinidad y humedad presentan mayores pesos al adicionárseles esferas de QN combinadas con el recubrimiento biopolimérico.

6. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en las páginas anteriores, constituyen una alternativa biotecnológica innovadora para la protección de las semillas de maíz que se puede traducir en el mejoramiento de los cultivos en nuestro país. A lo largo de las últimas décadas se han empleado una serie de herramientas biotecnológicas diversas para lograr el mejoramiento de la actividad agrícola; sin embargo muchas de ellas han sido criticadas debido a que en su mayoría involucran el uso de técnicas relacionadas con la introducción de químicos a los alimentos o bien transformación genética, tecnología transgénica, tecnología de ADN recombinante y tecnologías de modificación genética.

8.1 EL QUITOSÁN EN EL COMBATE DEL ESTRÉS BIÓTICO EN LOS CULTIVOS DE MAÍZ

El empleo del quitosán en solución como recubrimiento en las semillas de maíz puede ser una alternativa viable para la protección de este grano, ya que los resultados obtenidos mediante el análisis microbiológico cualitativo sugieren que el biopolímero actúa como un posible elicitor desarrollando mecanismos de defensa contra el estrés producido por *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, ya que la presencia de estos patógenos no se evidencia a nivel foliar aún después de la quinta semana de crecimiento de la plántula. Debido a que todos los cultivos agrícolas están expuestos de una u otra manera al ataque de patógenos, se ha implementado una gran cantidad de técnicas para disminuir los daños originados por hongos o bacterias a las plantas. En el caso del maíz, el combate contra las especies fúngicas se ha centrado principalmente después de la cosecha, en donde a través de procesos como la nixtamalización, se eliminan las fumonisinas presentes en el producto (Méndez y Moreno 2009), o bien, mediante la adición de bajas concentraciones de NaOH se logra la eliminación de una gran cantidad de aflatoxinas (Carrillo 2003). Estas han resultado técnicas exitosas para el logro de este fin; sin embargo la aparición de micotoxinas en el producto final es un problema que hay que solucionar de raíz. Por esta razón, es probable que si se aplica quitosán en las semillas a cultivar y los granos de las mazorcas que se obtengan son destinados para la siembra de la siguiente temporada, se irá reduciendo la carga microbiológica de la materia prima y después de varias generaciones podrán obtenerse mazorcas con concentraciones mínimas de micotoxinas, lo cual será benéfico tanto para la salud del

consumidor como para el bolsillo del productor, ya que se invertirían menos recursos en la compra de fungicidas debido a que el quitosán es un biopolímero de producción económica.

A pesar de que no existen estudios semejantes reportados en los que se haya aplicado el quitosán a las semillas de maíz, existe evidencia del funcionamiento de este biopolímero sobre algunos otros cultivos, tal es el caso del arroz, cuyas semillas se han recubierto y expuesto a su principal patógeno (*Pyricularia grisea*) observando como resultado una menor severidad de la enfermedad provocada por el hongo con respecto a las plantas testigo (Rodríguez-Pedroso y col. 2006). En dicha investigación, las hojas de las plántulas de arroz resultan ser más sanas con tratamiento que sin él, existiendo ausencia de enfermedad al menos durante la primera semana de desarrollo. El motivo de este comportamiento tanto para el cultivo de arroz como el de maíz, se fundamenta debido a que el quitosán es activador de algunas enzimas relacionadas con la defensa de las plantas contra patógenos, tales como la glucanasa, la quitinasa y la quitosanasa entre muchas otras, las cuales se encuentran activadas una vez que el patógeno llega al hospedero, por lo que las enzimas son capaces de reconocer los componentes de la pared celular del patógeno y comienzan a degradarlos afectando entonces su crecimiento y desarrollo en el cultivo constituyendo un método de combate efectivo contra éste sin afectar el desarrollo de la planta (Lienart et al. 1983).

En lo que respecta a la calidad y la capacidad germinativa de las semillas de maíz (Ver Gráfica 5), todas las semillas tratadas con recubrimiento de quitosán y sometidas a estrés biótico presentaron 100% de germinación, caso contrario con aquellas sin tratamiento o con esferas de quitosán, las cuales, a pesar de tener un porcentaje de germinación muy alto, no alcanzaron su capacidad germinativa total. Estos resultados coinciden con lo reportado por Bhaskara y sus colaboradores (1999), quienes recubrieron con quitosán semillas de trigo y observaron mayor germinación de estas comparadas con los testigos correspondientes, así como también observaron resistencia de la semilla tratada hacia el patógeno *Fusarium graminearum*.

De entre los beneficios que tiene el quitosán, destaca que es un biopolímero que se emplea con fines comestibles debido a su nula toxicidad. Este hecho contrasta con otros experimentos de protección de maíz, ya que algunos sistemas de control biológico (Bacon 2001) utilizan bacterias endofíticas (como *Bacillus subtilis*), en donde el mecanismo inhibitorio de acción opera en el

principio de exclusión competitivo; no obstante ese tipo de protección involucra la adición de bacterias patógenas al cultivo, lo cual lo convierte en un factor de riesgo para el consumo humano y animal.

8.2 EL QUITOSÁN EN EL COMBATE DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN LOS CULTIVOS DE MAÍZ

De acuerdo a la presente investigación, un pH cercano a 5.0 propició el óptimo crecimiento de las plántulas con ausencia de microorganismos patógenos en sus estructuras. Este resultado contradice a muchos autores quienes sostienen que la acidez de la tierra impide el óptimo desarrollo de los cultivos de maíz sin tratamientos previos a la semilla (Aguirre 2005, Jeglay y Cruz 2006). En este caso, la acidificación del suelo con compuestos químicos fosforados es una alternativa económica y segura para poder lograr un buen desarrollo del cultivo.

De hecho, una alternativa viable para poder acidificar de manera paulatina la tierra asegurando la protección de la planta contra patógenos, consiste en elaborar las esferas de quitosán en soluciones de fosfatos, o bien, en una solución de hidrogenofosfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (ya que es un fertilizante ampliamente utilizado porque suministra tanto nitrógeno como fósforo a las cosechas) combinada con alguna otra sal, de manera que en una sola aplicación pueda introducirse a la planta tanto el fertilizante como el posible inductor de mecanismos de defensa esperando tener menos daño físico en la misma debido a su capacidad para absorber los nutrientes de la tierra aunado a la asimilación del elicitador en cuestión.

Las prácticas usuales empleadas para lograr la acidificación del suelo consisten en agregar microbiota que es la encargada de degradar algunos nutrientes para generar compuestos nitrogenados y crear metabolitos secundarios los cuales puedan ser empleados por las plantas para su propia nutrición (Aguirre 2001); sin embargo, si no se tiene un buen control sobre los microorganismos de suelo, estos pueden ser atacados también por los patógenos de la planta y entrar en competencia por la supervivencia dando como resultado final un mayor daño en el cultivo debido a que compiten también con él para alimentarse del suelo que le provee los nutrimentos.

En lo que se refiere a la alcalinización del suelo y el estrés hídrico (sequía y humedad), el quitosán no representó una buena alternativa para el combate de estas problemáticas, ya que el comportamiento de las plántulas no se vio beneficiado en absoluto con el empleo del biopolímero en ninguna de sus dos presentaciones. De hecho son escasos los estudios publicados referentes al uso de elicitores contra estreses abióticos, ya que la mayoría de las investigaciones dedicadas al combate de estos factores están enfocadas a la creación de cultivos con resistencia intrínseca al estrés abiótico. Estos estudios se basan en las técnicas tradicionales de cruzamiento para la creación de plantas modificadas, como por ejemplo, aquellas manipuladas para producir un exceso de ácido cítrico en las raíces que, de ese modo, toleran mejor el aluminio presente en los suelos ácidos (De la Fuente 1997).

8.3 ELICITORES VS TRANSGÉNICOS

Hay que hacer hincapié en que la adición de quitosán a los cultivos, y en sí, de los elicitores en general, no provocan que las plantas se conviertan en alimentos transgénicos. Un alimento transgénico (Organismo Modificado Genéticamente, OMG) es un organismo vivo que ha sido creado de manera artificial a través de la manipulación de sus genes. Este tipo de manipulaciones se hace a través de Ingeniería Genética, aislando los segmentos de ADN de un ser vivo para introducirlos en el material hereditario de otro, generando en consecuencia un organismo mucho más resistente.

En nuestro país se han introducido maíces transgénicos, los cuales contienen en su material genético ADN de bacterias que les permiten producir sustancias insecticidas, propiciándoles una mayor resistencia a los factores de estrés a los que naturalmente se encuentran expuestos los cultivos. No obstante, esta alternativa ha sido muy criticada y rechazada tajantemente por algunos al comprobarse que esta “contaminación genética” también genera contaminación de suelo, pérdida de la biodiversidad, desarrollo de resistencias en insectos patógenos e, incluso, daños sanitarios a los consumidores, ya sea animales o humanos, los cuales se manifiestan como reacciones alérgicas, presencia de sustancias tóxicas en el organismo o daños genéticos al propio consumidor (Puigdomenech 2009).

Es por ello que a través de esta investigación se pretende dejar en claro que la manipulación de cultivos transgénicos no es la única alternativa biotecnológica para mejorar las características de los cultivos. El manejo de sustancias bioquímicas y su empleo como elicitores se ha convertido en una alternativa viable y relativamente económica para lograr el mejoramiento de las especies que se cultivan, pues con ellos se logra el control de fitopatógenos y se favorecen las características de los cultivos sin dañar su estructura genética de manera deliberada, sino reforzándola a través de la activación de mecanismos de defensa propios de la planta al interactuar con los patógenos, o bien con agentes bioquímicos como las glicoproteínas o los oligosacáridos; éstos últimos, capaces de llevar a cabo la producción de metabolitos secundarios en los cultivos celulares de las plantas.

6. CONCLUSIONES

- El quitosán en solución, aplicado como recubrimiento en las semillas de maíz *in vitro*, tiene efectos positivos sobre su crecimiento, germinación, vigor y contenido de humedad.
- El recubrimiento de las semillas con quitosán tiene, en general, efectos negativos sobre las variables de crecimiento asociadas a la fenología de las plántulas bajo condiciones de invernadero.
- Los resultados obtenidos mediante el análisis microbiológico de las estructuras foliares de las plántulas de maíz sugieren que el quitosán aplicado a la semilla en forma de recubrimiento controlan el crecimiento fúngico, por lo que el quitosán actúa como un posible elicitador contra el estrés producido por *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*.
- La aplicación de esferas de quitosán en NaOH a las semillas de maíz entorpece el desarrollo normal de las mismas produciendo plántulas con menores dimensiones comparándolas con el control.
- La acidificación de la tierra de cultivo ($\text{pH} \approx 5$) *per se*, promueve un mayor crecimiento de la plántula. De igual manera, el pH ácido permite que los tallos, hojas y raíces crezcan más largos, gruesos y vigorosos.
- La alteración en las condiciones de riego impide el crecimiento normal de las plántulas, aún de aquellas que se encuentran tratadas con quitosán en sus dos presentaciones.
- El mejor tratamiento para producir plántulas de maíz de alta calidad consiste en sembrar las semillas (tratadas con quitosán al 2% y secadas naturalmente) en tierra con pH ácido ($\text{pH} \approx 5$). Conforme la planta crece, puede observarse la ausencia de enfermedad y el desarrollo de hojas largas, anchas y con abundantes vellosidades, tallos largos, gruesos y vigorosos, raíces copiosas, largas y gruesas; cualitativamente las hojas y tallos presentan una coloración totalmente verde, caso contrario con el resto de los experimentos, que ya

sea por invasión de la planta por los hongos o bien, por carencias nutricionales, adoptan conforme pasa el tiempo, coloraciones de distintas tonalidades, oscilando entre el amarillo, el anaranjado y el café hasta llegar al morado.

7. PERSPECTIVAS

El desarrollo de la presente investigación deja el campo abierto para que se lleven a cabo estudios semejantes utilizando otros cereales, e incluso empleando también maíces de otras variedades.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo son prometedores debido a que el empleo del quitosán como recubrimiento en las semillas resultó ser una buena alternativa para la protección del maíz; sin embargo, aún es necesario determinar a nivel molecular cómo funciona este elicitor sobre las plántulas del citado cereal. De hecho este estudio se realizará próximamente, para de esta manera, poder entender los mecanismos de acción e interacción del biocontrol que ejerce el polímero sobre el cultivo, así como también determinar cuáles son los genes que se expresan como resultado de la inducción de la defensa.

De igual manera es importante mencionar que así como en esta experimentación se obtuvieron diferentes resultados a nivel laboratorio y a nivel invernadero, es probable que si se escala este estudio a nivel de campo y ante la dificultad de no poder manipular algunas variables (como lo son la temperatura y las precipitaciones pluviales) los resultados se vean modificados, por ello es que se tiene pensado llevar esta investigación al campo para evaluar el comportamiento de las unidades experimentales en su hábitat natural.

6. ANEXOS

ANEXO No. 1:

CONTENIDO NUTRIMENTAL DE LOS MAÍCES BLANCO Y AMARILLO

- **MAÍZ AMARILLO**

Residuos: 0%

Nombre Científico: *Zea mays mays L.*

NDB No: 20014 (Valores nutritivos y pesos correspondientes a una porción comestible de 100g)

Nutriente	Unidades	Valor por 100 gramos
Agua	g	10.37
Energía	kcal	365
Energía	kJ	1527
Proteína	g	9.42
Total de lípido (grasa)	g	4.74
Cenizas	g	1.20
Carbohidratos, por diferencia	g	74.26
Fibra dietética total	g	7.3
Azúcares, total	g	0.64
Minerales		
Calcio, Ca	mg	7
Hierro, Fe	mg	2.71
Magnesio, Mg	mg	127
Fósforo, P	mg	210
Potasio, K	mg	287
Sodio, Na	mg	35
Zinc, Zn	mg	2.21
Cobre, Cu	mg	0.314
Manganeso, Mn	mg	0.485
Selenio, Se	mcg	15.5
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	0.0
Tiamina	mg	0.385

Riboflavina	mg	0.201
Niacina	mg	3.627
Ácido Pantoténico	mg	0.424
Vitamina B-6	mg	0.622
Folato, total	mcg	19
Ácido fólico	mcg	0
Folato, alimento	mcg	19
Folato, DFE	mcg_DFE	19
Vitamina B-12	mcg	0.00
Vitamina B-12, adicionada	mcg	0.00
Vitamina A, RAE	mcg_RAE	11
Retinol	mcg	0
Caroteno, beta	mcg	97
Caroteno, alfa	mcg	63
Criptoxantina, beta	mcg	0
Vitamina A, IU	IU	214
Licopeno	mcg	0
Luteína + zeaxantina	mcg	1355
Vitamina E (alfa-tocoferol)	mg	0.49
Vitamina E, adicionada	mg	0.00
Vitamina K (filoquinona)	mcg	0.3
Lípidos		
Ácidos grasos, saturados totales	g	0.667
16:0	g	0.569
18:0	g	0.075
Ácidos grasos, monoinsaturados totales	g	1.251
16:1 no diferenciados	g	0.004
18:1 no diferenciados	g	1.247
Ácidos grasos, polinsaturados totales	g	2.163
18:2 no diferenciados	g	2.097
18:3 no diferenciados	g	0.065
Colesterol	mg	0
Aminoácidos		
Triptofano	g	0.067
Treonina	g	0.354
Isoleucina	g	0.337
Leucina	g	1.155

Lisina	g	0.265
Metionina	g	0.197
Cistina	g	0.170
Fenilalanina	g	0.463
Tirosina	g	0.383
Valina	g	0.477
Arginina	g	0.470
Histidina	g	0.287
Alanina	g	0.705
Ácido aspártico	g	0.655
Ácido glutámico	g	1.768
Glicina	g	0.386
Prolina	g	0.822
Serina	g	0.447
Otros		
Alcohol etílico	g	0.0
Cafeína	mg	0
Teobromina	mg	0

Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 (2008)

- **MAÍZ BLANCO**

Residuos: 0%

NDB No: 20314 (Valores nutritivos y pesos correspondientes a una porción comestible de 100g)

Nutriente	Unidades	Valor por 100 gramos
Agua	G	10.37
Energía	kcal	365
Energía	kJ	1527
Proteína	G	9.42
Total de lípidos (Grasa)	G	4.74
Cenizas	G	1.20
Carbohidratos, por diferencia	G	74.26
Minerales		

Calcio, Ca	mg	7
Hierro, Fe	mg	2.71
Magnesio, Mg	mg	127
Fósforo, P	mg	210
Potasio, K	mg	287
Sodio, Na	mg	35
Zinc, Zn	mg	2.21
Cobre, Cu	mg	0.314
Manganeso, Mn	mg	0.485
Selenio, Se	mcg	15.5
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	0.0
Tiamina	mg	0.385
Riboflavina	mg	0.201
Niacina	mg	3.627
Ácido Pantoténico	mg	0.424
Vitamina B-6	mg	0.622
Vitamina B-12	mcg	0.00
Vitamina B-12, adicionada	mcg	0.00
Vitamina A, RAE	mcg_RAE	0
Retinol	mcg	0
Vitamina A, IU	IU	0
Lípidos		
Ácidos grasos saturados totales	G	0.667
16:0	G	0.569
18:0	G	0.075
Ácidos grasos monoinsaturados totales	G	1.251
16:1 no diferenciados	G	0.004
18:1 no diferenciados	G	1.247
Ácidos grasos, polinsaturados totales	G	2.163
18:2 no diferenciados	G	2.097
18:3 no diferenciados	G	0.065
Colesterol	mg	0
Aminoácidos		
Triptofano	G	0.067
Treonina	G	0.354
Isoleucina	G	0.337

Leucina	G	1.155
Lisina	G	0.265
Metionina	G	0.197
Cistina	G	0.170
Fenilalanina	G	0.463
Tirosina	G	0.383
Valina	G	0.477
Arginina	G	0.470
Histidina	G	0.287
Alanina	G	0.705
Ácido aspártico	G	0.655
Ácido glutámico	G	1.768
Glicina	G	0.386
Prolina	G	0.822
Serina	G	0.447

Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 (2008)

ANEXO No. 2:**PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y TOXICOLÓGICAS DE LOS REACTIVOS INVOLUCRADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN** (Staff Merck & Co. 2001).

ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL	
Fórmula	CH ₃ COOH
Peso Molecular	60.05 g/mol
Punto de Ebullición	118°C
Punto de Fusión	16.7°C
Densidad Relativa	10.49 g/mL
Solubilidad	Miscible con alcohol, agua, glicerol, éter y tetracloruro de carbono. Prácticamente insoluble en disulfuro de carbono.
Aspecto Físico	Líquido y de olor penetrante.
Características Químicas	Excelente solvente de una gran variedad de compuestos orgánicos, fósforo y azufre.
Toxicología	Su ingestión causa corrosión severa en la boca y en el tracto digestivo. La exposición crónica puede causar erosión del esmalte dental, bronquitis e irritación ocular.
Usos y Aplicaciones	Para la manufactura de acetatos, compuestos acetilados, acetato de celulosa, acetato de rayón, plásticos y resinas; como acidulante y preservativo en alimentos; solvente para gomas y resinas, aceites volátiles y otras sustancias. También se emplea para síntesis orgánicas comerciales y como aditivo acidificante en la Industria farmacéutica.

POLIETILENGLICOL 4000 (PEG 4000)	
Fórmula	H(OCH ₂ CH ₂) _n OH n=68-64
Peso Molecular	3000 - 3700 g/mol
Punto de Fusión	64-58°C
Densidad Relativa	1.212 g/mL
Solubilidad	En la mayoría de los solventes orgánicos y en hidrocarburos aromáticos.
Aspecto Físico	Polvo blanco y hojuelas blanquecinas o cremosas.
Características Químicas	No se hidroliza ni deteriora por efecto del almacenamiento. Es disolvente de algunos plásticos.
Toxicología	En general los polietilenglicoles presentan bajas toxicidades.
Usos y Aplicaciones	Empleados como lubricante solubles en agua para moldes de caucho, fibras textiles, y operaciones de formación de metales. Se emplean en alimentos y empaque de alimentos. En preparaciones para el cabello y cosméticos en general. Se emplea como aditivo farmacéutico y como fase estacionaria en cromatografía de gases. También se emplea en pinturas de agua, recubrimientos de papel y en la Industria de cerámicos.

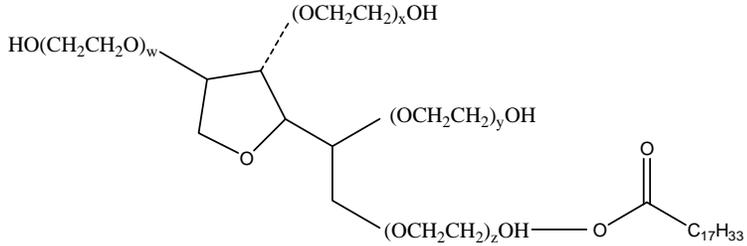
ÁCIDO FOSFÓRICO	
Fórmula	H ₃ PO ₄
Peso Molecular	98.0 g/mol
Punto de Ebullición	1390°C
Solubilidad	Soluble en agua y en mezclas de alcoholes.
Aspecto Físico	Puede usarse en forma de cristales o en estado líquido.
Características Químicas	Tiene sabor ácido agradable en altas diluciones. Al volverse anhídrido se convierte fácilmente en ácido pirofosfórico y se transforma a ácido metafosfórico cuando se calienta a 300°C. El ácido fosfórico concentrado y caliente ataca materiales como la porcelana y el granito.
Toxicología	La exposición prolongada puede causar irritación del tracto respiratorio, ojos y piel; así como dermatitis y quemaduras en piel y ojos.
Usos y Aplicaciones	En la manufactura de superfosfatos para fertilizantes, otras sales de fosfato, polifosfatos y detergentes. Catalizador ácido para la elaboración de etileno y como purificador de peróxido de hidrógeno. Empleado como acidulante y saborizante, acidulante sinérgico y secuestrador en alimentos. Es empleado como solvente en aplicaciones farmacéuticas. Empleado para la elaboración de cementos dentales, para proteger metales antes de pintarlos y como reactivo analítico.

CARBONATO DE CALCIO	
Fórmula	CaCO ₃
Peso Molecular	100.09 g/mol
Punto de Fusión	825 °C – 1339°C dependiendo de la forma en la que se encuentre en la naturaleza.
Densidad Relativa	2.711 g/mL – 2.83 g/mL dependiendo de la forma en la que se encuentre en la naturaleza.
Solubilidad	Soluble en ácidos diluidos y prácticamente insoluble en agua.
Aspecto Físico	Cristales o polvo blanco.
Características Químicas	Es inodoro y sin sabor. Se puede obtener directamente de la naturaleza, aunque en combinación con otros agentes se forman los gises y Carbonatos de distintas purezas.
Toxicología	Su inhalación puede irritar las mucosas nasales.
Usos y Aplicaciones	En la manufactura de pinturas, caucho, plástico, papel, cerámicas, insecticidas, tintas, adhesivos, cerillos, lápices, crayones, linóleum, etc. Empleado en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, antibióticos, y para remover la acidez en los vinos. Se usa en química analítica para la detección y determinación de halógenos en combinaciones orgánicas y para análisis de aguas. También es un efectivo suplemento alimenticio en animales

HIPOCLORITO DE SODIO (diluido)	
Fórmula	NaClO
Peso Molecular	74.44 g/mol
Densidad Relativa	1.11 g/mL
Solubilidad	Muy soluble en agua
Aspecto Físico	Líquido incoloro o ligeramente amarillento.
Características Químicas	Olor clorado característico.
Toxicología	Su ingestión puede causar corrosión de las membranas mucosas, perforación esofágica, gástrica o edema laríngeo. El contacto prolongado con la piel causa irritación.
Usos y Aplicaciones	Se emplea como blanqueador, antiséptico en animales y desinfectante.

HIDRÓXIDO DE SODIO	
Fórmula	NaOH
Peso Molecular	40.0 g/mol
Punto de Ebullición	1390°C
Punto de Fusión	318°C
Densidad Relativa	2.1 g/mL
Solubilidad	Altamente soluble en agua con desprendimiento de calor.
Aspecto Físico	Sólido blanco, delicuescente en diversas formas e inodoro; sustancia incolora e higroscópica que se vende en forma de trozos, escamas, hojuelas, granos o barras.
Características Químicas	Base fuerte, reacciona violentamente con ácidos; corrosiva en ambientes húmedos para metales (cinc, aluminio, estaño y plomo), originando hidrógeno combustible y explosivo. Ataca a algunas formas de plástico, caucho y recubrimientos. Absorbe rápidamente dióxido de carbono y agua del aire. Puede generar calor en contacto con la humedad o el agua.
Toxicología	Se puede absorber por inhalación del aerosol y por ingestión. Es muy corrosivo para los ojos, la piel y el tracto respiratorio. El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis.
Usos y Aplicaciones	En la industria química, principalmente en forma de lejía de sosa, que se prepara por disolución en agua de la sosa sólida. Se emplea también en industrias de algodón, sed artificial, plásticos, textiles y jabones, así como en la fabricación de diversos productos químicos entre otros usos.

TWEEN 80 (POLISORBATO)

Fórmula	
Solubilidad	Muy soluble en agua, soluble en alcohol, aceite de maíz, acetato de etilo, metanol y tolueno. Insoluble en aceite mineral.
Aspecto Físico	Líquido aceitoso de color ámbar.
Características Químicas	Surfactante no iónico derivado de esteres de sorbitan.
Toxicología	No es tóxico.
Usos y Aplicaciones	Como emulsificante y agente dispersante en productos medicinales, así como emulsificante en alimentos. También empleado como surfactante en aplicaciones farmacéuticas.

ANEXO No. 3:

**CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE AGUA DE RIEGO NECESARIA PARA CADA UNIDAD EXPERIMENTAL.
(Moreno 1996)**

a) DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA DEL SUELO

	REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3
W1	47.900 g	48.150 g	48.230 g
W2	382.510 g	335.510 g	207.180 g
W3	217.120 g	202.240 g	281.610 g
WL	165.390 g	133.270 g	179.530 g
WS	169.220 g	154.090 g	102.080 g
WK	97.736 %	86.488 %	131.300 %
μ (WK)	87.3213 %		

Donde:

W1= Peso de la lata de aluminio vacía [g]

W2= Peso de la lata de aluminio + suelo + agua (antes del secado en estufa) [g]

W3= Peso de la lata de aluminio + suelo (después del secado en estufa) [g]

WL= Pérdida de agua **(W2-W3)** [g]

WS= Peso seco del suelo **(W3-W1)** [g]

WK= Capacidad de retención de agua del suelo **(WL/WS)100%** [%]

μ (WK)= Media de la capacidad de retención de agua del suelo seco [%]

b) DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO

	REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3
A	48.190 g	48.440 g	48.500 g
B	89.750 g	90.170 g	90.290 g
C	41.560 g	41.730 g	41.790 g
D	84.358 g	84.698 g	85.140 g
E	5.392 g	5.472 g	5.150 g
F	36.168 g	36.258 g	36.640 g
G	14.908 %	15.091 %	14.055 %
H	12.974 %	13.112 %	13.323 %
μ (g)	14.680 %		
μ (h)	13.136 %		

Donde:

a= Peso de la lata de aluminio vacía [g]

b= Peso de la lata de aluminio + suelo [g]

c= Peso de la lata de aluminio + suelo húmedo [g]

d= Peso de la lata de aluminio + suelo después del secado en estufa [g]

e= Pérdida de agua (b-d) [g]

f= Peso del suelo seco (c/e) [g]

g= Contenido de humedad del suelo en base a peso seco (e/f)100 [%]

h= Contenido de humedad del suelo en base a peso húmedo (e/c)100 [%]

μ (g)= Media del contenido de humedad del suelo en base a peso seco [%]

μ (h)= Media del contenido de humedad del suelo en base a peso húmedo [%]

c) DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AGUA NECESARIA PARA AGREGAR AL SUELO

	REPETICIÓN 1	REPETICIÓN 2	REPETICIÓN 3
B	25.030 g	25.010 g	25.010 g
H	12.97%	13.11%	13.32%
WK	97.74%	86.49%	77.74%
P	40%	40%	40%
W(H₂O)	5.268 mL	4.238 mL	3.408 mL
μ W(H₂O)	4.305 mL		

Donde:

B= Peso de la muestra de suelo [g]

h= Contenido de humedad del suelo en base a peso húmedo $(e/c)100$ [%]

WK= Capacidad de retención de agua del suelo [%]

P= (K) Porcentaje requerido de capacidad de retención de agua. [%]
(40% recomendado para el cultivo de maíz)

$$W(H_2O) = \frac{(B)(100-h)(WK)(P)}{10^5} - \frac{(B)(h)}{100}$$

W(H₂O)= Cantidad requerida de agua que se debe añadir al suelo para ajustar el contenido de humedad a un deseado porcentaje de capacidad de retención de agua. [mL]

d) DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AGUA NECESARIA PARA AGREGAR A CADA MACETA.

25 g de tierra → 4.305 mL H₂O

7000 g de tierra → 1205.4 mL H₂O

ANEXO No. 4:

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. (Statistica Release 7)

PARTE 1: PRUEBAS PRELIMINARES (ESTUDIO *in vitro*)

I. ANOVAs para experimentos con un factor y diseño completamente aleatorio:

**Valores de probabilidad marcados con asterisco son estadísticamente significativos ($\alpha=0.05$)*

a) Contenido de Humedad:

Effect	SS	D...	MS	F	p
TRATAMIENTOS	103.6	4	25.91	4.311	.028*

b) Germinación Estándar:

Effect	SS	D...	MS	F	p
TRATAMIENTOS	4.216	4	1.054	.925	.481

c) Longitud de la Plúmula:

Effect	SS	D...	MS	F	p
TRATAMIENTOS	80.62	4	20.16	26.13	.000*

II. Pruebas *a posteriori* para determinación de las diferencias significativas:

**Medias con letra distinta dentro de las columnas presentan diferencia estadística ($\alpha=0.05$)*

a) Contenido de Humedad: **(Gráfica 1)**

Tukey HSD test; variable % DE HUMEDAD (idea.sta)
Homogenous Groups, alpha = .05000 p=0.028
Error: Between MS = 6.0106, df = 10.0

TRATAMIENTOS	% DE HUMEDAD Mean	1	2
QN2%. T=29°C, t=24hrs	6.92467	a	
QN2% + PEG0.6%	7.96591	a	
Control	8.87087	a	b
QN2% + PEG0.3%	10.18143	a	b
QN 2%	14.48768		b

Duncan test; variable % DE HUMEDAD (idea.sta)
Homogenous Groups, alpha = .05000 p=0.028
Error: Between MS = 6.0106, df = 10.00

TRATAMIENTOS	% DE HUMEDAD Mean	1	2
QN2%. T=29°C, t=24hrs	6.92467	a	
QN2% + PEG0.6%	7.96591	a	
Control	8.87087	a	
QN2% + PEG0.3%	10.18143	a	
QN 2%	14.48768		b

b) Longitud de la Plúmula: **(Gráfica 3)**

Tukey HSD test; variable VIGOR (Longitud de la Plúmula)
Homogenous Groups, alpha = .05000 p=0.00001
Error: Between MS = .77148, df = 12.0

TRATAMIENTOS	VIGOR (Longitud de la Plúmula) Mean	1	2
QN2% + PEG0.6%	7.66667		a
QN2% + PEG0.3%	9.28667		a
QN 2%	12.00415	b	
Control	12.41247	b	
QN2%. T=29°C, t=24h	14.01200	b	

Duncan test; variable VIGOR (Longitud de la Plúmula) (vigor.sta)
Homogenous Groups, alpha = .05000 p=0.00001
Error: Between MS = .77148, df = 12.00

TRATAMIENTOS	VIGOR (Longitud de la Plúmula) Mean	1	2	3	4
QN2% + PEG0.6%	7.66667		b		
QN2% + PEG0.3%	9.28667			c	
QN 2%	12.00415	a			
Control	12.41247	a			
QN2%. T=29°C, t=24h	14.01200				d

PARTE 2: PRUEBAS EN INVERNADERO (ESTUDIO *in vivo*)

- I. ANOVAs para las mediciones de las plántulas de maíz sometidas a estrés por *Aspergillus flavus* (Experimentos con observaciones repetidas).

*Valores de probabilidad marcados con asterisco son estadísticamente significativos ($\alpha=0.05$)

a) Longitud de las hojas:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	46.	4	11.4	2.1	.160
TIEMPO	2410.	3	803.4	437.2	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	31.	12	2.6	1.4	.220

b) Longitud de los Tallos:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	14.8	4	3.70	3.4	.052
TIEMPO	211.2	3	70.40	144.4	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	7.2	12	.60	1.2	.313

c) Grosor de los Tallos:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	3.91	4	.976	7.39	.005*
TIEMPO	17.59	3	5.864	85.44	.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	1.25	12	.104	1.52	.173

d) Longitud de las Plántulas:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	86.	4	21.	3.	.071
TIEMPO	125E2	4	3113.	1548.	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	73.	16	5.	2.	.018*

III. ANOVAs para las mediciones de las plántulas de maíz sometidas a estrés por *Fusarium moniliforme* (Experimentos con observaciones repetidas).

*Valores de probabilidad marcados con asterisco son estadísticamente significativos ($\alpha=0.05$)

a) Longitud de las hojas:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	73.	4	18.2	2.1	.157
TIEMPO ☆	1828.	3	609.2	385.7	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO ☆	79.	12	6.6	4.2	.001*

b) Longitud de los Tallos:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO ☆	44.8	4	11.19	6.4	.008*
TIEMPO ☆	163.1	3	54.37	271.7	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO ☆	8.8	12	.74	3.7	.002*

c) Grosor de los Tallos:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	2.43	4	.609	1.92	.184
TIEMPO ☆	13.09	3	4.364	71.72	.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	1.31	12	.109	1.79	.096

d) Longitud de las Plántulas:

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
TRATAMIENTO	179.	4	45.	3.	.071
TIEMPO ☆	103E2	4	2578.	1050.	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO ☆	183.	16	11.	5.	.000*

VII. ANOVAs para las mediciones de las plántulas de maíz sometidas a estrés por acidez o alcalinización de la tierra de cultivo (Experimentos con observaciones repetidas).

*Valores de probabilidad marcados con asterisco son estadísticamente significativos ($\alpha=0.05$)

a) Longitud de las hojas:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
pH	☆	205.	1	205.	8.9	.009*
TRATAMIENTO		111.	3	37.	1.6	.228
pH*TRATAMIENTO		97.	3	32.	1.4	.279
TIEMPO	☆	3885.	3	1295.	665.1	0.000*
TIEMPO*pH		4.	3	1.	.6	.600
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	38.	9	4.	2.2	.039*
TIEMPO*pH*TRATAMIENTO		8.	9	1.	.5	.892

b) Longitud de los Tallos:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
pH	☆	96.4	1	96.4	56.3	.000*
TRATAMIENTO		1.1	3	.4	.2	.885
pH*TRATAMIENTO	☆	33.2	3	11.1	6.5	.005*
TIEMPO	☆	809.5	3	269.8	574.1	0.000*
TIEMPO*pH	☆	83.0	3	27.7	58.9	.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	12.4	9	1.4	2.9	.008*
TIEMPO*pH*TRATAMIENTO	☆	28.0	9	3.1	6.6	.000*

c) Grosor de los Tallos:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
pH	☆	4.17	1	4.17	29.1	.000*
TRATAMIENTO	☆	2.13	3	.71	5.0	.013*
pH*TRATAMIENTO	☆	2.01	3	.67	4.7	.016*
TIEMPO	☆	74.07	3	24.69	407.9	0.000*
TIEMPO*pH	☆	4.45	3	1.48	24.5	.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	2.06	9	.23	3.8	.001*
TIEMPO*pH*TRATAMIENTO	☆	1.69	9	.19	3.1	.005*

d) Longitud de las Plántulas:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
pH	☆	945.	1	945.	67.	.000*
TRATAMIENTO		23.	3	8.	1.	.657
pH*TRATAMIENTO	☆	321.	3	107.	8.	.002*
TIEMPO	☆	305E2	4	7620.	2326.	0.000*
TIEMPO*pH	☆	1165.	4	291.	89.	0.000*
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	221.	12	18.	6.	.000*
TIEMPO*pH*TRATAMIENTO	☆	397.	12	33.	10.	.000*

XII. ANOVAs para las mediciones de las plántulas de maíz sometidas a estrés por modificación en las condiciones de riego (Experimentos con observaciones repetidas).

**Valores de probabilidad marcados con asterisco son estadísticamente significativos ($\alpha=0.5$)*

a) Longitud de las hojas:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
RIEGO	☆	205.	1	205.	8.9	.009*
TRATAMIENTO		111.	3	37.	1.6	.228
RIEGO*TRATAMIENTO		97.	3	32.	1.4	.279
TIEMPO	☆	3885.	3	1295.	665.1	0.000*
TIEMPO*RIEGO		4.	3	1.	.6	.600
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	38.	9	4.	2.2	.039*
TIEMPO*RIEGO*TRATAMIENTO		8.	9	1.	.5	.892

b) Longitud de los Tallos:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
RIEGO		8.4	1	8.4	2.7	.117
TRATAMIENTO	☆	59.0	3	19.7	6.4	.005*
RIEGO*TRATAMIENTO		5.0	3	1.7	.5	.657
TIEMPO	☆	327.1	3	109.0	335.1	0.000*
TIEMPO*RIEGO	☆	3.1	3	1.0	3.1	.034*
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	9.4	9	1.0	3.2	.004*
TIEMPO*RIEGO*TRATAMIENTO		1.2	9	.1	.4	.915

c) Grosor de los Tallos:

Effect		SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
RIEGO		.06	1	.063	.2	.691
TRATAMIENTO		2.11	3	.703	1.8	.179
RIEGO*TRATAMIENTO		.76	3	.255	.7	.583
TIEMPO	☆	23.62	3	7.873	121.3	0.000*
TIEMPO*RIEGO	☆	1.08	3	.360	5.6	.002*
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	1.46	9	.162	2.5	.020*
TIEMPO*RIEGO*TRATAMIENTO		.46	9	.051	.8	.632

d) Longitud de las Plántulas:

Effect		SS	D...	MS	F	p
CONDICIONES DE RIEGO	☆	269.	1	269.	8.	.013*
TRATAMIENTO		294.	3	98.	3.	.072
CONDICIONES DE RIEGO*TRATAMIENTO		135.	3	45.	1.	.307
TIEMPO	☆	193E2	4	4830.	1139.	0.000*
TIEMPO*CONDICIONES DE RIEGO		40.	4	10.	2.	.061
TIEMPO*TRATAMIENTO	☆	120.	12	10.	2.	.014*
TIEMPO*CONDICIONES DE RIEGO*TRATAMIENTO		26.	12	2.	1.	.905

XIII. Pruebas *a posteriori* para determinación de las diferencias significativas: (Prueba de Tukey)
 (Longitudes de las hojas sometidas a estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego)

Interacción Tiempo-Tratamiento. (Gráfica 14)

*Medias con asteriscos en diferente posición dentro de las columnas presentan diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

LSD test; variable DV_1 (hojas riego.sta)
 Homogenous Groups, alpha = 0.05000 p=0.03923
 Error: Between; Within; Pooled MS = 7.2305, df = 24.599

TRATAMIENTO	TIEMPO	DV_1 Mean	1	2	3	4	5	6	7	8
Tratamiento 2	SEMANA 2	11.72667	****							
Control (-)	SEMANA 2	12.83500	****							
Tratamiento 1	SEMANA 2	12.93500	****							
Control (+)	SEMANA 2	13.01333	****							
Tratamiento 2	SEMANA 3	19.97333		****						
Control (-)	SEMANA 3	20.32167		****						
Tratamiento 1	SEMANA 3	21.28000		****						
Control (+)	SEMANA 3	22.12667		****	****					
Tratamiento 2	SEMANA 4	25.28167			****	****		****		
Tratamiento 1	SEMANA 4	25.38167				****	****	****		
Control (-)	SEMANA 4	25.91000				****	****			
Tratamiento 2	SEMANA 5	27.42500					****		****	****
Control (-)	SEMANA 5	28.47000						****	****	****
Control (+)	SEMANA 4	28.72000				****	****	****	****	
Tratamiento 1	SEMANA 5	29.38000							****	****
Control (+)	SEMANA 5	32.28000								****

XIV. Pruebas *a posteriori* para determinación de las diferencias significativas: (Prueba de Tukey)

(Longitudes de los tallos sometidos a estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego)

Interacción Tiempo-Riego. (Gráfica 15)

*Medias con asteriscos en diferente posición dentro de las columnas presentan diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

LSD test; variable DV_1 (tallos riego.sta)
 Homogenous Groups, alpha = 0.05000 p=0.03373
 Error: Between; Within; Pooled MS = 1.0069, df = 26.95

RIEGO	TIEMPO	DV_1 Mean	1	2	3	4
Humedad	SEMANA 2	3.232500	****			
Sequía	SEMANA 2	4.314167	****			
Humedad	SEMANA 3	5.662500		****		
Sequía	SEMANA 3	6.361667		****		
Humedad	SEMANA 4	7.295833			****	
Sequía	SEMANA 4	7.783333			****	
Humedad	SEMANA 5	8.661667				****
Sequía	SEMANA 5	8.755000				****

XV. Pruebas *a posteriori* para determinación de las diferencias significativas: (Prueba de Tukey)
(Longitudes de los tallos sometidos a estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego)

Interacción Tiempo-Tratamiento. (Gráfica 16)

*Medias con asteriscos en diferente posición dentro de las columnas presentan diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

LSD test; variable DV_1 (tallos riego.sta)

Homogenous Groups, alpha = 0.05000 p=0.00400

Error: Between; Within; Pooled MS = 1.0069, df = 26.953

TRATAMIENTO	TIEMPO	DV_1 Mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tratamiento 2	SEMANA 2	3.20667	****										
Tratamiento 1	SEMANA 2	3.71167	****										
Control (-)	SEMANA 2	3.86167	****										
Control (+)	SEMANA 2	4.31333	****	****									
Tratamiento 2	SEMANA 3	5.30333		****	****								
Tratamiento 1	SEMANA 3	5.66333			****	****							
Control (-)	SEMANA 3	6.11833			****	****	****						
Tratamiento 2	SEMANA 4	6.43333				****	****		****				
Control (+)	SEMANA 3	6.96333			****	****	****	****	****				
Tratamiento 1	SEMANA 4	7.11000					****	****	****			****	
Tratamiento 2	SEMANA 5	7.44000						****	****	****	****		
Control (-)	SEMANA 4	7.49500						****	****	****	****	****	
Tratamiento 1	SEMANA 5	8.32000								****	****		
Control (-)	SEMANA 5	8.49000									****	****	****
Control (+)	SEMANA 4	9.12000										****	
Control (+)	SEMANA 5	10.58333											****

XVI. Pruebas *a posteriori* para determinación de las diferencias significativas: (Prueba de Tukey)

(Grosos de los tallos sometidos a estrés abiótico por modificación en las condiciones de riego)

Interacción Tiempo-Riego. (Gráfica 17)

*Medias con asteriscos en diferente posición dentro de las columnas presentan diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

LSD test; variable DV_1 (grosor riego.sta)

Homogenous Groups, alpha = 0.05000 p=0.00236

Error: Between; Within; Pooled MS = .14385, df = 33.616

RIEGO	TIEMPO	DV_1 Mean	1	2	3	4	5
Humedad	SEMANA 2	2.305000	****				
Sequía	SEMANA 2	2.604167	****				
Humedad	SEMANA 3	2.929167		****			
Sequía	SEMANA 3	3.145833		****			
Sequía	SEMANA 4	3.437500			****		
Humedad	SEMANA 4	3.540833			****	****	
Sequía	SEMANA 5	3.660833				****	****
Humedad	SEMANA 5	3.869167					****

6. REFERENCIAS

1. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F y Cabañes FJ. (2000) "Hongos productores de micotoxinas emergentes". *Revista Iberoamericana de Micología*, 17:S63-S68.
2. Aguirre-Gómez A. (2001) "Química de los Suelos Ácidos, Templados y Tropicales", 1° Edición; UNAM, México.
3. Angelova Z, Georgiev S & Ross W. (2006) "Elicitation of plants". *Biotechnology & Biotechnology*, 20: 72-83.
4. Arnason JT, Lambert JDH & Gale J. (1993) "Is "quality protein" maize more susceptible than normal cultivars to attack by the maize weevil *Sitophilus zeamais*?". *Postharvest Biology and Technology*, 2:349-358.
5. Azevedo RA, Lancien M & Lea PJ. (2006) "The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants". *Amino Acids*, 30: 143-162.
6. Bacon CW, Yates IE, Hinton DM & Meredith F. (2001) "Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize". *Environmental Health Perspectives*, 109,2:325-332.
7. Barka EA, Eullaffroy P, Climent C & Vernet G. (2004) "Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*". *Plant Cell Reports*, 22:608-614.
8. Bautista-Baños B, Hernández-López M, Hernández-Lauzardo AN, Trejo-Espino JL, Bautista-Cerón MK & Melo-Giorgana GE. (2005) "Effect of Chitosan on *in vitro* development and morphology of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc." *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23,1:62-67.
9. Bean GA. (1989) "Maize mycotoxins in Latin America". *Plant Disease*, 73:597-600.
10. Belkhadir Y, Subramanian R, & Dangl JL. (2004) "Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners". *Current Opinion in Plant Biology*, 7:391-399
11. Benhamou N. (1996) "Elicitor-induced plant defense pathways". *Trends in plant Science*, 1,7:233-240.
12. Benhamou N, Kloepper JW & Tuzun S. (1998) "Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with endophytic bacteria strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response". *Planta*, 204:153-168.
13. Bhaskara MV, Arul J, Angers P & Couture L. (1999) "Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47:208-216.
14. Bolet-Astoviza M y Socarrás-Suárez MM. (2005) "Micotoxinas y cáncer". *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 24,1:54-59.
15. Boyes DC, McDowell JM & Dangl JL. (1996) "Many roads led to resistance". *Current Biology*, 6,6:634-637.
16. Bressani R. (1994) "Opaque 2 Corn in Human Nutrition and Utilization". In: Quality Protein Maize: 1964-1994. Proc. The International Symposium on Quality Protein Maize. Embrapa/CNPMS, Sete Lagoas MG Brasil. December 1-3, 1994. p. 41-63
17. Brzeski M. (1983) "Production and application of chitin and chitosan in Poland"; Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier Applied Science*, 161-169.

18. Carrillo, L. (2003) "Microbiología agrícola" En: Carrillo, L. *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta. Capitulo 6, pag. 1-7.
19. Chang JH, Shin JH, Chung IS & Lee HJ. (1998) "Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*". *Biotechnology Letters*, 20:1097-1099.
20. Christensen CM. (1987) In: "Food and Beverage Mycology". Beuchat LR, ed; New York, Van Nostrand Reinhold, Cap 7.
21. Comité Ciudadano de Evaluación de Estadística Económica de Sinaloa. (2008) "Situación Mundial del maíz", reporte preparado por E. Medina-Cázares, CEEES, México.
22. Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, Cárdenas-Valenzuela OG, Reyes-Moreno C. (2003) "Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process". *Lebensm Wiss. u.Technol.* 37: 59-67.
23. De la Fuente JM. (1997) *Science*, 276 :1566-1568.
24. Devlieghere F, Vermeulen A & Debevere J. (2004) "Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables". *Food Microbiology*. 21:703-714.
25. Egea-Gilabert C, Dickinson MJ, Bilotti G & Candela ME (2003) "Isolation of resistance gene analogs in pepper using modified AFLPs." *Biología Plantarum*, 477:27-32
26. Espinosa CA, Gómez MN, Sierra MM, Betanzos ME, Caballero HF, Coutiño EB, Palafox CA, Rodríguez MF, García BA y Cano RO. (2005) "Los maíces de calidad proteínica y la producción de semillas en México" *Revista Ciencia y Desarrollo electrónica*. (www.conacyt.gob.mx)
27. García-Mateos R y Pérez-Leal R. (2003) "Fitoalexinas: Mecanismos de defensa de las plantas". *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9,1:5-10.
28. Gilchrist L, Fuentes G. y Martínez C. (1995) "Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada". CIMMYT, México D.F; pp. 19-22.
29. Grolleaud M. (1997) "Pérdidas post-cosecha: Un concepto mal definido o mal utilizado" En: Estudio sintético y didáctico sobre el fenómeno de las pérdidas que se producen a lo largo del sistema post-cosecha. *FAO. Cap 1 y 3*.
30. Hahn M. (1996) "Microbial elicitors and their receptors in plants". *Annual Review of Phytopathology*, 34:87-412
31. Helbling T, Mercer-Blackman V y Cheng K. (2008) "Auge de los Productos Básicos: Viento a Favor". *FMI, Finanzas y Desarrollo*, pp.10-15
32. Hirano S. (1983) "Production and application of chitin and chitosan in Japan". In: Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier Applied Science* 37-43.
33. Hirano S, Hayashi M, Nishida T & Yamamoto T. (1986) "Chitinase activity of some seeds during their germination process, and its induction by treating with chitosan and derivatives". In: Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier Applied Science*, 743-749.
34. Huang S, Whitney RA, Zhou Q & Kathleen PM. (2004) "Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes". *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52,7: 1958-1964.

35. Jeglay Y y Cruz H. (2006) "Relación suelo-planta-hombre en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.)". *Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Posgrado en Ciencias del Suelo. Cátedra de Relación Suelo-Planta*.
36. Kaku H, Nishizawa Y & Ishii-Minami N. (2006) "Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor". *PNAS* 103.29:11086-11091.
37. Keeler FR & Anthony TT. (editors). (1983) "Plant and fungal toxins" in *Handbook of Natural Toxins*; Vol.1; EUA; 299-323.
38. Knapczyk J, Krówczyński L, Krzek J, Brzeski MJ, Nürnberg E, Schenk D & Struszczyk H. (1983) "Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical application. In: Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications". *Elsevier Applied Science*, 657-663.
39. Lacey J. (1989) *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement, pp. 11S-25S.
40. Laffite HR. (2001) "Estréses abióticos que afectan al maíz". En: Paliwal L, Granados G, Laffite HR, Violic AD & Maratheé JP: *El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
41. Lárez C. (2003) "Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos". *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4,2:91-109.
42. Lárez C. (2008) "Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica". *Revista UDO Agrícola*, 8,1:1-22.
43. Lienart I, Driguez H & Domard A. (1983) "Chitosan as elicitor of β -D-glycanases from rubus cells" In: Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications". *Elsevier Applied Science*, 225-231.
44. Lizárraga-Paulín EG. (2009) "Protección del maíz en México". *Revista Ciencia y Desarrollo*, 35,233:64-69.
45. Lockwood GB, Bunrathep S, Songsak T & Ruangrunsi N. (2007) "Production of d-Limonene in Chitosan Elicited Citrus Japonica Suspension Cultures". *Journal of Essential Oils Research*, March/April: 113-116.
46. Martínez LM y Martínez GF. (2007) "La tortilla Mexicana". *Ciencia Cierta*, 09:41-49.
47. Méndez-Albores A y Moreno-Martínez E. (2009) "Las Micotoxinas: Contaminantes naturales de los alimentos". *Revista Ciencia*, julio-septiembre 2009, 1-7.
48. Mendoza-Elos E, Andrio-Enríquez JM, Juárez-Goiz C, Mosqueda-Villagómez L, Latournerie-Moreno L, Castañón-Nájera G, López-Benítez A, y Moreno-Martínez E. (2006) "Contenido de lisina y triptofano en genotipos de maíz de alta calidad proteica y normal". *Universidad y Ciencia*, 22,2:153-161.
49. Miranda-Castro SP. (2000) "La quitina y su potencial aplicación industrial". *Revista Investigación y Desarrollo. Periodismo de Ciencia y tecnología*. <http://www.invides.com.mx>
50. Miranda-Castro SP. (2000) "Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán". Patente en trámite. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México. No. de expediente 005444. No de folio 1175930-5.
51. Miranda SP, Cárdenas G, López D y Lara-Sagahon AV. (2003) "Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate". *Revista de la Sociedad Química de México*, 47,4: 331-336.

52. Miranda-Castro SP. (2003) "Películas compuestas de quitosano y esponjas para usos biomédicos y alimentarios". (A Chitosan and/or porous solids film for Biomedical and/or Food Uses, a process for the obtention thereof and use of the same). Patente en trámite. Registro en Departamento de Propiedad Industrial, Santiago de Chile, No. de solicitud: 0523.
53. Miranda-Castro SP. (2004) "Películas compuestas de quitosano y esponjas para usos biomédicos y alimentarios". (A Chitosan and/or porous solids film for Biomedical and/or Food Uses, a process for the obtention thereof and use of the same). Patente en trámite. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México. No. de expediente PA/a/2004/001347, Folio PA/E/2004/007243.
54. Miranda SP, Miranda E & Serrano J. (2007) "Chitosan and gamma irradiated chitosan against *Aspergillus flavus* in maize". *Asian Chitin Journal*, 3:37-48.
55. Moreno-Martínez E. (1996) "Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas", 3° Edición; UNAM, México.
56. Muzzarelli RAA & Muzzarelli C. (2005) "Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences". *Advances in Polymer Science*, 186:151-209.
57. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2000). FAO, Roma, revisado el 10 de agosto de 2009, <<http://www.fao.org>>
58. Panorama Global: Producción Mundial de maíz 2007/08. (2008). Agropanorama, Argentina, revisado el 16 de agosto de 2009, <<http://www.agropanorama.com.ar>>
59. Puigdomenech P. (2009) "Implicaciones para la salud de los alimentos transgénicos". *Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 16,3:115-116.
60. Radman R, Saez T, Bucke C & Keshavarz T. (2003) "Elicitation of plants and microbial cell systems". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37:91-102.
61. Ramanjulu S & Bartels D. (2002) "Drought –and desiccation- induced modulation of gene expression in plants". *Plant, Cell and Environment*, 25:141-151.
62. Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW & Schaafsma W. (1999) "Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation". *Etiology, The American Phytopathological Society*, 89,11: 1028-1037.
63. Rivero D, Cruz A, Martínez B, Ramírez MA, Rodríguez AT, Cárdenas RM. (2004). "Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* sp." *Revista de Protección Vegetal*, 19,2:140-144.
64. Rodríguez-Pedroso A, Ramírez-Arrebato MA, Cárdenas-Travieso RM, Falcón-Rodríguez A, Bautista-Baños S. (2006) "Efecto de la quitosana en la Inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc.". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24,1:1-6.
65. Ronald PC. (1998) "Resistance gene evolution". *Current Opinion in Plant Biology*, 1:294-298.
66. Salvadores Y, Silva GA, Tapia VM & Hepp GR. (2007) "Polvos de especias aromáticas para el control del gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky en trigo almacenado". *Agricultura Técnica*, Abril-Junio:147-155.

67. Sandford PA. (1983) "Chitosan: Comercial uses and potential applications" In: Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier Applied Science*, 51-69.
68. Sathiyabama M & Balasubramanian R. (1998) "Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg". *Crop Protection*, 17:307-313.
69. Shewry P. (2007) "Improving the protein content and composition of cereal grain". *Journal of Cereal Science*, 46:239–250.
70. Singh DK & Ray AR. (2000) "Biomedical Applications of Chitin, Chitosan, and their Derivates". *Rev. Macromol. Chem. Phys.* 40,1:69-83.
71. Staff Merck & Co. (2001) "The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals", 13° Edición, EUA.
72. Struszczyk H, Pospieszny H & Kotlinski S. (1983) "Some new applications of chitosan in agriculture". In: Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. *Elsevier Applied Science*, 733-742.
73. Stubbs RW, Prescott JM, Saari EE & Dubin HJ. (1986) "Manual de Metodología sobre las enfermedades de los cereales"; Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México; pp. 18-26.
74. Umaran I. (2006) "Producción de maíz 2006". *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección Nacional de Producción Agropecuaria y Forestal. Dirección de Agricultura*, Buenos Aires, Argentina.
75. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. (2008) USDA, Agricultural Research Service, EUA, revisado el 10 de agosto de 2009. <<http://www.usda.gov>>
76. Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas M y Flores HE. (2005) "Mecanismos Químicos de Defensa en las Plantas". *Investigación y Ciencia*, Febrero 2005: 68-76.
77. Widstrom NW. (1996) "The aflatoxin problem with corn grain". *Advances in Agronomy*, 56:219-280.