
**EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA TROPICAL DE MAÍZ PARA
RESISTENCIA A *Aspergillus flavus* Y A LA PRODUCCIÓN DE
AFLATOXINAS EN GRANO**

Jesús Alezones, Miguel Asdrúbal Arcia y Alex González

RESUMEN

Las aflatoxinas son compuestos tóxicos y carcinogénicos producidos por ciertos mohos del género *Aspergillus* que representan una amenaza para la salud de humanos y animales. Con el fin de identificar fuentes de resistencia a la colonización y producción de aflatoxinas, 103 líneas de maíz fueron inoculadas con la cepa Ospino IB de *Aspergillus flavus* (AF) usando la técnica de kernel screen assay (KSA). Los granos fueron desinfectados superficialmente e inoculados sumergiéndolos en una suspensión de esporas del hongo (4×10^6 esporas/ml). Luego fueron colocados en placas multipozos de plástico y se introdujeron en cámara húmeda a 30°C bajo un diseño completamente aleatorizado con ocho repeticiones. Transcurridos siete días los granos fueron clasificados individualmente usando una escala ordinal. Adicionalmente, se cuantificó

el contenido de aflatoxinas B1 usando la técnica de ELISA. Se encontraron diferencias altamente significativas entre genotipos para colonización de grano por AF y se identificó un grupo de ocho líneas con resistencia a la colonización. Se observó que los genotipos de granos amarillos presentaban en promedio mayor resistencia que los blancos; lo mismo ocurrió al comparar maíces de endospermo normal con maíces de alta calidad proteica (QPM). Al comparar el origen de las líneas usadas se identificaron dos poblaciones (Antigua Veracruz 181 y Cogollero) cuyas líneas presentaban en promedio valores bajos de colonización. Al cuantificar las aflatoxinas se encontraron niveles altos de aflatoxinas (hasta $11,5 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). La correlación entre colonización por AF y producción de aflatoxinas fue positiva, baja y no significativa ($r = 0,11$)

Introducción

En Venezuela, cerca de $1,53 \times 10^6$ toneladas de maíz son procesadas anualmente para la producción de

$1,05 \times 10^6$ t de harina precocida para consumo humano. El venezolano consume $\sim 37,8$ kg de harina de maíz *per cápita* por año, lo que la convierte en la primera fuente de

calorías con un 14,4% de las calorías totales y la segunda fuente de proteínas con un 9,6% (INN, 2007).

Las aflatoxinas son compuestos secundarios producidos

por algunas especies de mohos del género *Aspergillus* que ejercen efectos tóxicos sobre los animales y los seres humanos. Dichos efectos sobre la salud animal y

PALABRAS CLAVE / Aflatoxinas / *Aspergillus flavus* / ELISA / KSA / Mohos / *Zea mays* /

Recibido: 24/01/2012. Modificado: 17/10/2014. Aceptado: 23/10/2014.

Jesús Alezones. Ingeniero Agrónomo y M.Sc. en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigador, Programa de Mejoramiento Genético de Maíz, Fundación para la Investigación Agrícola Danac.

Miguel A. Arcia. Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. M.Sc. y PhD en Mejoramiento y Genética de Plantas, University of North Caroline, EE.UU. Profesor, UCV, Venezuela.

Alex González. Técnico Superior Universitario en Agronomía,

IUT Los Andes, Venezuela. M.Sc. en Agronomía y Doctor en Ciencias Agrícolas, UCV, Venezuela. Especialista de Investigación, Laboratorio de Protección Vegetal de Fundación para la Investigación Agrícola Danac.

ASSESSMENT OF TROPICAL MAIZE GERMPLASM FOR RESISTANCE TO *Aspergillus flavus* AND AFLATOXIN PRODUCTION IN GRAIN

Jesús Alezónes, Miguel Asdrúbal Arcia and Alex González

SUMMARY

Aflatoxins are toxic and carcinogenic compounds produced by the fungus *Aspergillus flavus* (AF). These metabolites are considered a serious health problem for humans and animals. In order to identify maize germplasm with enhanced resistance to colonization and toxin production, 103 inbred lines were screened with kernel screen assay (KSA) *in vitro* methodology. Grains were superficially disinfected and inoculated with an AF spore solution. These grains were introduced in multiwell plates that were kept in humid chamber at 30°C under a complete random design with eight replicates. Seven days later the grains where individually scored using an ordinal scale. Additionally,

the aflatoxin content was determined using the ELISA technique. Highly significant differences for fungal growth (FG) were found between lines. Eight inbred lines were found highly resistant to FG. It was observed that lines with yellow grains were more resistant than those with white grains, the same occurring when normal and quality protein maize (QPM) lines were compared. Comparing inbred's origin two populations were found (Antigua Veracruz 181 y Cogollero) whose lines were more resistant than the rest. Aflatoxin accumulation was extremely high (up to 11,5mg·ml⁻¹). Correlation between AF growth and aflatoxin accumulation was positive, low and non significant ($r = 0,11$).

AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMA TROPICAL DE MILHO PARA RESISTÊNCIA A *Aspergillus flavus* E À PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS NO GRÃO

Jesús Alezónes, Miguel Asdrúbal Arcia e Alex González

RESUMO

As aflatoxinas são compostos tóxicos e carcinogênicos produzidos por certos fungos do gênero *Aspergillus* que representam uma ameaça para a saúde de humanos e animais. A fim de identificar fontes de resistência à colonização e produção de aflatoxinas, 103 linhas de milho foram inoculadas com a cepa Ospino IB de *Aspergillus flavus* (AF) usando a técnica de kernel screen assay (KSA). Os grãos foram desinfetados superficialmente e inoculados submergindo-os em uma suspensão de esporas do fungo (4×10^6 esporas/ml). Logo foram colocados em placas multipoços de plástico e se introduziram em câmara úmida a 30°C sob um desenho completamente aleatorizado com oito repetições. Transcorridos sete dias os grãos foram classificados individualmente usando uma escala ordinal. Adicionalmente, se quantificou o conteúdo

de aflatoxinas B1 usando a técnica de ELISA. Encontraram-se diferenças altamente significativas entre genótipos para colonização de grão por AF e se identificou um grupo de oito linhas com resistência à colonização. Observou-se que os genótipos de grãos amarelos apresentavam em média maior resistência que os brancos; o mesmo ocorreu ao comparar milhos de endospermo normal com milhos de alta qualidade proteica (QPM). Ao comparar a origem das linhas usadas se identificaram duas populações (Antigua Veracruz 181 e Cogollero) cujas linhas apresentavam em média valores baixos de colonização. Ao quantificar as aflatoxinas se encontraram níveis altos de aflatoxinas (hasta 11,5mg·ml⁻¹). A correlação entre colonização por AF e produção de aflatoxinas foi positiva, baixa e não significativa ($r = 0,11$).

humana son conocidos como micototoxicosis, cuya gravedad depende de: la toxicidad del compuesto, del grado de exposición, de la edad del individuo, así como de su estado nutricional y de los posibles efectos sinérgicos con otros compuestos químicos a los que éste haya sido expuesto (Moss, 1996; Peraica, 1999).

Entre los efectos tóxicos de las aflatoxinas pueden ser mencionados la supresión del sistema inmune, generación de mutaciones, efectos teratogénicos y cáncer. La evaluación de los resultados epidemiológicos y de laboratorio llevados a cabo en 1993 por la Agencia Internacional de

Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) demostró que existen suficientes datos que confirman el efecto carcinogénico de mezclas naturales de aflatoxinas en el humano, las cuales se clasifican por ello como carcinogénicos de Grupo 1 (IARC, 1993).

Altos niveles de incidencia de *Aspergillus flavus* (AF) y aflatoxinas han sido reportados en Venezuela (Mazzani *et al.*, 1999; Martínez y Medina-Martínez, 2000). Los primeros autores han reportado niveles de aflatoxinas en muestras de maíz bajo infestación natural de hasta 900ppb, con diferencias significativas entre cultivares, lo

que sugiere que existe cierto nivel de control genético por parte del hospedero para la colonización del grano y la producción de toxinas.

A nivel del grano se ha identificado una serie de productos, principalmente proteínas, que poseen un rol en la resistencia a AF y a la producción de aflatoxinas, asociadas a fuentes de tolerancia a estrés por parte de la planta de maíz (Brown *et al.*, 2004). Comparando el perfil de proteínas de líneas de maíz resistentes y susceptibles bajo la influencia del hongo se identificaron más de una docena que eran únicas o sobreexpresadas al menos cinco veces en los genotipos resistentes

(Chen *et al.*, 2002). Estas proteínas pueden ser clasificadas por la homología de la secuencia de sus péptidos en tres grupos: i) proteínas de almacén como globulina 1, globulina 2 y proteínas abundantes en la embriogénesis tardía LEA3 y LEA14 (*late embriogénesis abundant proteins* o LEAs); ii) proteínas relacionadas a estrés, como la aldosa reductasa, la antioxidante peroxirredoxina, una proteína regulada por el frío, una proteína inducible por estrés hídrico, una peroxidada aniónica, una proteína glyoxalasa I y varias proteínas pequeñas de choque térmico; y iii) proteínas antifúngicas, que incluyen inhibidores de

tripsina y proteínas relacionada a patogénesis (PR-10).

Guo *et al.* (1997) demostraron que en el proceso de germinación de la semilla de maíz se producen compuestos proteicos que confieren resistencia a AF, tales como la proteína inactivadora del ribosoma (RIP), la cual modifica e inactiva ribosomas foráneos, y las zeamatinas que incrementan la permeabilidad de la pared celular del hongo. Esta proteína RIP ha sido encontrada en niveles 50 a 100 veces inferiores en materiales de alta calidad proteica o QPM, al ser comparadas con sus isolíneas de calidad proteica normal (Payne *et al.*, 2002). Norton (1997) demostró que pigmentos en el endospermo (carotenoides) de maíces amarillos pueden disminuir la cantidad de aflatoxinas producida por AF.

Aunque existen muchas estrategias de manejo útiles para reducir el contenido de aflatoxinas en granos de maíz, la más práctica y sustentable es el desarrollo de cultivares de maíz resistentes a la colonización por el hongo *A. flavus* y a la subsecuente producción de aflatoxinas, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar germoplasma mejorado de maíz para resistencia a *A. flavus* con adaptabilidad a condiciones tropicales.

Materiales y Métodos

La investigación fue llevada a cabo en las instalaciones de Fundación para la Investigación Agrícola Danac, ubicada en San Javier, Yaracuy, Venezuela, en el Laboratorio de Protección Vegetal, con la colaboración del programa de mejoramiento genético de maíz.

Germoplasma fuente

Se usaron 32 semillas de cada una de las 103 líneas endocriadas de maíz blanco y amarillo provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Estos individuos se seleccionaron por: i) su alto nivel de endocria (S5-S12), ii) por ser líneas liberadas para

zonas tropicales, iii) seleccionadas con base a la resistencia a múltiples enfermedades, iv) por su buen comportamiento *per se* y alta capacidad combinatoria (líneas elite), y v) por sus muy diversos orígenes (CIMMYT, 1998).

Previo a la evaluación de resistencia, 103 genotipos fueron sembrados en lotes experimentales de Fundación Danac con el fin de garantizar suficiente semilla de buena calidad y alta integridad genética. Transcurridos los 125 días después de la siembra en campo, las mazorcas de mejor aspecto fueron secadas al sol hasta obtener una humedad de grano cercana al 12% y fueron trilladas. El grano obtenido se mantuvo en condiciones de temperatura y humedad controladas (14°C y 50% HR) hasta el momento de su uso.

Preparación del inóculo de *Aspergillus flavus* (AF)

Se utilizó la cepa de AF Ospino I-B obtenida y purificada por Claudio Mazzani, debido a su alto poder de colonización y a su alta producción de aflatoxinas (Alezones *et al.*, 2003; Mazzani *et al.*, 2004). El material fue multiplicado en un sustrato compuesto de Jugo V8 (5%) y agar (2%) e incubados por siete días a 30°C en oscuridad (Brown *et al.*, 1993).

Para la preparación del inóculo se extrajeron del medio de cultivo discos de agar de 5mm de diámetro de las zonas donde el micelio del hongo era abundante. Estos discos fueron introducidos en viales con agua destilada y agitados vigorosamente para suspender las esporas a razón de 1 disco por cada 5ml de agua destilada estéril.

Con el fin de obtener una concentración de inóculo de 4×10^6 esporas/ml se realizó la cuantificación de esporas en la mezcla usando el hematocímetro bajo microscopio de luz y se ajustó la concentración añadiendo agua.

Método de inoculación

Para el monitoreo de las líneas de maíz se utilizó el

método *in vitro* desarrollado por Brown *et al.* (1993), conocido como *kernel screen assay* (KSA), con modificaciones menores. Para KSA, todos los granos a evaluar se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en etanol al 70% por 4-5min. Posteriormente se realizó un enjuague rápido con agua destilada estéril, para luego hacer tres lavados más, de 1min cada uno, con agua destilada estéril.

Los granos esterilizados fueron inoculados sumergiéndolos en la suspensión de esporas del hongo. Después de inoculados, los granos se colocaron en placas multipozos (24 pozos) de plástico, a razón de un grano por pozo. Las placas se introdujeron en una cámara húmeda, compuesta por un conservador de alimentos y una toalla de papel absorbente en el fondo saturada con agua destilada. Cada placa multipozo contenía seis unidades experimentales (UE), cada una constituida por cuatro semillas de maíz.

Finalmente, las cámaras húmedas con los granos inoculados fueron llevados a una incubadora con condiciones de temperatura y humedad controladas, donde fueron mantenidas por seis días a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad. Transcurrido este tiempo, los granos fueron clasificados individualmente para crecimiento fúngico. Posterior al análisis de colonización por AF, los granos de cada UE se introdujeron en sobres de papel para ser secados en estufa a 60°C por dos días con el fin de detener la actividad del hongo.

Diseño experimental y variables medidas

El diseño experimental fue completamente al azar con 103 tratamientos y ocho repeticiones para un total de 824 UE, cada una de ellas compuesta por cuatro semillas, para un total de 138 placas multipozos. Una de las variables medidas fue crecimiento fúngico en cada grano a través de una escala ordinal, donde 0= grano no infectado, 1= menos del 25% del grano infectado, 2=

menos del 50% del grano infectado, 3= más del 50% del grano infectado y 4= grano completamente infectado. El resultado de la UE es el promedio simple de las cuatro observaciones o granos, lo que da una medida cuantitativa del grado de colonización.

La otra variable medida fue el contenido de aflatoxinas B1, determinado por inmunoensayo enzimático (ELISA), lo que permitió conocer las partes por billón de aflatoxinas acumuladas en cada tratamiento y observar la relación entre colonización y producción de toxinas.

Para la variable colonización de grano se realizó análisis de varianza, usando por separado como fuentes de variación los casos líneas, color de grano, calidad proteica del endospermo y población de origen. Adicionalmente, se realizaron pruebas de medias usando MDS al 1% en todos los casos. El contenido de aflatoxinas fue correlacionado con la colonización de grano usando el método no paramétrico de Spearman Rho.

Cuantificación de aflatoxinas por ELISA

Para la cuantificación de toxinas se usó el kit comercial RIDASCREEN® FAST AFLATOXIN, de R-Biopharm AG. Esta metodología constó de tres partes fundamentales:

Extracción de toxinas. Cada muestra de maíz inoculado fue colocada en una licuadora común con una solución de metanol/agua (70/30) en una relación peso volumen 1:5, agitada vigorosamente durante 2min y filtrada usando papel de filtro Whatman N° 1.

El filtrado obtenido se clarificó haciéndolo pasar por columnas de limpieza (Aflatoxin Clean Up Column de R-Biopharm AG) que contienen sílica gel, hasta obtener más de 4ml de extracto clarificado. Posteriormente se transfirió 1ml de extracto a un tubo de ensayo limpio y se diluyó añadiéndole 1ml de agua destilada.

Reacción inmunoenzimática. Los pozos de la placa multicelda contenían el anticuerpo adherido, al cual se le agregaron 50µl de estándar o de la muestra a analizar clarificada; posteriormente se agregaron 50µl más del conjugado aflatoxinas-enzima y 50µl del anticuerpo anti-aflatoxinas, se mezcló suavemente el contenido de la placa y se incubó durante 10min. Se limpiaron los pozos con agua destilada y se secaron golpeándolos contra papel absorbente tres veces. Una vez secos se agregó el sustrato cromógeno, se dejó incubar por 5min en la oscuridad y se añadió la solución detenedora de la reacción.

Cuantificación de las toxinas. Se midió la absorción a 450nm en un lector electrónico de ELISA cuya salida son los valores de absorbancia de cada muestra y de los estándares. Con estos datos y el software RIDASOFT Win® (R-Biopharm Rhone, 2001) se generó una curva de calibración y se estimaron los valores de las muestras experimentales. Los estándares usados poseen 0, 2, 5, 15 y 45ppb de aflatoxinas en una solución de metanol.

Debido a los altos niveles de aflatoxinas esperados al usar la metodología KSA y la cepa Ospino I-B, se realizaron ensayos previos para estimar el número de diluciones seriadas necesarias para poder analizar las muestras con los estuches comerciales (nivel máximo de 45ppb). En ese sentido, se tomó la muestra más colonizada en cada ensayo y luego de la extracción de toxinas se hicieron diluciones seriadas hasta que la misma presentara valores de absorbancia equivalentes a las 45ppb de aflatoxinas; con ese factor de dilución se trató al resto de las muestras para realizar la cuantificación de aflatoxinas.

Resultados y Discusión

Colonización del grano

Al realizar el análisis de varianza mediante el procedimiento *FitModel* del software

JMP 7.0.2 (SAS Institute, 2007) se encontraron diferencias altamente significativas entre las líneas de maíz ($P \leq 0,01$), un coeficiente de variación ($CV = 9,7\%$) y una media real = 1,76. La prueba de medias arrojó un grupo de ocho líneas 'resistentes' con bajos valores de colonización y que superan significativamente en resistencia al testigo resistente CML-176 y 11 líneas con alta susceptibilidad al desarrollo del hongo (Tabla I).

Al analizar el efecto del color de grano (blanco vs amarillo) y la calidad nutricional del grano (normal vs QPM) con el procedimiento *Fit Y by X* del software JMP 7.0.2 (SAS Institute, 2007) se encontró que los cultivares de granos amarillos son en promedio significativamente más resistentes que los blancos, con un índice de colonización de 1,67 y 1,85 respectivamente (valores ajustados de 1,49 vs 1,54; Figura 1a); estos resultados coinciden con lo encontrado por Norton (1997) e indican un posible

TABLA I
LÍNEAS DE MAÍZ
AGRUPADAS POR
RESISTENCIA O
SUSCEPTIBILIDAD A
LA COLONIZACIÓN DE
GRANO POR *Aspergillus
flavus* POR PRUEBA DE
MEDIAS MDS 5%

Líneas de maíz	Estatus	IC*
CML-476	Resistente	0,50
CML-1	Resistente	0,63
CML-274	Resistente	0,69
CML-287	Resistente	0,78
CML-20	Resistente	0,81
CML-493	Resistente	0,84
CML-397	Resistente	0,91
CML-409	Resistente	1,22
CML-176**	Testigo	1,35
CML-159	Susceptible	2,06
CML-168	Susceptible	2,25
CML-407	Susceptible	2,66
CML-247	Susceptible	2,69
CML-497	Susceptible	2,95
CML-190	Susceptible	3,13
CML-7	Susceptible	3,19
CML-426	Susceptible	3,25
CML-448	Susceptible	3,43
CML-398	Susceptible	3,47
CML-481	Susceptible	3,50

* Índice de colonización, ** testigo reportado como resistente por Betrán *et al.* (2002).

efecto inhibitorio de los carotenoides sobre el crecimiento del hongo. También se observó que los materiales normales son en promedio significativamente más resistentes que los QPM, con un índice de colonización de 1,76 y 1,83 respectivamente (valores ajustados de 1,50 vs 1,55; Figura 1b). Esto coincide con lo encontrado por Guo *et al.* (1997) y Payne *et al.* (2002) y puede estar relacionado con los menores niveles de proteína RIP en cultivares QPM. Adicionalmente, se observó una gran dispersión de los datos, indicando que se pueden tener diferentes niveles de resistencia a pesar del color

o la calidad nutricional del grano, sugiriendo la presencia de mecanismos alternos de defensa.

Se evaluó la influencia de la población de origen en la colonización de grano en aquellas poblaciones que estaban representadas con al menos tres líneas homocigotas de maíz en el ensayo. En ese sentido se identificaron dos poblaciones de amplia base genética (Población 24 y Población 36) que poseen los menores valores de colonización (Tabla II). Asimismo, en la Figura 2 se observa una gran dispersión de los datos obtenidos dentro de cada una de las poblaciones de

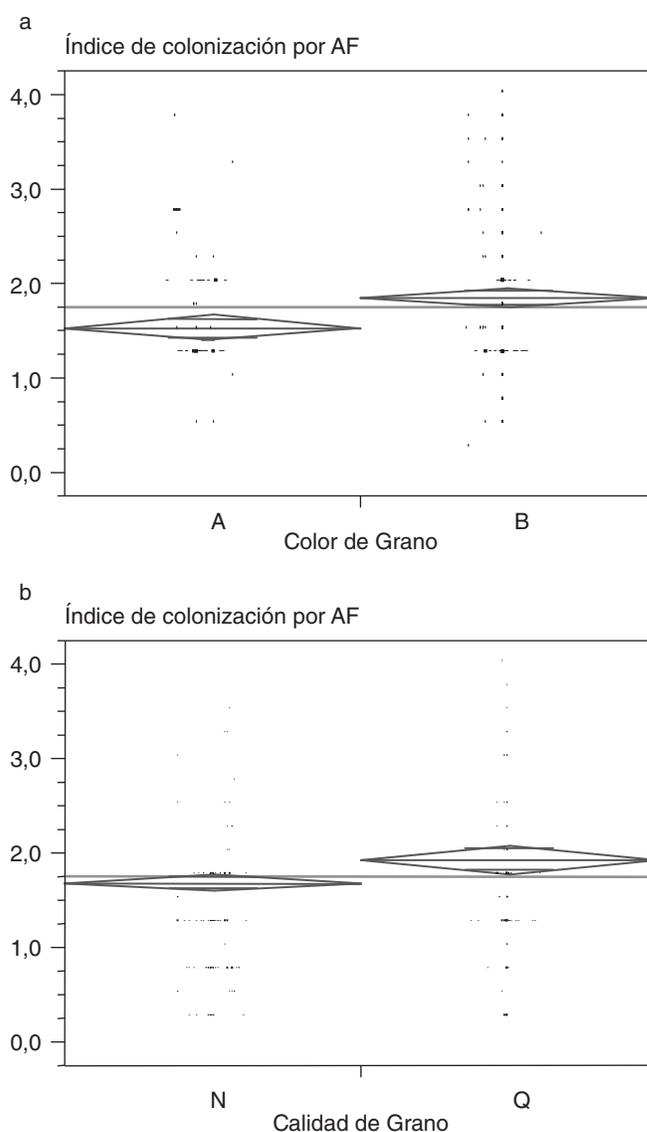


Figura 1. Colonización del grano por *Aspergillus flavus* (AF). a: distribución de la colonización por AF por color de grano (A: amarillos, B: blancos). b: Distribución de la colonización por calidad nutricional del grano (N: normal, Q: *quality protein maize*).

TABLA II
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MEDIAS (MDS 5%) PARA LA COLONIZACIÓN DE GRANO
POR *Aspergillus flavus* SOBRE LÍNEAS DE MAÍZ AGRUPADAS POR SU POBLACIÓN DE ORIGEN

Población de origen *	MDS 5%	IC**	Descripción*
Pool 24 (PO24)	A	2,26	Maíces tropicales de color de grano blanco, tardío y dentado mejorado para resistencia a <i>Spodoptera frugiperda</i> , compuesto por Tuxpeño de México y tardíos de Centroamérica.
Población SA TSR (SA TSR)	A B	1,97	Población de grano amarillo desarrollada para suelos ácidos.
Población 32 (P32)	B C	1,99	Conocida como 'ETO blanco', es una población de maíz blanco duro mejorada para zonas tropicales, de capacidad combinatoria con materiales de la raza Tuxpeño.
Población 22 (P22)	B C	1,82	Conocida como 'mezcla tropical blanca', población de maíz blanco semi dentada tardía, mejorada para zonas tropicales y resistencia a <i>Peronosclerospora sorghi</i> .
Población 26q (P26Q)	B C	1,61	Conocida como 'mezcla amarilla QPM' de granos amarillos tipo duro, de excelente comportamiento en el trópico y seleccionada para precocidad y resistencia a la pudrición de mazorca. Granos con alta calidad proteica.
Población 25q(P25Q)	B C	1,64	Población de grano amarillo tipo duro con alta calidad proteica.
Población 43(P43)	B C	1,76	Conocida como 'La Posta', población de maíz blanco dentado tardía, de buen comportamiento en zonas tropicales.
Población 62(P62)		1,7	No disponible
Población 21(P21)	B C	1,79	Conocida como 'Tuxpeño-1', población de maíz blanco dentado tardía, de excelente comportamiento en zonas tropicales, tolerante a enfermedades foliares.
Población rcw (RCW)	B C	2,00	No disponible
Población 27(P27)	C	1,59	Conocida como 'Amarillo Cristalino-1', población de grano amarillo de tipo duro, de buen comportamiento en el trópico y tolerante a enfermedades foliares.
Población 36 (P36)	C D	1,32	Conocida como 'Cogollero', población de granos amarillos de tipo semi dentado tardío, de buen comportamiento en el trópico y tolerante a daño por insectos.
Población 24 (P24)	D	1,08	Conocida como 'Antigua Veracruz 181', población de grano amarillo de tipo semi dentado tardío, de buen comportamiento en el trópico y tolerante a daño por <i>Spodoptera frugiperda</i> .

* CIMMYT (1998), ** índice de colonización.

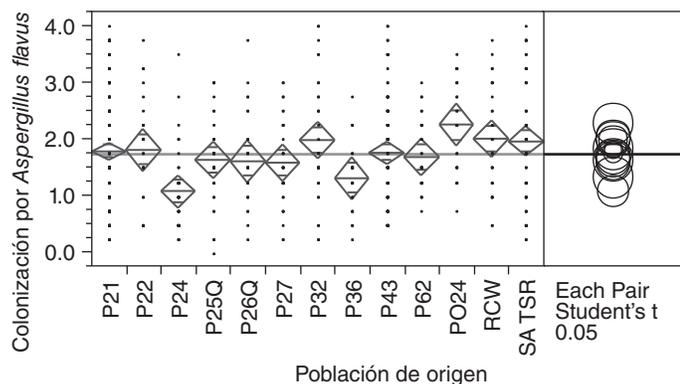


Figura 2. Efecto de la población de origen de la línea de maíz sobre la colonización de grano por *Aspergillus flavus*.

maíz, lo que es de esperarse ya que las mismas poseen una amplia base genética producto del trabajo de pre-mejoramiento (CIMMYT, 1998).

Producción de aflatoxinas

Los niveles de aflatoxinas detectados en el ensayo oscilaron entre 0,02 y 11,5mg·ml⁻¹, lo cual es elevado al compararlos con otros trabajos en donde se usa esta metodología (Brown *et al.*, 1993, 1995, 1997, 2001; Mazzani *et al.*, 2004), donde los niveles máximos de aflatoxinas

alcanzados están entre 0,003 y 0,068mg·ml⁻¹. Esto pudo ocurrir por ciertos cambios en la metodología, por la alta capacidad toxigénica de la cepa Ospino IB o por el uso de diferentes genotipos de maíz.

Al realizar correlaciones entre los valores obtenidos para colonización de grano por AF y el contenido de aflatoxinas utilizando la metodología de Spearman Rho, se encontró que existe una correlación positiva entre el contenido de aflatoxinas y la colonización por AF. Dicha correlación

resultó baja (Spearman Rho= 0,11) y no significativa (Prob>|Rho|= 0,3026). Estos valores ponen de evidencia la presencia de ciertos genotipos resistentes a colonización pero con una alta concentración de aflatoxinas; resultados que coinciden con los de Brown *et al.* (2001). Entre estos genotipos destacan las líneas susceptibles a colonización CML-7 y CML-190, con índices de colonización (IC) de 3,18 y 3,13 respectivamente y con niveles de aflatoxinas relativamente bajos de 0,56 y 1,65mg·ml⁻¹. Por otra parte, la línea CML-400 con un IC intermedio de 2,63 presentó los valores más altos del ensayo (11,5mg·ml⁻¹).

En otro trabajo donde se usa esta metodología (Brown *et al.*, 1997) se demostró una estrecha relación entre producción de aflatoxinas y crecimiento fúngico, indicando posiblemente que dicha correlación, que pareciera resultar lógica, no es constante y depende de otros factores no identificados.

Otra teoría indicaría que los mecanismos responsables de la resistencia a la colonización y a la producción de aflatoxinas son independientes, lo cual coincide con lo encontrado por Huang *et al.* (1997), quienes identificaron dos proteínas en la línea de maíz resistente Tex6 con distintos modos de acción sobre AF y la síntesis de aflatoxinas; el primer compuesto inhibía el desarrollo del hongo (AFGI) y por ende la producción de toxinas, mientras que el segundo inhibía la síntesis de toxinas (ABI) sin afectar el desarrollo del hongo.

Conclusiones

Usando la metodología KSA se identificaron ocho líneas de maíz con alta resistencia a la colonización por *Aspergillus flavus* (AF), que pueden ser usadas para la obtención de nuevas líneas e híbridos. Asimismo, se identificaron 11 líneas con alta susceptibilidad al hongo. Todas estas líneas son adaptadas a la producción en el trópico y pueden, en un futuro, ser usadas para estudios de modo de

herencia, detección de QTL's, estudios de proteómica y/o genómica relacionados a la resistencia.

Se recomienda el uso de las poblaciones 24 y 36 del CIMMYT, conocidas como 'Antigua Veracruz 181' y 'Cogollero', que debido a su amplia base genética pueden emplearse como base para mejoramiento mediante selección recurrente y/o obtención de nuevas líneas.

La mayor resistencia de las líneas de grano amarillo con respecto a las de grano blanco, confirma un posible efecto de los carotenoides sobre el crecimiento del hongo. Por otra parte, la mayor resistencia de las líneas de endospermo normal con respecto a las líneas QPM se debe probablemente a los menores niveles de proteína RIP en cultivares QPM. Sin embargo, también fueron observados cultivares de este tipo que expresan alta resistencia, lo que puede indicar mecanismos alternos de defensa que deben ser estudiados.

En cuanto a la producción de aflatoxinas, se puede concluir que los altos niveles encontrados, causados por la alta capacidad aflatoxigénica de la cepa Ospino IB, difieren significativamente de lo encontrado en la bibliografía cuando se usa la metodología KSA. Por esta razón se sugiere hacer modificaciones como las realizadas por Mazzani *et al.* (2006) que permitan obtener mejores resultados (disminución de días de incubación, control de la humedad, empleo de un aislado

menos toxigénico de AF, entre otros).

La ausencia de correlación significativa entre colonización y producción de toxinas puede sugerir que la colonización por el hongo y la acumulación de aflatoxinas es resultado de dos mecanismos genéticos diferentes.

REFERENCIAS

Alezones J, González A, Sánchez B, Galindo I, Mazzani C (2003) Producción de aflatoxinas de cuatro cepas venezolanas de *Aspergillus flavus* en muestras de maíz (*Zea mays* L.). *Fitopatol. Venez.* 16: 54.

Betrán FJ, Isakeit T, Odvody G (2002) Aflatoxin Accumulation of white and yellow maize inbreds in diallel crosses. *Crop Sci.* 42: 1894-1901.

Brown RL, Cotty PJ, Cleveland TE, Widstrom NW (1993) Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. *J. Food Prot.* 56: 967-971.

Brown RL, Cleveland TE, Payne GA, Woloshuk CP, Campbell KW, White DG (1995) Determination of resistance to aflatoxin production in maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* β -glucuronidase. *Phytopathology* 85: 983-989.

Brown RL, Cleveland TE, Payne GA, Woloshuk CP, White DG (1997) Growth of an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* β -Glucuronidase in maize kernels resistant to aflatoxin production. *J. Food Prot.* 60: 84-87.

Brown RL, Gembeh SV, Grimm C, Cleveland TE (2001) Identification of chemical

components of corn kernel pericarp wax associated with resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4635-4641.

Brown RL, Chen ZY, Cleveland TE (2004) Evidence for an association in corn between stress tolerance and resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 693-699.

Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE (2002) Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology* 92:1084-1094.

CIMMYT (1998) *A Complete Listing of Improved Maize Germplasm from CIMMYT*. Maize Program Special Report. México. pp. 11-16.

Guo BZ, Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS, Mehta AD, Selitrennikoff CP, Widstrom NW (1997) Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopathology* 87: 1174-1178.

Huang Z, White DG, Payne GA (1997) Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology* 87: 622-627.

IARC (1993) *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans N° 56. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia. 245 pp.

INN (2007) *Hojas de Balance de Alimentos de Venezuela 2002-2004*. Instituto Nacional de Nutrición. Caracas, Venezuela. 333 pp.

Martínez AJ, Medina-Martínez MS (2000). Mold occurrence and aflatoxin B1 and fumonisin B1 determination in corn samples in Venezuela. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2833-2836.

Mazzani C, Beomont P, Luzón O (1999) *Incidencia y Capacidad Aflatoxigénica de Cepas Nativas de Aspergillus flavus en Maíz, en Venezuela*. XVI Cong. Venez. Fitopatología. Barquisimeto, Venezuela.

Mazzani C, Luzón O, Beomont P, Chavarri M (2004) Micobiota asociada a granos de maíz en Venezuela y capacidad aflatoxigénica in vitro de los aislamientos de *Aspergillus flavus*. *Fitopatol. Venez.* 17: 19-23.

Mazzani C, Luzón O, Chavarri M, Alezones J (2006) Metodología rápida para evaluar in vitro la respuesta de genotipos de maíz a la acumulación de aflatoxinas. *Fitopatol. Venez.* 19: 10-14.

Moss M (1996) Mycotoxins. *Mycol. Res.* 100: 513-523.

Norton RA (1997) Effect of carotenoids on aflatoxin B1 synthesis by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 87: 814-821.

Payne GA, Fakhoury A, Nielsen K, Kirst M, Gerrald Q, Boston R (2002) Genetic analysis of inhibitory proteins from maize seeds. *Proc. 2nd Fungal Genomics, 3rd Fumonisin Elimination and 15th Aflatoxin Elimination Workshops*. San Antonio, Texas, EEUU.

Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M (1999) Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bull. WHO* 77: 754-766.

R-Biopharm Rhone (2001) *Ridasoft Win, Software for Easy Calculation of ELISA Results*. R-Biopharm Rhone Ltd., Acre Road, Glasgow, RU.

SAS (2007) *JMP Statistics and Graphics Guide, Release 7, 1st Ed., Vol. 1*. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU.