

METODOLOGÍA RÁPIDA PARA EVALUAR *IN VITRO* LA RESPUESTA DE GENOTIPOS DE MAÍZ A LA ACUMULACIÓN DE AFLATOXINAS

Claudio Mazzani¹, Odalís Luzón¹, Marleny Chavarri¹ y Jesús Alezones²

¹Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Micotoxicología, Apartado Postal 4579, Maracay 2101-A, estado Aragua; ²Fundación DANAC, Apartado Postal 182, San Javier, estado Yaracuy; Venezuela.

Recibido: 20 de noviembre de 2005.

Aceptado: 02 de junio de 2006.

RESUMEN

Mazzani, C., Luzón, O., Chavarri M. y 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.

La resistencia de granos de maíz (*Zea mays*) aparece como una estrategia primordial para prevenir la infección por *Aspergillus flavus* y/o la acumulación de aflatoxinas. Se desarrolló una metodología rápida *in vitro* para evaluar la respuesta de genotipos de maíz a la acumulación de aflatoxinas, esta última cuantificada directamente por método inmunoquímico. En cuatro ensayos, granos de dos series de cultivares de maíz blanco (50 g/muestra) fueron sometidos a desinfección superficial, rehidratados hasta 24% e inoculados con 1 mL de suspensión de conidios de *A. flavus* (10⁶ conidios/mL) del aislamiento Turén I (ensayos 1 y 2) y del aislamiento Ospino I-B (ensayos 3 y 4). La incubación se realizó durante 12 d a 24 ± 2 °C. El diseño estadístico fue completamente aleatorizado. La data fue sometida a análisis de varianza y prueba de comparación de medias. Diferencias significativas en los contenidos de aflatoxinas entre cultivares fueron encontradas en los ensayos 1 y 2, y no significativas en los ensayos 3 y 4. En los ensayos 1 y 2, los dos cultivares más contaminados y los dos menos contaminados fueron los mismos, así como la acumulación de aflatoxinas en Danac 2002 fue intermedia en ambos ensayos. Entre los ensayos 3 y 4 los resultados, sin presentar diferencias estadísticas, fueron consistentes en cuatro cultivares y más erráticos en dos. Los resultados demostraron la posibilidad cierta de utilizar esta metodología *in vitro* para evaluar la susceptibilidad de genotipos de maíz a la acumulación de aflatoxinas.

Palabras clave adicionales: micotoxinas, *Zea mays*.

ABSTRACT

Mazzani, C., Luzón, O., Chavarri, M., and Alezones, J. 2006. A rapid methodology to evaluate *in vitro* the response of corn genotypes to aflatoxins accumulation. *Fitopatol. Venez.* 19: 10-14.

Maize (*Zea mays*) kernels resistance is the preeminent strategy to prevent *Aspergillus flavus* infection and aflatoxins accumulation. An *in vitro* rapid methodology to evaluate the response of corn genotypes to aflatoxins accumulation was developed. Aflatoxins were quantified directly by immunochemical method. In four experiments, kernels of two series of white maize cultivars (50 g/sample) were surface disinfected and moistured to 24%. Later were inoculated with 1 mL of *A. flavus* conidia suspension (10⁶ conidia/mL) and were incubated during 12 d at 24 ± 2 °C. The Turén I (experiments 1,2) and Ospino I-B (experiments 3,4) strains of *A. flavus* were used. The experiments were carried out under completely randomized design. The data was submitted to analysis of variance and mean separation test. Significant differences in the aflatoxins contents among cultivars (series 1) were found at experiments 1 and 2. The two more contaminated cultivars and the two less contaminated one were the same in the experiments 1 and 2. The cultivar Danac 2002 showed intermediate aflatoxins accumulation in both experiments. Non significant differences among cultivars (series 2) were found in the results of the experiments 3 and 4. The behavior of four cultivars was consistent between experiments but two cultivars presented erratic results. Therefore it was demonstrated the true possibility to use this methodology to evaluate the susceptibility of maize genotypes to aflatoxins accumulation.

Additional key words: mycotoxins, *Zea mays*.

INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas, producidas principalmente por *Aspergillus flavus* Link ex Fries, son conocidas por el riesgo que representa para la salud humana y animal el consumo de alimentos contaminados con las mismas. Esto incluye un amplio ámbito de efectos anatomopatológicos, disminución de la conversión alimentaria y de la productividad, inmunosupresión, carcinogénesis y hasta la muerte (11,14,22). En Venezuela, así como en otros países de América Latina, se ha comprobado consistentemente elevada incidencia de *A. flavus* y considerables niveles de aflatoxinas en granos maduros de maíz (*Zea mays* L.) en muestras recolectadas en el campo y durante su almacenamiento (7,12,14,15,16).

La resistencia a la infección, a la síntesis de aflatoxinas o ambas aparece como una estrategia primordial para prevenir su acumulación en granos de maíz (1,3,22). Desde que se concluyó que la resistencia a la infección y a la contaminación con micotoxinas es controlada genéticamente, se han identificado importantes fuentes de resistencia como resultado de trabajos de selección y mejoramiento (6,3,17), así como se han determinado de manera clara importantes

mecanismos de resistencia (2,5,8,9,10). Sin embargo, la identificación precisa de plantas resistentes a la invasión por mohos y/o a la acumulación de micotoxinas bajo cualquier condición de campo no es sencilla si no se logra una inoculación uniforme y el estricto control de numerosos factores, lo cual es muy difícil (21). Además, las evaluaciones de campo ocupan gran cantidad de tiempo y dinero (22).

En Venezuela, se han realizado investigaciones de campo, en ensayos y en explotaciones comerciales, para caracterizar la susceptibilidad de genotipos comerciales y experimentales de maíz a la infección de los granos por *A. flavus* y *Fusarium moniliforme* Sheldom (syn. *Fusarium verticillioides*) y a la acumulación de aflatoxinas y fumonisinas. Los resultados de tales investigaciones mostraron notables diferencias entre genotipos, algunas consistentes entre localidades y años de evaluación, mientras que otras demostraron un marcado efecto ambiental en el comportamiento de los genotipos. Además, se encontró escasa relación entre la incidencia de cada moho y la concentración de la respectiva micotoxina en los granos, así como reacción contraria de los genotipos de maíz a esas especies de mohos y a sus micotoxinas (12,15).

Resulta prioritario incluir en todos los programas de mejoramiento del maíz en Venezuela actividades tendientes

a incorporar resistencia a mohos y/o a sus micotoxinas, fundamentalmente a *A. flavus* y a las aflatoxinas, así como a *F. verticillioides* y a las fumonisinas. Se impone, además, la necesidad de hacer evaluaciones rutinarias sobre la susceptibilidad a esos mohos y a sus micotoxinas de los genotipos de maíz incluidos en los ensayos regionales que desarrolla o supervisa el sector oficial, antes de que los mismos sean liberados para ser utilizados por los agricultores.

Una metodología de laboratorio conocida como Kernel Screening Assay (KSA), para la selección de genotipos resistentes a *A. flavus* y las aflatoxinas, fue desarrollada por Brown *et al.* (1,5), en la cual se emplean materiales sencillos y económicos, además de ser relativamente rápida, cuando la variable a medir es el grado de colonización de los granos por el moho. Sin embargo, la evaluación de la contaminación con aflatoxinas de los granos inoculados es tediosa toda vez que se realiza por cromatografía en capa delgada (TLC) por el reducido tamaño de la muestra empleada. Tal metodología, para hacerla cuantitativa, requiere de un densitómetro equipado con lector de fluorescencia; además, es lenta y se emplean cantidades relativamente grandes de distintos solventes orgánicos.

Sobre la base de esos argumentos, se realizó la presente investigación cuyo objetivo fue desarrollar una metodología *in vitro* para evaluar la susceptibilidad de cultivares de maíz a la contaminación de sus granos con aflatoxinas, para ser cuantificadas directamente por un método inmunoquímico, como alternativa analítica accesible a cualquier laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de los aislamientos de *A. flavus*. Los aislamientos de *A. flavus*, con capacidad aflatoxigénica conocida, se obtuvieron de la colección que mantiene el Laboratorio de Micotoxicología, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. La evaluación *in vitro* de esos aislamientos ya se había realizado y los resultados se encuentran publicados (16). La capacidad toxigénica de los aislamientos Turén I y Ospino I-B fue confirmada en otro ensayo y los mismos produjeron 28,9 y 3000,0 ppb de aflatoxinas B₁+B₂ en el medio natural arroz, respectivamente (16). Los aislamientos se mantuvieron como macrocultivos inclinados en papa dextrosa agar, sellados con Parafilm® y almacenados a ca 3° C. Periódicamente, se inocularon en el medio natural arroz con el fin de mantener su capacidad para producir aflatoxinas.

Cultivares evaluados y acondicionamiento de los granos. Para el desarrollo de esta metodología *in vitro* se realizaron cuatro ensayos. En los dos primeros (ensayos 1 y 2) los cultivares incluidos fueron Pioneer 30B87, Himeca 3000, Danac 2562, Pioneer 30F94 y Danac 2002 (serie 1). En los ensayos 3 y 4 se incluyeron los cultivares Pioneer 30F94, Tuxpeño Sequía C₈, Danac 022001, Danac 3273, Danac 2002 y La Posta Sequía C₄ (serie 2). Previo a la inoculación, con el fin de eliminar la contaminación natural con *A. flavus* y otros mohos, 50 g de granos enteros de cada híbrido por cada repetición, libres de aflatoxinas, se irradiaron con 12 kGy (1,2 Mrad) de radiación gamma como proceso de desinfección (esterilización) (13). Este tratamiento se llevó a cabo en el reactor nuclear del Departamento de

Física de Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas. En ensayos preliminares, para la desinfección de los granos se utilizó etanol al 70% durante 2 min, se lavaron con agua deionizada estéril, se eliminó el exceso de agua sobre papel estéril y se trataron bajo luz ultravioleta durante 96 h en ambiente estéril, en delgadas capas dentro de placas de Petri estériles de 15 cm de diam. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios.

Los granos irradiados se transfirieron a matraces estériles de 250 mL de capacidad donde se ajustó su contenido de humedad hasta ca 24%, rehidratándolos con volúmenes de agua estéril según el contenido inicial de cada cultivar, determinado con un equipo Motomco moisture meter, modelo 919S. En todos los ensayos se dejaron muestras adicionales de cada genotipo con la finalidad de evaluar la viabilidad de los granos esterilizados antes de ser inoculados (5).

Producción *in vitro* de aflatoxinas en cultivares de maíz. Cada muestra se inoculó con una suspensión de conidios de *A. flavus*, preparada a partir de colonias de 8 d de crecimiento en papa dextrosa agar, ajustada a una concentración de 10⁶ conidios/mL utilizando una cámara de Neubauer. Así como se evaluaron dos series de cultivares de maíz, también se utilizaron dos aislamientos de *A. flavus*, con el objeto de generar diferentes relaciones huésped-patógeno. En los ensayos 1 y 2 se empleó el aislamiento Turén I, mientras que los ensayos 3 y 4 el aislamiento Ospino I-B, con mayor capacidad aflatoxigénica que el primero (16). La incubación se realizó en cámara húmeda durante 12 d a 24 ± 2 °C y con períodos alternos de luz y oscuridad (18). Se utilizó un diseño con arreglo completamente aleatorizado de tratamientos. Los resultados del contenido de aflatoxinas fueron sometidos a análisis de varianza y comparaciones de medias por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Cuantificación de aflatoxinas. El contenido de aflatoxinas B₁+B₂ se cuantificó por método inmunoquímico (19), comercialmente disponible como Aflatest P (Vicam Sci. Tech., EE.UU.), el cual utiliza anticuerpos monoclonales específicos para esas aflatoxinas. En las muestras colonizadas (50g) la extracción se realizó por licuación a alta revolución durante 1 min en 100 mL de metanol - agua (80:20) + 5g de NaCl. Se filtró a través de papel, se diluyó, se filtró a través de microfibra de vidrio y 2 mL del extracto diluido se pasaron a través de la columna de inmovilización a baja velocidad. Después de sucesivos lavados, se secó la columna y se extrajeron las aflatoxinas con 1 mL de metanol grado HPLC, se recolectó en un tubo de borosilicato y se le añadió 1 mL del revelador de aflatoxinas. Se procedió a la fluorometría en un fluorómetro marca BBI Source Scientific serie 4 durante 60 seg. Los resultados se expresaron directamente como $\mu\text{g/g}$ (ppb) de aflatoxinas B₁+B₂.

RESULTADOS

Respuesta de cinco cultivares de maíz blanco ante la inoculación *in vitro* con la cepa Turén I de *A. flavus* (ensayos 1 y 2). Las pruebas de germinación, realizadas después de la desinfección de los granos, mostraron porcentajes superiores a 90% en todos los cultivares.

El análisis de varianza (ensayo 1) arrojó diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los contenidos de aflatoxinas en los granos de los diferentes cultivares (Cuadro 1) y en la comparación de medias se observó que Himeca 3000, el cual resultó el menos contaminado, fue significativamente diferente de Danac 2002, Pioneer 30B87 y Danac 2562, el cual mostró ser el más favorable para la síntesis de aflatoxinas (Cuadro 2).

Tal como se explicó en la sección materiales y métodos se repitió el experimento con los mismos genotipos de maíz, el mismo aislamiento de *A. flavus* y bajo las mismas condiciones que regularon el experimento anterior, con el objeto de validar la metodología propuesta y verificar el carácter reproducible de los resultados obtenidos.

De nuevo, el análisis de varianza (ensayo 2) arrojó diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los contenidos de aflatoxinas en los granos de los diferentes cultivares (Cuadro 1) y en la comparación de medias se observó que Pioneer 30F94 que resultó con el menor contenido de aflatoxinas fue significativamente diferente de Danac 2562 y Pioneer 30B87; este último resultó ser el más favorable para la síntesis de aflatoxinas (Cuadro 2).

En comparación con los resultados del primer ensayo, se observó que los dos híbridos más contaminados fueron los mismos (Danac 2562 y Pioneer 30B87), como también lo fueron los dos menos contaminados (Himeca 3000 y P 30F94) y, aunque la posición relativa de cada híbrido con respecto al otro fue contraria, no fueron significativamente diferentes entre ellos en los dos ensayos. Por su parte Danac 2002 resultó intermedio en ambos ensayos. En ambos análisis de varianza se obtuvieron coeficientes de variación aceptables (Cuadro 1).

Respuesta de seis cultivares de maíz blanco ante la inoculación *in vitro* con la cepa Ospino I-B de *A. flavus* (ensayos 3 y 4). Las pruebas de germinación, realizadas después de la desinfección de los granos, mostraron porcentajes superiores a 90 en todos los cultivares garantizando de esa manera su viabilidad.

En el caso del ensayo 3, el análisis de varianza no arrojó diferencias significativas entre los contenidos de aflatoxinas en los granos de los diferentes cultivares (Cuadro 1). El cultivar Pioneer 30F94, el menos contaminado, presentó un contenido de aflatoxinas similar al resto de los genotipos, con la excepción de Danac 022001 el cual mostró ser el más favorable para la síntesis de aflatoxinas (Cuadro 3).

Igual que en los ensayos 1 y 2 se repitió el experimento con los mismos cultivares de maíz, el mismo aislamiento de *A. flavus* y bajo las mismas condiciones

Cuadro 1. Significación de los análisis de varianza⁽¹⁾ del contenido de aflatoxinas (ppb) en los granos de cultivares maíz blanco inoculados *in vitro* con los aislamientos Turén I (ensayos 1 y 2) y Ospino I-B (ensayos 3 y 4) de *Aspergillus flavus*.

Fuente de variación	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
Cultivar	**	**	ns	ns
cv (%)	19,2	23,9	14,4	8,1

⁽¹⁾ realizado sobre valores transformados a raíz cuadrada. **: significativo al 1%; ns: no significativo; cv: coeficiente de variación.

Cuadro 2. Comparación de medias del contenido de aflatoxinas en granos de cinco cultivares de maíz blanco (serie 1) inoculados *in vitro* con el aislamiento Turén I de *Aspergillus flavus* (ensayos 1 y 2).

Cultivar	Contenido de aflatoxinas ⁽¹⁾	
	Ensayo 1	Ensayo 2
Himeca 3000	662,5 C ⁽²⁾	605,0 B
Pioneer 30F94	1535,0 BC	592,0 B
Danac 2002	2300,0 AB	1377,5 AB
Pioneer 30B87	2500,0 AB	2075,0 A
Danac 2562	3000,0 A	1555,0 A

⁽¹⁾ expresado en ppb.

⁽²⁾ las medias seguidas de la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0,05$).

que regularon el experimento anterior. De nuevo, el análisis de varianza (ensayo 4) no arrojó diferencias significativas entre los contenidos de aflatoxinas en los granos de los diferentes cultivares (Cuadro 1). Al igual que en el ensayo anterior el contenido de aflatoxinas fue alto en todos los cultivares y consistente entre ensayos excepto en Tuxpeño Sequía C₈ y Pioneer 30F94 en los cuales el contenido fue mayor en el ensayo 4 (Cuadro 3). En ambos análisis de varianza se obtuvieron bajos coeficientes de variación (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

La viabilidad de los granos empleados en todos los ensayos garantizó una condición que se ha relacionado con la resistencia a la colonización por *A. flavus* y con la subsecuente síntesis de aflatoxinas. Los resultados obtenidos por otros investigadores sugieren que la resistencia postcosecha a la contaminación con aflatoxinas encontrada en algunas poblaciones se relaciona directamente con la actividad metabólica de embriones viables (4,5).

Una diferencia importante de la metodología propuesta con relación a la metodología KSA radica en el contenido de humedad de los granos a ser inoculados. Mientras en la metodología KSA los granos son secados en estufa con circulación de aire forzado a 45 °C por 2 d previo a la inoculación (1,5), en la metodología propuesta los granos fueron rehidratados hasta 24% de contenido de humedad. En investigaciones previas realizadas en este laboratorio se

Cuadro 3. Contenido de aflatoxinas en los granos de seis cultivares maíz blanco (serie 2) inoculados *in vitro* con el aislamiento Ospino I-B de *Aspergillus flavus* (ensayos 3 y 4).

Cultivar	Contenido de aflatoxinas ⁽¹⁾	
	Ensayo 3	Ensayo 4
Danac 022001	2966,7 ⁽²⁾	2933,3 ⁽²⁾
Danac 3273	2533,3	2700,0
Danac 2002	2333,3	2566,7
La Posta Sequía C ₄	2333,3	2900,0
Tuxpeño Sequía C ₈	2200,0	3066,7
Pioneer 30F94	2133,3	3100,0

⁽¹⁾ expresado en ppb.

⁽²⁾ no se realizó la prueba de comparación de medias.

encontró que la mayor acumulación de aflatoxinas ocurrió rehidratando los granos hasta el nivel señalado, cuando se empleó una concentración de inóculo de 10^6 conidios/mL (16). Otros autores también afirman que la susceptibilidad de granos de maíz se incrementa desde que se alcanza la madurez fisiológica (ca 30% de humedad) hasta contenidos de humedad alrededor de 25% (21,22).

Los resultados obtenidos en el ensayo 1 resultaron altamente satisfactorios en razón de haberse detectado *in vitro* marcadas diferencias entre cultivares en su respuesta a la acumulación de aflatoxinas, aun cuando el contenido de estas micotoxinas fue elevado para todos los genotipos y excedió la tolerancia sugerida en maíz. Sin embargo, es de esperarse que bajo condiciones favorables de contenido de humedad de los granos, de comprobada capacidad aflatoxigénica del aislamiento utilizado y de la alta presión de inóculo, la contaminación sea elevada. Bajo esas condiciones favorables es más probable encontrar diferencias entre cultivares.

Los resultados obtenidos en el ensayo 2 confirmaron las diferencias entre cultivares detectadas en el experimento anterior en su respuesta *in vitro* a la contaminación con aflatoxinas; también, el contenido de estas micotoxinas fue elevado para todos los cultivares y de nuevo excedió la tolerancia sugerida en maíz. En investigaciones realizadas, utilizando la metodología KSA desarrollada por Brown *et al.* (1,5), determinaron elevados contenidos de aflatoxinas, inclusive en los testigos resistentes (17) pertenecientes a las poblaciones MAS:gk, MAS:pw.nf y M182, aun cuando esos contenidos fueron marcadamente inferiores y significativamente diferentes a los niveles alcanzados en los controles susceptibles y en otras entradas evaluadas (3,4,5).

La consistencia de los resultados obtenidos en los ensayos 3 y 4, a pesar de la ausencia de significación entre los contenidos de aflatoxinas en los cultivares, implica susceptibilidad similar de los genotipos ante un aislamiento sumamente virulento y con alta capacidad aflatoxigénica como lo es Ospino I-B (16). Por ello, no debe ser atribuida la ausencia de diferencias estadísticamente significativas a deficiencias en la metodología propuesta toda vez que la reproducibilidad de los resultados quedó demostrada. Asimismo, la mayor contaminación con aflatoxinas mostrada por la mayoría de los cultivares incluidos en los ensayos 3 y 4, en comparación con los contenidos encontrados en los materiales evaluados en los ensayos 1 y 2, también guarda relación con la mayor capacidad aflatoxigénica mostrada por el aislamiento Ospino I-B con relación al aislamiento Turén I (16).

El comportamiento errático de los cultivares Tuxpeño Sequía C₈ y Pioneer 30F94 entre los ensayos 3 y 4 coincide con observaciones realizadas por otros investigadores. Durante la evaluación de la resistencia a aflatoxinas en 36 líneas africanas aplicando la metodología KSA, se encontró alta variabilidad entre ensayos en los contenidos de estas micotoxinas, inclusive en el testigo resistente M182. Los autores sugirieron que ese fenómeno de variabilidad es rutinariamente observado en los estudios con aflatoxinas, sea en el laboratorio (3,5), así como otros lo han reportado en ensayos de campo bajo infección natural (12,15).

Con este segundo grupo de experimentos se confirmó la posibilidad real de emplear esta metodología *in vitro* para la evaluación rápida de la respuesta de un elevado número de cultivares a la acumulación de aflatoxinas bajo condiciones controladas. Los resultados obtenidos, lógicamente, deberán ser validados en el campo en experimentos bajo inoculación como es usual cuando se emplea cualquier metodología de evaluación en el laboratorio.

Otro aspecto de interés con relación a la estandarización de la metodología propuesta, sobre la base de observaciones realizadas durante el desarrollo de los cuatro ensayos, es que el tiempo de incubación podría ser menor a los 12 d empleados en la investigación (18). La colonización de los granos fue notable en los cultivares más susceptibles a partir de los 7 d de incubación, así como lo fue la acumulación de aflatoxinas en algunas muestras evaluadas al azar 8 d después de la inoculación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación para la Investigación Agrícola Danac por los aportes financieros, así como por el suministro de los granos de los cultivares de maíz para el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. Brown, R.L., Chen, Z-Y., Cleveland, T.E., and Russin, J. S. 1999. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 89: 113-117.
2. Brown, R.L., Chen, Z-Y., Menkir, A., and Cleveland, T.E. 2003. Using biotechnology to enhance host resistance to aflatoxin contamination of corn. *African Journal of Biotechnology* 2: 557-562.
3. Brown, R.L., Chen, Z-Y., Menkir, A., Cleveland, T.E., Cardwell, K., Kling, J., and White, D.G. 2001. Resistance to aflatoxin accumulation in kernels of maize inbreds selected for ear rot resistance in West and Central Africa. *Journal of Food Protection* 64: 396-400.
4. Brown, R.L., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Woloshuk, C.R., and White, D.G. 1997. Growth of an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* β -glucuronidase in maize kernels resistant to aflatoxin production. *Journal of Food Protection* 60: 84-87.
5. Brown, R.L., Cotty, P.J., Cleveland, T.E., and Widstrom, N.W. 1993. Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. *Journal of Food Protection* 56: 967-971.
6. Campbell, K.W., White, D.G., and Toman, J. 1993. Sources of resistance in F₂ corn hybrids to ear rot caused by *Aspergillus flavus*. *Plant Disease* 77: 1169.
7. Cati, S. y Mazzani, C. 1991. Micoflora de granos de maíz almacenados en el estado Guárico (Venezuela): identificación y cuantificación. *Fitopatología Venezolana* 4: 54. (Resumen).
8. Chen, Z-Y., Brown, R.L., and Cleveland, T.E. 2004. Evidence for an association in corn between stress tolerance and resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin. *African Journal of Biotechnology* 3: 693-699.
9. Chen, Z-Y., Brown, R.L., Damann, K.E., and Cleveland, T.E. 2004. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology* 94: 938-945.

10. Chen, Z.-Y., Brown, R.L., Lax, A.R., Guo, B.Z., Cleveland, T.E., and Russin, J.S. 1998. Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels associated with a 14-kDa protein. *Phytopathology* 88: 276-283.
11. Jelinek, C., Pohland, A., and Wood, G.E. 1989. Worldwide occurrence of micotoxins in foods and feeds. *Journal Association Official Analytical Chemist* 72: 223-229.
12. Luzón, O., Martínez, A., Mazzani, C., Barrientos, V. y Figueroa, R. 2003. Comportamiento de genotipos de maíz de grano amarillo ante *Fusarium moniliforme* y las fumonisinas en dos localidades de Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 16: 17-21.
13. Marín, S., Albareda, X., Ramos, J., and Sanchis, A. 2001. Impact of environmental and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B₁ and aflatoxins on maize grain. *Journal of Science Food Agriculture* 81: 1060-1068.
14. Martínez, A. 1991. Contribución al estudio de la flora fúngica y su toxigenicidad e incidencia de aflatoxinas en cereales y oleaginosas cultivadas en Venezuela. Trabajo de Ascenso. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 290 pp.
15. Mazzani, C., Borges, O., Luzón, O., Barrientos, V. y Quijada, P. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 12: 9-13.
16. Mazzani, C., Luzón, O., Beomont, P. y Chavarri, M. 2004. Micobiota asociada a granos de maíz en Venezuela y capacidad aflatoxigénica *in vitro* de los aislamientos de *Aspergillus flavus*. *Fitopatología Venezolana* 17: 19-23.
17. McMillian, W.W., Widstrom, N.W. and Wilson, D.M. 1993. Registration of GT-MAS: gk maize germplasm. *Crop Science* 33: 882.
18. Palma De Almeida, A. 1996. Microbiota fúngica e produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium moniliforme* Sheldon de três híbridos de grãos de milho recém colhido. Tesis Mag. Sc. São Paulo, Brasil. Universidade de São Paulo. 120 pp.
19. Scott, P.M. and Trucksess, M.W. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of Association Official Analytical Chemist* 80: 941-949.
20. Sinha, K. 1990. Incidence of mycotoxins in maize grains in Bihar state, India. *Food Additives and Contaminants* 7: 55-61.
21. Wicklow, D.T. 1991. Epidemiology of *Aspergillus flavus* in corn. In *Aflatoxin in corn: New perspectives*. O.L. Shotwell, and C.R. Hurburg (eds.). Iowa Agricultural and Home Experiment Station. Iowa State University, Ames Iowa. Research Bulletin 599. pp.315-327.
22. Widstrom, N.W. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. *Advances in Agronomy* 56:219-280.