

00381  
e/g



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Formación de zearalenona en maíz en el campo

TESIS

Que para obtener el título de Doctora en Ciencias (Biología)

Presenta:

María Genoveva García Aguirre

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CONTENIDO

Resumen . . . . .	1
Introducción . . . . .	1
Objetivos . . . . .	2
Antecedentes . . . . .	3
Estudios preliminares . . . . .	13
Materiales y métodos . . . . .	13
Líneas e híbridos de maíz . . . . .	13
Inóculo . . . . .	13
Cantidad y concentración del inóculo . . . . .	14
Inoculación . . . . .	15
Período de inoculación . . . . .	15
Métodos de inoculación . . . . .	15
Diseño experimental . . . . .	16
Análisis para la determinación de zearalenona . . . . .	16
Preparación de las muestras . . . . .	16
Análisis químico . . . . .	17
Fermentación . . . . .	17
Resultados y discusión . . . . .	17
Estudios principales . . . . .	20
Materiales y métodos . . . . .	20
Líneas e híbridos . . . . .	20
Inoculación . . . . .	21
Inóculo . . . . .	21
Preparación del inóculo . . . . .	21
Cantidad y concentración del inóculo . . . . .	21

Métodos de inoculación . . . . .	22
Periodos de inoculación . . . . .	22
Diseño experimental . . . . .	22
Cosecha . . . . .	23
Análisis para zearalenona . . . . .	23
Preparación de la muestra . . . . .	23
Análisis químico . . . . .	23
Resultados y discusión . . . . .	24
Conclusiones . . . . .	34
Literatura citada . . . . .	35

## FORMACION DE ZEARALENONA EN EL MAIZ EN EL CAMPO

### Resumen

Quince líneas y dos híbridos de maíz sembrados en el campo, se inocularon con *Gibberella zeae* en diferentes épocas del desarrollo de la mazorca a partir de la antesis siguiendo diferentes métodos de inoculación para probar su capacidad para aceptar la formación de zearalenona durante esta etapa de su ciclo de vida. Tanto las líneas como los híbridos fueron capaces de admitir la formación de la toxina durante su desarrollo en el campo: las diversas genotipos de maíz, mostraron diferencias significativas de resistencia o susceptibilidad a la formación de zearalenona durante la formación del grano en el campo.

### Introducción

La mayoría de los estudios sobre micotoxinas hasta hace algunos años, daban por hecho que éstas se formaban en los diferentes productos agrícolas después de la cosecha, durante el período de almacenamiento; a esto contribuyeron Forgacs y Carl (1962) con su revisión sobre micotoxicosis, que en opinión de Stoloff (1979), a pesar de que conduce a lo que él mismo llama la era de las toxicosis asociadas con mohos, y sienta las bases para la era de las micotoxinas, prohibió la generalización del punto de vista erróneo de que los hongos micotoxígenos estaban asociados con prácticas de cosecha y almacenamiento deficientes. Zuber et al. (1976) evidenciaron que la aflatoxina B<sub>1</sub> se produce con frecuencia como resultado de infecciones de *Aspergillus flavus* en el grano de maíz durante su desarrollo en el campo y concluyen que la presencia de aflatoxinas en maíz antes de la cosecha es un problema más común de lo que se creía, particularmente en las regiones del sur de EUA. Con relación a la zearalenona, también ha sido encontrada en el campo en concentraciones bajas (Caldwell y Tuite, 1974); sin embargo, los autores concluyen que la zearalenona en maíz recién cosechado en Indiana, EUA, no representa una amenaza importante para el ganado.

La zearalenona, lactona del ácido resorcilico (Urry et al., 1966), induce el síndrome estrogénico en cerdos que consumen maíz y otros cereales contaminados con *Gibberella zeae* (Mc Nutt et al., 1929; Stobb et al., 1952; Christensen et al., 1965; Mirocha et al., 1967;

Mirocha, 1980). La zearalenona fue aislada por primera vez por Stobb et al. en 1962. La toxina mostró gran actividad anabólica y uterotrópica en ratones; estudios posteriores la encontraron en forma natural en niveles superiores a 2 000 ppb (ug/K) en maíz mohoso asociado con brotes de hiperestrogenismo en cerdos en USA, Inglaterra, Europa y Australia (Mirocha et al. 1971, 1976; Hesselstine, 1974; Mirocha y Christensen, 1974). La mayoría de los brotes de la enfermedad inducida por la zearalenona se presentan en la primavera siguiente a una cosecha en condiciones de temperatura baja y al almacenamiento de esas mazorcas o granos con contenidos de humedad altos, además de haber sufrido condiciones ambientales favorables a las pudriciones de mazorca inducidas por *Gibberella* durante la época de antesis; éstas son: por los menos 7 días lluviosos y temperatura media menor de 23°C durante la antesis (Tuite et al., 1974). Las inspecciones realizadas con el objeto de conocer la incidencia de zearalenona en maíz, tanto comercial como aquel obviamente dañado con *Fusarium*, revelaron correlación geográfica entre la presencia de la toxina y la localidad (Eppley et al., 1974; Stoloff., 1976).

No todo el maíz infectado con *Fusarium graminearum* en el campo o en el almacén presenta niveles detectables de zearalenona, lo que sugiere que las diferentes variedades de maíz pudiesen tener un efecto inhibitorio para la formación de la toxina (Shannon et al., 1980; Cullen et al., 1983; García-Aguirre, 1983). En condiciones de laboratorio, distintas líneas de maíz inoculadas con los mismos aislamientos de *Gibberella zeae* tienen capacidades diferentes para soportar la formación de zearalenona (Shannon et al., 1980); en el campo, la concentración de zearalenona en diferentes líneas e híbridos de maíz inoculados e infectados con *G. zeae*, tienen diferencias con relación a la línea de maíz y con el aislamiento del hongo (Cullen et al., 1983; García-Aguirre, 1983).

## Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron: encontrar en condiciones de campo, líneas e híbridos de maíz resistentes a la pudrición de mazorca inducida por *G. zeae*, (estado sexual *Fusarium graminearum*) y, en aquellas susceptibles, conocer la capacidad del hongo para producir zearalenona, así como los niveles elaborados en cada variedad.

## Antecedentes

Como las micotoxinas se han encontrado como contaminantes de alimentos y productos agrícolas en forma natural, las implicaciones sanitarias y económicas que su presencia representa en estos productos, han sido causa de preocupación en casi todo el mundo y su estudio ha recibido un gran apoyo, tanto de dependencias gubernamentales como de agencias privadas involucradas en el problema. Esto se manifiesta en el caso de las aflatoxinas, las más estudiadas y mejor entendidas de las micotoxinas conocidas a la fecha por sus características tóxicas y cancerígenas para casi toda la escala animal; este último aspecto ha permitido el acceso expedito a recursos económicos para la investigación, además de la facilidad que se tuvo en un principio para la obtención y difusión amplia y sin restricciones de la información que se iba generando. Todo esto condujo a establecer que se trataba de un problema internacional (Irving, 1971; Shotwell et al., 1973; Stoloff, 1979).

El gran progreso que ha tenido el estudio de las micotoxinas se inició a partir del principio de la década de los sesentas, como resultado del descubrimiento de las aflatoxinas (Sargeant et al., 1961). Stoloff (1979), considera tres eras durante el desarrollo de la investigación de este grupo de sustancias. La primera incluye aquellos reportes que relacionan incidentes tóxicos en animales, incluido el hombre, con la ingestión de alimentos mofcosos y se inicia en 1711 con el establecimiento del papel de *Claviceps purpurea* en la formación de los granos de ergot en el centeno; durante esta época la meta era el aislamiento e identificación de los hongos responsables de los incidentes de intoxicaciones; la segunda era se inicia a partir de 1962 con el descubrimiento de las aflatoxinas. Esta era se define por el aislamiento y caracterización de toxinas de origen fúngico, a pesar de la ausencia de mohos viables en el sustrato. Debido a que han sido aisladas y caracterizadas micotoxinas a las que no se les ha encontrado una relación obvia con las enfermedades, lo que implica una gran cantidad de retos de investigación, Stoloff considera que ésta es la tercera era en el estudio de las toxinas producidas por los hongos.

El apoyo dado a la investigación sobre aflatoxinas es sin duda debido a su capacidad cancerígena, que involucra al hombre, por lo menos de manera potencial, como lo demuestra la evidencia circunstancial existente (Shank, 1976), hecho que inquieta seriamente a los responsables de la alimentación y de la salud pública de los diferentes países; actualmente, la presencia de aflatoxinas en alimentos y productos agrícolas susceptibles de estar contaminados, están controladas en la mayoría de los países del mundo, algunos de los cuales han incluido en sus legislaciones sanitarias regulaciones y tolerancias para éstas; para otras micotoxinas también existen regulaciones y límites máximos

tolerados en un número limitado de países (Krogh, 1977; Schuller et al., 1983).

El impulso dado al estudio de las aflatoxinas ayudó al descubrimiento de otras micotoxinas que pueden contaminar diversos alimentos en condiciones naturales; toxinas con características químicas y actividades biológica similar o diferente a las aflatoxinas y, aunque algunas no están reconocidas como cancerígenas ni están reportadas como tóxicas para el hombre, son de gran importancia desde el punto de vista económico, ya que al dañar a los animales domésticos, limitan la producción pecuaria y reducen el abasto de alimentos, además de las pérdidas que representan para los productores, tanto ganaderos como agrícolas y para los industriales de los alimentos, aspectos que no pueden ser subestimados.

Una de las micotoxinas conocidas actualmente y que está en este caso es la zearalenona, considerada por algunos especialistas más como una hormona que como una toxina en sentido estricto.

Schipchandler (1975), en una revisión de la química de la zearalenona y sus derivados, discute el aislamiento, determinación de la estructura, propiedades químicas y físicas, síntesis total, biosíntesis y propiedades biológicas de estos compuestos. Con relación a la estructura, en el índice del Chemical Abstracts está clasificado como (S- (E))- 3, 4, 5, 6, 9, 10- hexa hidro- 14, 16- dihidroxil- 3- metil- 1H- 2- benzoxacicotetradecino. Urry et al. (1976), por medio de los métodos de la química clásica, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, establecieron que se trata de uno de los enantiomorfos del ácido resorcilico 6- (10- hidroxil- 6- oxotrans- 1- undecinilo- b- lactona. Fórmula C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>. Propiedades: cristales blancos; punto de fusión 164- 165°C; (α) = 170.5, c = 1.0 en metanol; UV máx. a 236 ( 29700), 274 ( 13909) y 316 um ( 6020); insoluble en agua pero soluble en álcalis acuosos, éter, benceno y alcoholes; tiene un grupo olefinico y uno cetónico, dos hidroxilos fenólicos y un grupo éster en una estructura B- resorciolato.

Con base en estudios cinéticos y de degradación, Steele et al. (1974) sugieren que la zearalenona se deriva del acetato vía ciclo de los poliquéticos ya que, de los varios precursores posibles, el acetato y el malonato fueron incorporados más fácilmente y el malonato parece inhibir la incorporación del acetato.

La importancia de la zearalenona se debe a que induce el llamado hiperestrogenismo en cerdos, problema relacionado con la ingestión de maíz mohoso. El hiperestrogenismo, según la definición de Mirocha et al. (1971), basados a su vez en la de Schoop (1956), consiste en una condición en el hombre y los animales, que generalmente se puede caracterizar por una o más de las siguientes situaciones: hinchamiento y enrojecimiento de la vulva, incremento en la secreción de la vagina, queratinización de las células

pavimentarias, prolapso de la vagina, metrorragia, incremento en la secreción y tamaño del útero, crecimiento y lactación de las glándulas mamarias, que puede presentarse tanto en animales inmaduros como ovariectomizados y en machos castrados. Estos problemas se pueden deber a un desbalance en la función o producción de estrógenos endógenos o a la ingestión o contacto con estrógenos vegetales.

El hiperestrogenismo en cerdos afecta primariamente al sistema genital; en las cerdas prepúberes la vulva se hincha y se hace edematosa, y en casos severos puede progresar hasta el prolapso rectal y vaginal; el útero se agranda, edematiza y se vuelve tortuoso; hay una atrofia general de los ovarios; las hembras preñadas pueden abortar. La infertilidad y restricción del tamaño de las camadas, así como la debilidad de los lechones, son parte del síndrome y el resultado es un descenso en la producción. Los machos jóvenes pueden sufrir efectos feminizantes con atrofia de los testículos y agrandamiento de las glándulas mamarias (Hirocha y Christensen, 1973).

A pesar de que existen reportes de hiperestrogenismo en cerdos desde hace mucho tiempo, el primero que relacionó esta condición con el consumo de maíz mohoso fue el de Mc Nutt et al. (1929), en el que definieron la localización geográfica del problema y describieron detalladamente la sintomatología. Durante su estudio no encontraron otros animales de granja con este problema, por lo que sugirieron que se trataba de una condición específica de los cerdos. A pesar de que la conclusión de su trabajo fue que el maíz enmohecido con el que habían alimentado a los cerdos era lo que estaba causando el problema, no pudieron responsabilizar de manera definitiva a los mohos por el envenenamiento desarrollado. Una condición similar fue reportada en Irlanda por McErlean (1952), asociada en este caso con cebada mohosa.

Con base en los informes de problemas genitales en cerdos alimentados con maíz mohoso, Stobb et al. (1962) investigaron la posible relación de microorganismos con este síndrome. En 1957 y 1958 observaron siete piaras bien separadas de cerdos con problemas de hiperestrogenismo, obtuvieron muestras del maíz dañado con el que habían sido alimentados en cada caso y aislaron y purificaron los microorganismos. Los predominantes fueron *Penicillium* spp., *Cladosporium* sp., *Mucor* spp. y *Gibberella* zeae. Estos mohos fueron usados para fermentar maíz molido y alimentar cerdos. Solamente nueve aislamientos de *Gibberella* zeae reprodujeron los síntomas, y cada uno de éstos indujo diferentes grados de actividad uterotrópica. También hicieron estudios de producción del principio tóxico y lograron su caracterización parcial. El extracto metabólico del metabolito exhibió una fluorescencia brillante azul-verdosa cuando fue expuesto a la luz ultravioleta, con picos de absorción en aproximadamente 237, 275 y 315 um.

En 1963, Christensen et al. (1965) usaron el alimento de una pira

afectada por el síndrome estrogénico para alimentar cuyes y ratas blancas destetadas, que desarrollaron úteros muy agrandados. En 1964 el síndrome apareció en otra piara, pero cuando se le quitó el alimento que había estado consumiendo, el problema desapareció. El grano usado para alimentar a estos animales, cuando se desarrollaron los síntomas, consistía de aproximadamente 30% de maíz muy enmohecido, proveniente de la cosecha de 1962 y que había permanecido en mazorca, expuesto a las condiciones ambientales desde la cosecha hasta fines de 1963, cuando fue desgranado y mezclado con maíz sano (30:70%). Esta mezcla fue usada para alimentar a una cerda; después de 10 días, el animal desarrolló mamas grandes, la vulva hinchada y edematosa y el útero muy agrandado. Algunos de los granos mohosos fueron molidos y usados para alimentar ratas blancas destetadas que también desarrollaron úteros muy agrandados. Con estos antecedentes, aislaron y purificaron los mohos de granos y alimentos y los usaron para inocular maíz y con éste hacer pruebas de producción del principio uterotrópico y de alimentación; probaron varios tiempos de incubación y varias temperaturas y establecieron como estándar un período de incubación de 2 semanas de 20 a 25°C seguido por 2 semanas a 12°C. Las pruebas de alimentación fueron con ratas blancas de 21 días, alimentadas ad libitum 5 a 21 días; (7 días para la mayoría). De los 85 aislamientos que obtuvieron, 40 fueron de *Fusarium* y 12 de éstos, especies comunes y de distribución amplia, fueron capaces de provocar el síndrome estrogénico. La mayoría de los aislamientos fueron *F. culmorum* o *F. graminearum*, ambos son parte del complejo *Gibberella zeae*. No encontraron diferencias culturales entre los aislamientos productores y no productores del compuesto estrogénico. Sin embargo, el tiempo y la temperatura de incubación influyeron mucho en la producción de este compuesto. Durante el proceso de extracción y caracterización encontraron dos compuestos: uno al que llamaron F-1, que fue ergosterol, y otro designado F-2, cuyas propiedades coincidían con el caracterizado por Stobb et al. (1962).

Mirocha et al. (1967) pudieron incitar la respuesta estrogénica al inyectar intramuscularmente desde 20 ug de la toxina F-2, y notaron estimulación del crecimiento en concentraciones bajas, de 20 a 40 ug. En un medio sólido de maíz produjeron hasta 3,500 ppm (mg/Kg) de F-2; encontraron que el compuesto es relativamente estable al calor e irradiación UV. Desarrollaron métodos de análisis que incluyen procedimientos de extracción, evaluaciones por espectrometría de absorción UV, cromatografía de capa fina y cromatografía gas-liquido.

Experimentalmente, Palusyk (1971) observó el síndrome estrogénico en cerdos alimentados con maíz inoculado con *F. graminearum* y Sharma et al. (1974), compararon el comportamiento estral y reproductivo de cerdas alimentadas con maíz mohoso contaminado de manera natural y aquél inoculado con *F. roseum*; no observaron el síndrome. Sin embargo, opinan que la ingestión de maíz inoculado con *F. roseum* parece conducir a un incremento en la mortalidad

embrionaria o fetal, que resulta en camadas más pequeñas.

Korpinen et al. (1972) encontraron, en condiciones experimentales, que de 14 aislamientos de *F. graminearum*, 11 pudieron inducir hiperestrogenismo, medido por el peso del útero, en ratas inmaduras. Los aislamientos del hongo fueron obtenidos de alimentos o granos sospechosos de causar la enfermedad; aquéllos provenientes de casos probables de aborto o infertilidad en cerdos fueron los que mostraron mayor efecto estrogénico en el experimento. También observaron que *F. graminearum* redujo la palatabilidad del alimento y que había claras diferencias entre los aislamientos.

Para investigar el metabolismo de la zearalenona en el hígado de rata, Kiessling y Peterson (1973), experimentaron *in vitro* principalmente con homogenados de hígado, pero también usaron microsomas y hepatocitos, encontraron que la zearalenona puede ser metabolizada por lo menos por dos vías principales: conjugación, con ácido glucurónico probablemente, que es la principal y reducción a un isómero, el zearalenol, catalizado por una deshidrogenasa hidroxisteroide dependiente de NADPH.

Durante el estudio de la distribución de la zearalenona marcada en los tejidos de todo el cuerpo de ratones por autorradiografía, Applegren et al. (1982) observaron que los ratones machos y las hembras ovariectomizadas y preñadas mostraron una excreción rápida de radiactividad en la bilis y la orina. Encontraron localización específica en órganos blanco de estrógenos, como el útero, las células intersticiales de los testículos y los folículos del ovario. A diferencia de los estrógenos naturales, la zearalenona y/o sus metabolitos no fueron encontrados en la corteza adrenal y en los bronquios. Detectar radiactividad en el fluido en las cavidades pleural y peritoneal sugiere un sitio adicional de acción de la zearalenona. En los ratones preñados la radiactividad se encontró solamente en los fetos de preñez tardía, principalmente en riñones, bilis y tejido conectivo.

El efecto de la zearalenona en aves también ha sido estudiado. En los gansos disminuye la ganancia de peso (Szépl et al. 1972); en gallinas ponedoras no tiene efecto en su comportamiento reproductivo (Marks y Bacon 1975); en pollos y codornices, el maíz contaminado con 1, 10 y 30 ppm (mg/kg) no tuvo efecto después de un periodo largo de ingestión, y tampoco tuvo efecto la zearalenona purificada (Bacon y Marks 1976). Los efectos estrogénicos de la zearalenona son mayores cuando es administrada en dosis múltiples que en una sola dosis y en dosis intramuscular que en dosis oral en pollos, aunque éstos son muy tolerantes (Chi et al. 1980).

Con la evidencia de que la ingestión de maíz mohoso, infestado de forma natural con *F. graminearum* Schwabe (estado anamorfo de *G. zeae* (Schw.) Patch.) afecta a los cerdos en los que induce por lo menos tres tipos de problemas: causa el síndrome estrogénico, provoca rechazo del alimento y emesis (Curtin y Tuite, 1966). Y

con la evidencia además de que *F. roseum* produce varias substancias interrelacionadas que pueden afectar a los animales de manera sinérgica, ya que el maíz contaminado con el hongo tiene peores efectos que la toxina sola, muchas inspecciones han sido realizadas hasta ahora. Así, Eppley et al. (1974) encontraron zearalenona en 17% de 233 muestras analizadas para determinar tanto esta micotoxina, como aflatoxinas y toxina T-2 en maíz colectado en la primavera siguiente al ciclo 1972 en áreas potenciales para una contaminación alta del maíz con *Fusarium* o en las que el daño causado por el hongo había sido reportado.

Stoloff et al. (1976) analizaron, para la detección de aflatoxinas y zearalenona, 315 muestras de maíz comercial y 57 obviamente dañadas, colectadas en 115 granjas y elevadores de zonas de USA cuya producción es superior a un millón de bushels. Encontraron una correlación geográfica; aflatoxinas en el sureste de los Apalaches y zearalenona en la franja maicera de EUA, llamada "corn belt", en 10% del maíz comercial de la región. Cuando encontraban una muestra contaminada proveniente de un establecimiento, la mayoría de las muestras del mismo también estaban contaminadas. No encontraron correlación entre contaminación y prácticas de almacenamiento ni pudieron relacionar la contaminación de las muestras obviamente dañadas con las muestras comerciales.

En Yugoslavia, Balzer et al. (1977), detectaron zearalenona en concentraciones de 0.043 a 40 ppm (mg/kg), en 2.6% de 191 muestras de maíz colectadas en elevadores, silos, establecimientos procesadores de alimentos y algunas de granjas de la región de Posavina en donde la enfermedad renal de los Balcanes es frecuente. Las muestras fueron colectadas en el otoño y primavera siguientes al ciclo 1975.

Botalico et al. (1977) obtuvieron muestras de maíz recién cosechado de la cosecha de 1976 en diferentes localidades de Europa y las analizaron para conocer las especies de *Fusarium* contaminantes, así como la presencia de zearalenona. *Fusarium graminearum* fue aislado de 18 de 24 muestras (75%), *F. moniliforme* de 13 (54%), *F. culmorum* de 4 (17%), y *F. tricinctum* de 3 (12%). La zearalenona fue encontrada en todas las muestras provenientes de Austria, 30 a 50 ng/g; en 1 de 4 de Yugoslavia, 20 ng/g; en 3 de 10 de Italia, 11 a 42 ng/g; no la detectaron en las muestras provenientes de Alemania ni en las de Hungría. También notaron que la zearalenona estaba contaminando algunas muestras infectadas con *F. graminearum* y nunca, en las infectadas solamente con *F. moniliforme*, incluso cuando las muestras provenían de mazorcas infectadas artificialmente, o aquellas intensamente infectadas (100%) en forma natural.

Botalico (1979), en Italia, reportó que la toxina no se encontraba en concentraciones peligrosas en los maíces estudiados sugiriendo que puede presentarse en maíz, en concentraciones bajas solamente cuando se producen lluvias prolongadas durante la maduración, lo

que facilita el crecimiento de *F. graminearum* en las mazorcas no cosechadas y cuando las temperaturas favorecen la síntesis de zearalenona. De las 9 especies de *Fusarium* que colonizan cereales en Italia, solamente *F. graminearum*, *F. culmorum* y, en mucho menor cantidad *F. moniliforme* producen zearalenona.

Gay (1982) manifestó que las investigaciones realizadas en las regiones productoras de maíz más importantes de Francia en 1973, 74, 78 y 79 pudieron encontrar cantidades pequeñas de zearalenona; esta contaminación se presentaba en el campo cuando el otoño era húmedo. En la época de la cosecha, los porcentajes detectados fueron bajos, pero se incrementaron durante el almacenamiento, especialmente en el caso de almacenamientos rurales en condiciones desfavorables.

Además del maíz, otros productos agrícolas pueden contaminarse en forma natural con zearalenona. Debido a una serie de reportes de enfermedad en cerdos, causada por la ingestión de cebada contaminada con *Gibberella saubineti*, Muncruk (1934) realizó experimentos con cerdos, pollos y cuyes; 40% de la cebada contaminada resultó desagradable e indujo vómito e intoxicación ligera en los cerdos.

Los estudios en paja en Minnesota, condujeron a Mirocha et al. (1968) a sugerir que la toxina F-2 es capaz de inducir infertilidad en ganado lechero.

Shotwell et al. (1977) muestrearon 120 lotes de trigo de Virginia, Carolina del Norte, el Sureste de Missouri, Sur de Illinois y Kentucky y 180 lotes de frijol soya de Virginia, Illinois, Iowa, Minnesota, Nebraska, Alabama, Arkansas y Texas para buscar aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenona, con el método múltiple de Eppley (1968). No detectaron ninguna de las tres toxinas buscadas en soya. En trigo, detectaron zearalenona en 19 de las 42 muestras provenientes de Virginia, la mitad de estos lotes fue muestreada debido a que estaban enmohecidos. Los niveles de zearalenona fueron de 0.36 a 11.5 ppm (mg/kg) y la identidad de la zearalenona fue confirmada por cromatografía de gases y espectroscopia de masas. La infección con *G. zeae* (6 a 60% de las semillas en las muestras probadas), fue detectada en todas las muestras contaminadas con zearalenona.

Shotwell et al. (1980) analizaron para aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenona, 197 muestras de sorgo cosechadas en 1975 y 1976 en 10 estados de la Unión Americana. En 56 muestras (28%) detectaron zearalenona en niveles de 100 a 6900 ng/g (límite de detección 100-200 ng/g). La identidad de la zearalenona fue confirmada en muestras representativas por cromatografía de gases y espectrometría de masas de los derivados trimetilsilano.

La contaminación natural del maíz con *G. zeae* se puede llevar a cabo en el campo, cuando el hongo induce en la mazorca, una de las

más importantes pudriciones para algunas regiones del mundo. Las pudriciones de mazorca son importantes en todas las regiones productoras de maíz, especialmente las húmedas y particularmente cuando la precipitación pluvial es mayor que la normal desde la época de la antesis hasta la cosecha.

La pudrición de mazorca inducida por *G. zeae* es de color rojizo y generalmente empieza en la punta de la mazorca; va pudriendo todos los granos al ir avanzando, pero rara vez invade toda la mazorca. El color rojizo se debe a la pudrición de los granos más que al color del micelio. En infecciones tempranas las hojas internas de la mazorca también se tiñen de color rojizo y el micelio hace que se adhieran a la mazorca. Es raro encontrar esporas del hongo en las mazorcas podridas, pero algunas veces se pueden encontrar en las hojas de la mazorca y en el pedicelo (KoeHLer, 1953). Las condiciones que favorecen esta pudrición son días fríos y húmedos durante tres semanas a partir de la antesis (Shurtleff, 1980).

*Gibberella zeae* (Schw.) Petch. (estado sexual de *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* "Graminearum": (Sin. *F. graminearum* Schw.) tiene peritecios negro azulescos, esféricos, superficiales. Ascosporas arregladas oblicuamente en una fila de 8 dentro del asca, hialinas, triseptadas, aguzándose uniformemente hacia las puntas, ligeramente curvadas, 3 a 5 x 20 a 30 um. Macroconidios hialinos, curvos y aguzados hacia las puntas, 3 a 5 septos, 4 a 6 x 30 a 60 um. Micelio blanco rosáceo en papa dextrosa agar. No produce microconidios. Algunos aislamientos producen clamidosporas (KoeHLer, 1953)

Cullen et al. (1982) clasificaron los aislamientos de *G. zeae* de granos de maíz infectados naturalmente en dos grupos basados en la morfología de las colonias en papa dextrosa agar (PDA). El tipo A, el más frecuente, es un hongo que crece rápidamente y produce colonias pigmentadas de rojo, con micelio aéreo abundante. En cultivo produce cantidades variables de zearalenona (1 a 433 mg/L) y en pruebas de campo es consistentemente patógeno. El tipo B, que es menos frecuente, 5% de los aislamientos, crece lentamente en PDA y desarrolla colonias apretadas amarillo-parduzcas. Las cepas no fueron patógenas pero produjeron niveles altos de zearalenona en cultivo, hasta 2.039 mg/L.

Las regiones en donde las condiciones ambientales favorecen que esta pudrición se presente con cierta regularidad están algo limitadas. En Kenya por ejemplo, ha sido reportada como un tipo de pudrición de mazorca corriente (Maher, 1933) mientras que en EUA, en general es más común en los estados de la costa del Atlántico (KoeHLer, 1953) aunque en algunos años puede ser común en la llamada franja maicera.

Además de incidencia y distribución regional de la pudrición de mazorca inducida por *Gibberella zeae* y de la zearalenona, aspectos de distribución de la toxina dentro del lote de material

contaminado han sido estudiados por varios autores. Shotwell et al. (1975), investigaron un calentamiento en un almacén del centro de Illinois en la que se había desarrollado *Aspergillus flavus*. Describen la localización de la mancha en el local y las condiciones del mismo. Detectaron zearalenona en algunas de las muestras y no la encontraron confinada en un sitio particular. De 140 granos individuales analizados para conocer la distribución de aflatoxinas en los mismos, en 12 detectaron zearalenona en concentraciones de 9,000 a 17,000 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). En ningún grano fueron detectadas ambas micotoxinas.

Para conocer la magnitud del problema de las micotoxinas es necesario conocer, no solamente la incidencia de las mismas en los diferentes productos, sino también los niveles a los que causan los efectos adversos en los animales, para esto, Shotwell et al. (1971) analizaron para aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenona, 233 muestras de maíz, incluyendo muestras de exportación de todos los grados en 10 puertos, encontrando zearalenona en 3 de 126 muestras de grado 3, 1 de 65 de grado 4 y 1 de 25 de grado SG. Para confirmar, hicieron estudios de absorbancia de luz UV y cromatografía de gases. Tuvieron problemas para confirmar 9 muestras sospechosas debido a interferentes en los extractos parcialmente purificados.

Con relación a producción de la zearalenona existen varios reportes. Eugenio et al. (1970) usaron 42 aislamientos de *F. roseum* provenientes de maíz en mazorca, colectadas en almacenes de Minnesota y Dakota del Sur y de alimentos que contenían maíz molido y 1 aislamiento del hongo obtenido de trigo; 12 de *F. tricinctum* y 5 de *F. moniliforme* también aislados de maíz; 2 de *F. nivale*, 2 de *F. oxysporum*, 1 de *F. solani*, 1 de *F. episphaeria*, 1 de *F. rigidusculum* y 1 de *F. lateritium*. Inocularon 100 g de arroz pulido con 1 g de suelo con el hongo. Las condiciones de incubación fueron 2 semanas a 22 a 25°C seguidos por 3 semanas en 3 a 12°C. También probaron el efecto del sustrato, condiciones ambientales y mezcla de cultivos. Usaron sustratos sólidos: arroz entero y pulido, maíz, trigo, cebada, avena, frijol soya y chícharo; los medios líquidos incluyeron: Czapek-Dox, Sabouraud y caldo de papa dextrosa, tanto la fórmula estándar como la adicionada con 1% de peptonas, 1% de extracto de levadura y 1% de sólidos de aguas de remojo de maíz solos o en combinación. El efecto del contenido de humedad fue determinado en maíz o arroz pulido esterilizado en autoclave. El efecto de la mezcla de cultivos fue determinado en maíz húmedo esterilizado en autoclave con los siguientes tratamientos; *F. roseum* y uno de los otros hongos, incubado 2 semanas en 22 a 25°C seguidos por 3 semanas en 3 a 12°C. Maíz inoculado con *F. roseum*, incubado 1 semana en 22 a 25°C, después inoculado con cualquiera de los otros hongos, mantenido 1 semana en 22 a 25°C y transferido a 3 a 12°C para una incubación adicional. Los 43 aislamientos de *F. roseum* produjeron zearalenona en cantidades diferentes, de 30 a 1,900 ppm del peso seco del sustrato, 7 de ellos en grandes cantidades; también encontraron que

las mejores condiciones para la producción fueron, un periodo de incubación de 2 semanas en 22 a 25°C seguido por un periodo a 15°C. Las mejoras sustratos son en orden decreciente: arroz, maíz y trigo, en avena se produce muy poca y no se produce en frijol soya ni en chícharo. Los mejores contenidos de humedad para la producción son 50 a 65% en arroz pulido antes de esterilizar y 45% en maíz.

Hacking et al. (1977) hicieron estudios micológicos de cebada de los ciclos agrícolas de 71, 73 y 74 en el momento de la cosecha. Los aislamientos de *Fusarium* fueron inducidos a producir zearalenona y reportan como especies productoras: *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. nivale* y *F. sambucinum var coeruumum*.

Sherwood y Peberdy (1974) establecieron condiciones limitantes de humedad del grano y temperatura de almacenamiento para el crecimiento de *Fusarium* y producción de zearalenona en maíz, trigo, cebada y avena. Todos los granos fueron susceptibles a la invasión por *Fusarium* cuando tenían contenidos de humedad superiores de 18%, incluso en temperaturas de 7°C. En el intervalo de 15 a 18% de contenido de humedad, el riesgo para el grano se incrementa. La producción máxima de zearalenona, 500 a 2000 um/kg, fue entre 12 y 18 °C a pesar de que el crecimiento micelial se redujo. A 25°C, cuando el crecimiento micelial fue más rápido y utilizó casi la totalidad del grano después de 2 meses, la producción de la toxina fue rara vez mayor de 100 um/kg. En otro experimento, trataron con diferentes ácidos orgánicos: fórmico, propiónico, butírico, para prevenir el crecimiento del hongo en trigo, en condiciones favorables para la producción de zearalenona; 31% CH del grano, incubado a 25°C durante 4 semanas y después 6 semanas a 12°C. Las condiciones críticas de todos los ácidos usados, solos o combinados, fueron de 1,000 a 10,000 ppm, equivalente a 0.1 a 1% con base en peso húmedo. A 1,000 ppm el hongo fue capaz de crecer y la producción de zearalenona no fue afectada, excepto cuando se usó ácido acético solo; en este caso, se registró mayor producción de la toxina.

Para determinar su capacidad para inhibir la formación de zearalenona en condiciones de laboratorio, Shannon et al. (1980) inocularon grano de 14 líneas y 4 híbridos de cruz simple de maíz con 45% CH, con 3 aislamientos de *Gibberella zeae*, incubaron 3 semanas a 25°C y después 2 semanas a 15°C. Opinan que los híbridos parecen ser menos resistentes que las líneas para soportar la formación de la zearalenona; en la línea H95 se produjo mayor cantidad de toxina que en las 13 restantes en las que la producción de la toxina no excedió 15 mg/kg.

Cullen et al. (1983), inoculando en el campo diferentes líneas e híbridos de maíz con *Gibberella zeae*, encontraron diferencias significativas de susceptibilidad entre las 4 líneas y dos cruces simples de maíz usadas, así como diferencias de patogenicidad de

los 2 aislamientos de *G. zeae* con los que inocularon; las concentraciones de zearalenona detectadas variaron de acuerdo con la línea de maíz y el aislamiento del hongo; el aislamiento menos virulento produjo relativamente más zearalenona en cultivo y en las mazorcas enfermas. Estos autores consideran que las estimaciones de la severidad de la enfermedad son buenas predictoras de contaminación con zearalenona y pueden ser útiles para la selección de líneas deseables en trabajos de mejoramiento.

#### Estudios preliminares.

Con el objeto de seleccionar la metodología del presente trabajo, fue establecido un estudio preliminar sembrando e inoculando, en el mismo campo experimental de la Universidad de Illinois en Urbana, Ill., las 13 líneas y dos híbridos de cruza simple de maíz considerados los más importantes por la amplia distribución de su uso en la región o por su susceptibilidad a las pudriciones de mazorca inducidas por *Gibberella zeae*.

#### Materiales y métodos.

##### Líneas e híbridos de maíz.

Las líneas usadas en este experimento fueron: A632, B37, B37o<sub>2</sub>o<sub>2</sub>, B37su<sub>2</sub>o<sub>2</sub>, B37wxwx, B73, H95, Ill90, Mo17, N6, N28, Oh43 y Va26, seleccionadas debido a su extenso uso en la selección de híbridos. Los subíndices se refieren a sus antecedentes; o<sub>2</sub> significa opaco, su<sub>2</sub> dulce y wx ceroso. Los híbridos de cruza simple A632 x Pa726 y B73 x Mo17 fueron seleccionados por su susceptibilidad a la pudrición de mazorca el primero y por su amplio uso en la región el segundo y los híbridos A619 x A632 y H95 x Mo17 fueron usados como controles sin tratamiento.

##### Inóculo.

Dos cepas conocidas por su capacidad para producir grandes cantidades de zearalenona, *Fusarium graminearum* Schwabe NRPL 3375 y NRRL 5864, de la colección de cultivos del Northern Regional Research Center, ARS, USDA, Peoria, Ill., la última depositada en esta colección por C.J. Mirocha y 5 aislamientos obtenidos en el campo por D.W. White fueron probados para determinar su capacidad

para producir zearalenona en las condiciones de este experimento, cuadro 1

Cuadro 1. Procedencia de los cultivos

cultivo	procedencia
1	Pudrición de tallo de maíz por Gibberella
2	Maíz de un lote causante de problemas estrogénicos en Illinois
3	Granos de maíz contaminados, colectados en el campo en Illinois
4	Granos de maíz contaminados, colectados en el campo en Illinois
5	
3375	Colección de cultivos NRRL
5864	Colección de cultivos NRRL

Cantidad y concentración del inóculo.

El inóculo usado para inocular los híbridos consistió de 2ml de una suspensión en agua (destilada, esterilizada) de 30,000 a 500,000 conidios/ml, pero en la mayoría de los casos fueron 200,000 conidios/ml (Cuadro 2). Para las líneas fue usada la cepa NRRL 5864, 200,000 conidios/ml.

Cuadro 2. Cultivos y concentración del inóculo usado para contaminar híbridos de maíz en el campo

cultivo	híbridos y concentración del inóculo (conidios/ml)	
	A632 x Pa752	B73 x Mo17
1	200,000	
2	200,000	200,000
3	100,000	200,000
4	100,000	30,000
5	a	20-30,000
NRRL 5864	55,000	
NRRL 3376	200,000 b	500,000 d

a= no inoculado.

b= muchos conidios germinados.

c= no en cultivo en esa ocasión.

d= micelio abundante, pocos conidios.  
el inóculo fue piezas de micelio

Inoculación.

El maíz fue sembrado a mano y cultivado siguiendo la rutinas comunes de la región. El inóculo fue incrementado en cultivos líquidos en agitación. Las líneas fueron inoculadas con una cepa de Gibberella conocida por su capacidad para producir grandes cantidades de Zeaxarlenona, NRRL 5864, y los híbridos con las 7 cepas ya descritas.

Periodo de inoculación.

Las líneas fueron inoculadas durante la antesis y los híbridos 10 días después.

Métodos de inoculación.

Las líneas fueron inoculadas siguiendo los siguientes métodos.

Inyección en un lado de la mazorca a través de sus hojas.

Aspersión en los estigmas y cobertura de la punta de la mazorca

con una bolsa de plástico.

En el caso de los híbridos, además de los anteriores, fue usado un tercer método: inyección en el raquis por la punta de la mazorca a través de los estigmas (canal de polinización).

En todos los casos fueron sembrados testigos sin tratamiento.

Diseño experimental.

Las líneas de maíz fueron sembradas en el campo con dos repeticiones de tres surcos cada una y los híbridos con tres repeticiones de dos surcos cada una (12 plantas por surco), en un diseño completamente aleatorio.

Análisis para la determinación de zearalenona.

El maíz fue dejado secar en el campo y cosechado a mano. Después de cosechadas, las mazorcas, producto de un rendimiento de 1 costal de mazorcas del híbrido A632 x Pa762 y 4 costales de todos los demás materiales, fueron desgranadas a mano y todas las repeticiones de la misma línea o híbrido, mezcladas y homogeneizadas en los laboratorios de micotoxinas del Northern Regional Research Center, ARS, USDA, Peoria, Ill. Todas las muestras así tratadas fueron consideradas como muestras de laboratorio y preparadas como tales.

Preparación de las muestras.

Las muestras de todas las líneas y del híbrido B73 x Mo17, fueron preparadas tomando en cuenta la distribución de las micotoxinas en los lotes de granos y nueces. El grano fue quebrado en un molino de disco, molido a un tamaño de partícula que pasase una criba del núm. 20 en un molino de martillos y la harina mezclada, para homogeneizar la distribución de la toxina, en una batidora planetaria con batidor plano durante 15 min. para evitar la estratificación que tiende a presentarse con este tipo de batidoras; todo esto, tomando en cuenta las sugerencias para muestreo y preparación de las muestras del capítulo 26 del libro de métodos oficiales de la AOAC (1984).

## Análisis químico.

El método seguido para el análisis fue el descrito por Eppley (1968) para aflatoxinas ocratoxinas y zearalenona y adoptado como oficial para zearalenona por la AOAC (1984), con una modificación que consiste en una partición del extracto purificado, con acetonitrilo, la cuantificación realizada en un densitómetro debido a que por comparación visual los resultados no eran consistentes cuando contrastados con aquellos obtenidos con la ayuda del densitómetro. La cuantificación de la zearalenona detectada en el material recién cosechado del híbrido A532 x Pa762, realizada por medio del densitómetro, fue además confirmada por cromatografía gas-líquido; esta confirmación también sirvió para comparar los valores resultantes y decidir el método de análisis y cuantificación para el resto de los experimentos.

## Fermentación.

A los granos del híbrido A632 x Pa762 les fue ajustado el contenido de humedad a 23% y fueron incubados a 15°C en agitación recíproca continua durante 6 semanas; cada semana, una porción fue analizada químicamente para conocer su concentración de zearalenona.

## Resultados y discusión.

Solamente en 5 de las 13 líneas fue detectada zearalenona en concentraciones diferentes para las diferentes líneas (cuadro 3); esto cuando sus mazorcas fueron inoculadas por el método de inyección; en los tratamientos de aspersión, no fue detectada la toxina, posiblemente debido a que al cubrir las mazorcas con una bolsa de plástico, ésta hizo efecto de invernadero y las temperaturas alcanzadas en el interior quemaron el inóculo. Lo anterior sugiere que las diferentes líneas tienen capacidades diferentes para aceptar la formación de zearalenona y seguramente para resistir la pudrición de mazorca inducida por *Gibberella* y que son factores genéticos los que intervienen, ya que por ejemplo, en el caso de B37 y N28 no fue detectada la toxina y son líneas relacionadas con la B73 en la que sí fue detectada.

Cuadro 3. Líneas de maíz contaminadas con zearalenona (mg/Kg)

línea	concentración
I1190	1.20
N6	0.87
Mo17	0.65
N28	0.52
S73	0.25

En el caso de los híbridos, en ambos fue detectada zearalenona cuando las mazorcas fueron inoculadas por el método de inyección por un lado de la misma, (cuadro 4) y los aislamientos 2 y 4 también la produjeron en el híbrido S73 x Mo17 cuando la inoculación fue hecha en el raquis por la punta de la mazorca; aislamiento 2, 0.774 mg/kg; aislamiento 4, 0.390 mg/kg; estos aislamientos, como se ve en el mismo cuadro 4, son los que produjeron mayores cantidades de la toxina cuando el método de inoculación fue una inyección en un lado de la mazorca que es el método más agresivo de todos los usados. No detectar zearalenona cuando la inoculación fue realizada por medio de aspersión en los estigmas, también se explica como en el caso de las líneas, por la desaparición del inóculo al ser quemado por las temperaturas alcanzadas en el interior de la bolsa de plástico con la que fueron cubiertos los estigmas después de inoculados.

Con relación a los aislamientos de Gibberella usados para inocular los híbridos, todos produjeron zearalenona en cantidades variables de acuerdo con el aislamiento y dos de los aislamientos recientes fueron capaces de producir mayores cantidades de la toxina que las cepas conocidas como altamente productoras (cuadro 4), esto significa que los aislamientos del hongo tienen capacidades diferentes para producir la toxina, independientemente de las variedades de maíz y sin considerar las posibles interacciones, ya que no fue hecho un análisis de varianza porque todas las repeticiones fueron mezcladas juntas.

Cuadro 4. Niveles de zearalenona detectados en híbridos de maíz recién cosechados, inyectados por un lado de la mazorca durante la antesis con diferentes cultivos de *F. graminearum*

híbrido	cultivo y niveles de zearalenona (mg/kg)						NRRL	NRRL
	1	2	3	4	5			
A632 x Pa726	37.48	36.80	14.00	10.20	22.20	0.74	0.88	
B73 x Mc17	a	25.22*	3.42	13.14	18.50*	0.31	2.81	

a= no material

\* en este híbrido y estos aislamientos produjeron zearalenona cuando inyectados con el inóculo por el canal de polinización.

El experimento de fermentación mostró que la producción máxima de zearalenona fue a las 4 semanas y a la 5, la cantidad de la toxina empezó a decrecer en el sustrato (cuadro 5).

Cuadro 5. Producción de zearalenona por diferentes cultivos de *F. graminearum*, en el híbrido A632 x Pa726 incubado a 15°C, con contenido de humedad del grano de 26%

aislamiento	zearalenona mg/Kg		
	0 semanas	4 semanas	5 semanas
1	37.4	39.0	31.5
2	36.8	133.0	156.0
3	14.0	68.0	89.0
4	10.2	49.6	77.3
5	22.2	156.0	107.0
NRRL 5864	0.764	12.6	1.2
NRRL 3375	0.875	10.2	5.2
control	ND	ND	ND

ND= no detectado.

Los resultados de cuantificación de la concentración de la toxina con los dos métodos probados, muestran que no hay diferencia entre la realizada por cromatografía de capa fina usando un densitómetro

para hacer las lecturas y aquella obtenida por cromatografía gas-liquido (cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de los valores de concentración de Zearalenona medidos por cromatografía de capa fina y leídos con densitómetro y por cromatografía de gases

métodos de determinación. Zearalenona mg/Kg		
muestra	densitómetro	cromatografía de gases
A	37.4	46.3
B	36.8	43.6
C	14.0	9.1
D	10.2	10.5
E	22.2	10.6

#### Estudios principales

#### Materiales y métodos.

Los métodos seleccionados se basaron fundamentalmente en los resultados del experimento preliminar que proporcionaron la información necesaria para hacer los ajustes y correcciones pertinentes en la selección de los materiales y en la aplicación de la métodos tanto en el campo como en el laboratorio.

#### Líneas e híbridos.

Las líneas usadas fueron: A632, B37, B37o.o., B37su.o., B37wxwx, B73, H95, I190, Mo17, N6, N28, Oh43, Oh545, Pa762 y Va26, que son las mismas usadas en el experimento preliminar, pero además fueron incluidas las líneas Oh545 y Pa762. Los híbridos usados fueron A632 x Pa762 que es uno de los usados en el experimento preliminar por su susceptibilidad a la pudrición de mazorca por G. zeae, y A619 x A632, en sustitución de B73 x Mo17.

Inoculación.

Inóculo.

Los aislamientos 2 y 4 del experimento preliminar, ahora las cepas NRRL 6206 y NRRL 6207, que mostraron su capacidad para producir grandes cantidades de zearalenona, fueron seleccionadas como inóculo. Las cepas fueron cultivadas en cajas de Petri con PDA, con un pH 6.5 a 7, y dejadas crecer 4 días a temperatura ambiente (23 a 25°C) a una distancia aproximada de 25 a 45 cm de un tubo de luz de da fluorescente, alternando 12 h prendido con 12 h apagado (Booth, 1971). La identificación y la nomenclatura seguidas en este experimento también están basadas en las proposiciones y sugerencias de Booth (1971).

Preparación del inóculo.

Los cultivos de cada una de las cepas fueron incrementados en cajas de Petri. De cada caja se obtuvo aproximadamente 1 cm cuadrado de medio con micelio y conidios, que fue macerado e inoculado de manera independiente en matraces Erlenmeyer con un medio líquido de carboximetilcelulosa, los que se mantuvieron en agitación recíproca continua durante 8 días para favorecer la producción de macroconidios (Capellini y Peterson, 1965). Después del período de cultivo, los conidios de cada cepa fueron contados y la suspensión diluida en agua destilada y esterilizada a 30,000 conidios/ml. Inmediatamente antes de la inoculación, cantidades iguales de las suspensiones de conidios de cada una de las cepas fueron mezcladas para inocular con esta mezcla de las dos cepas.

Cantidad y concentración del inóculo.

La cantidad de inóculo usado fue 2ml de una suspensión de 30,000 conidios/ml de la mezcla de las cepas de *F. graminearum* NRRL 6206 y NRRL 6207

## Métodos de inoculación.

Con base en los resultados del estudio preliminar, los métodos de inoculación fueron:

Aspersión en los estigmas y cobertura de los mismos con una toalla de papel húmeda y una cubierta repelente al agua en este caso una bolsa de plástico, para prevenir la desecación rápida del inóculo en los estigmas: sobre todo esto fue colocada una bolsa de papel de las usadas para polinización, con el objeto de proteger a los estigmas y la punta de la mazorca cubiertos con la bolsa de plástico, de ser quemados debido a las temperaturas prevaletientes durante el verano en esa zona de Illinois, lo que, en el estudio preliminar, posiblemente produjo efecto de invernadero en el interior de la bolsa de plástico. Toda la estructura permaneció sin ser tocada hasta la época de la cosecha.

Inyección por un lado de la mazorca.

En el caso de los híbridos, como en el estudio preliminar, fue usado un tercer método: inyección en el raquis a través de los estigmas, canal de polinización.

Se sembraron y cultivaron testigos para todas las líneas e híbridos, y en este último caso, también para los períodos de inoculación, con el fin de tener bien balanceado el diseño experimental seleccionado.

## Periodos de inoculación.

Las líneas fueron inoculadas durante la antesis. En el caso de los híbridos, estos fueron inoculados durante la antesis, 1, 2 y 3 semanas después, es decir, hubo 4 períodos de inoculación.

## Diseño experimental.

Tanto las líneas como los híbridos fueron sembrados en el mismo campo experimental de la Universidad de Illinois, en diseños de bloques al azar con las repeticiones como bloques. Se sembraron 12 plantas por surco, en surcos triples para las líneas y dobles para los híbridos; las repeticiones por tratamiento fueron dos para las líneas y tres para los híbridos. Durante el desarrollo del experimento, se perdieron unidades experimentales por falta de

polinización o porque los ratones se comieron dichas unidades (dos unidades por año, en el caso de las líneas); las unidades faltantes fueron estimadas y tomado en cuenta el sesgo hacia arriba que sufren los tratamientos, los grados de libertad correspondientes fueron restados tanto del error como del total, como lo establece la técnica para hacer el análisis de variancia (Steele y Torrie, 1980).

#### Cosecha.

El maíz se dejó secar en el campo y se cosechó a mano. Todas las mazorcas de todos los surcos de la misma repetición, de cada línea o híbrido y de cada tratamiento, fueron cosechadas juntas y desgranadas; los granos fueron mezclados y divididos en dos submuestras al hacer pasar la muestra por un divisor Boerner.

#### Análisis para Zearalenona.

#### Preparación de la muestra.

Cada submuestra fue preparada, quebrada y molida, y la harina mezclada y homogeneizada, siguiendo los métodos del estudio preliminar.

#### Análisis químico.

Como en el estudio preliminar, se siguió el método oficial para Zearalenona de la AOAC, y la cuantificación fue estimada por medio de un densitómetro. Debido a la gran cantidad de muestras, y por considerar que la preparación de las mismas fue hecha correcta y eficientemente, solamente se hicieron duplicados del análisis en los casos en los que el primer duplicado fue positivo; por otra parte, no todos los duplicados de cada análisis se corrieron en las placas de cromatografía lado a lado, sino de manera aleatoria para evitar sesgos durante la lectura y cuantificación. Para algunas de las muestras con demasiados pigmentos y grasas, después de la extracción fue realizado un proceso de purificación por el procedimiento reportado por Hagan y Tietjen (1975) y se continuó con la purificación en las columnas normales usadas para el procedimiento CB del libro de métodos de la AOAC (1984).

## Resultados y discusión.

En general, los resultados del presente trabajo muestran que el comportamiento de las distintas variedades de maíz es diferente con relación a su capacidad para aceptar la formación de zearalenona. De los métodos de inoculación usados, el más eficiente para satisfacer las necesidades del presente trabajo fue el de inyección por un lado de la mazorca. En estas condiciones, todas las líneas fueron capaces de aceptar la formación de la toxina aunque, como era de esperarse, en diferentes concentraciones; en los híbridos, los valores más altos también fueron detectados cuando se siguió este método de inoculación. Se supone que la presencia de la toxina en estos materiales, considerados como susceptibles en estas condiciones experimentales, depende de características genéticas de cada uno de los materiales. Además, esta suposición se sostiene por la presencia de zearalenona, en solamente cinco de las líneas sembradas en 1976 y dos de las sembradas en 1977 cuando el método de inoculación fue por aspersión, que de los métodos usados es el menos agresivo para la mazorca, y el que más se acerca a la inoculación natural, en las líneas no fue detectada la toxina (cuadros 7 y 14).

Cuadro 7. Líneas en las que se detectó zearalenona después de ser asperjadas con *G. zeae*

1976		1977	
línea	zearalenona mg/Kg	línea	zearalenona mg/Kg
N5	3.69	N6	1.90
Oh545	2.53	B37su <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.50
Oh43	0.64		
Pa762	0.38		
N28	0.37		

Las líneas en las que fue detectada zearalenona cuando el inóculo fue asperjado coinciden en general, aunque no exactamente, con aquellas en las que la concentración de la toxina fue más alta cuando fueron inoculadas por el método de inyección por un lado de la mazorca; el caso más notable es el de la línea Va26, en la que fue detectada una mayor concentración de zearalenona cuando la inoculación fue por inyección por un lado de la mazorca, en cada uno de los dos años que duró el experimento y en la que no se detectó la toxina cuando la inoculación fue por aspersión.

Las concentraciones de zearalenona para cada línea y en cada bloque del experimento de 1976, inoculadas por el método de inyección por un lado de la mazorca, se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Concentración de zearalenona en líneas de maíz inyectadas con G. zeae en 1976

línea	bloque 1 mg/Kg	bloque 2 mg/Kg
A632	0.49	a
B37	1.26	b
B37 <sub>0</sub> O <sub>2</sub>	2.62	1.68
B37 <sub>S</sub> U <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.01	7.95
B37 <sub>W</sub> X <sub>W</sub> X	1.92	1.35
B73	5.14	3.89
H95	2.02	3.53
I1190	11.38	5.37
Mo17	0.73	0.90
N6	14.06	11.68
N28	2.59	5.18
Oh43	9.79	4.47
Oh545	7.88	10.71
Pa762	9.35	21.36
Va26	18.85	24.22

a y b= unidades faltantes.

El análisis de varianza no detectó diferencias entre bloques, pero entre tratamientos fueron altamente significativas. Lo anterior evidencia que hay diferencias reales en el comportamiento de las diferentes líneas para aceptar la formación de zearalenona. Para determinar en dónde están esas diferencias, se realizó un

procedimiento general de contraste de medias, en este caso usando la prueba de intervalo múltiple de Duncan (Steel y Torrie, 1980), cuadro 9.

Cuadro 9. Contraste de medias de la concentración de zearalenona en diferentes líneas de maíz inyectado con *G. zeae* en 1976

zearalenona mg/Kg	líneas
0.82 a	Mo17
0.93 a b	A632
1.64 a b	B37wxwx
1.77 a b c	B37
2.15 a b c	B37o <sub>2</sub> o <sub>2</sub>
2.77 a b c c	H95
3.89 a b c c	N28
4.52 a b c c d	B37
6.63 a b c c d e	Oh43
8.38 a b c c d e	I1190
9.29 a b c c d e	Oh545
9.48 a b c c d e	B37su <sub>2</sub> o <sub>2</sub>
12.87 a b c d e f	N6
14.86 a b c d e f	Pa762
21.54 a b c d e f	Va26

los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes en el nivel de 5 % (Duncan 0.05)

Con base en las diferencias detectadas por el contraste de medias, se puede decir con un probabilidad 0.05, que las líneas más susceptibles a la formación de zearalenona en maíz en el campo, cuando son inoculadas con 2 ml de una mezcla de 30,000 conidios/ml de las cepas NRRL 6206 y 6207 de *G. zeae* por medio de una inyección por un lado de la mazorca son: Va26, Pa762 y N6, líneas que según el análisis estadístico son iguales entre sí. Un segundo grupo de susceptibilidad está formado por: B37su<sub>2</sub>o<sub>2</sub>, Oh545, I1190 y Oh43, que a su vez son iguales entre sí, y que no son diferentes de N6 y Pa762 pero sí de Va26, que es la más susceptible de todas. La línea más resistente es Mo17, incluida en un mismo grupo con A632, B37wxwx, B37, B37o<sub>2</sub>o<sub>2</sub>, H95, N28 e I1190, pero que es diferente de las otras que forman un segundo grupo, en el que Mo17 no está. En un tercer grupo de líneas resistentes están incluidas B37wxwx, B37,

B37c<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H95, N28, B73, Oh43, I1190, Oh545 y B37su<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las líneas B37, B73 y N28 son líneas relacionadas y la producción de la toxina en éstas fue baja; Va26 y Pa726 son líneas derivadas de una cruce con Oh43 y las dos primeras soportan niveles muy altos de la toxina. Ahora bien, Oh43 forma parte del grupo de líneas más resistentes pero, a su vez, también forma parte del segundo grupo de susceptibilidad. Todas las otras líneas tienen genotipos diferentes. El análisis de variancia de los datos del segundo año del experimento, 1977, cuadro 10, demuestra que no existen diferencias significativas entre los bloques, pero entre los tratamientos son altamente significativas al nivel de 1 %, esto es, las diferentes líneas se comportan de manera distinta en su capacidad para aceptar la formación de zearalenona por lo que fue realizada una prueba de contraste de medias de detectar en donde están estas diferencias, cuadro 11.

Cuadro 10. Concentración de zearalenona en diferentes líneas de maíz inyectadas con G. zeae en 1977

línea	bloque 1 mg/Kg	bloque 2 mg/Kg
A632	*	*
B37	0.59	1.64
B37c <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.01	a
B37su <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8.59	2.31
B37wxwx	1.20	2.84
B73	3.71	6.32
H95	3.66	8.07
I1190	b	13.24
Mo17	3.02	2.56
N6	21.32	15.13
N28	21.77	11.05
Oh43	8.94	8.12
Oh545	4.97	3.90
Pa726	10.25	14.23
Va26	21.80	19.87

a y b= unidades faltantes.

Cuadro 11. Contraste de medias de las diferentes concentraciones de zearalenona en líneas de maíz (cosecha 1977)

zearalenona	líneas
1.13 a	B37
1.44 a u	B37O <sub>2</sub>
2.02 a u	B37wxwx
2.84 a u	Mo17
4.44 a u	Oh545
5.02 a u	B73
5.45 a u	B37su <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5.87 a u	H95
8.53 u	Oh43
12.24 u	Pa762
13.24 u	I1190
16.41 u	N28
18.26 u	N6
20.64 u	Va26

Los valores seguidos por la misma letra son iguales entre si. Los valores con letras distintas, son diferentes al 5 %

Con base en los resultados de contraste de medias, se puede afirmar con 5 % de error que las líneas más susceptibles a la formación de zearalenona durante 1977 fueron Va26, N6, N28 e I1190, líneas cuyo comportamiento en este sentido son iguales entre si; a su vez, N6, N28 e I1190 son iguales a Pa762, que es diferente a Va26. La línea N28, que está en el primer grupo más susceptible, está relacionada con B37 y B73, que están en el grupo de las más resistentes a la formación de la toxina. Algún factor genético, combinado con las condiciones ambientales de ese año, debió hacerla comportarse de esta manera, ya que en el año previo la N28 se comportó como resistente y en un trabajo de fermentación (Shannon et al., 1980) también fue resistente, pues permitió la producción de niveles bajos de zearalenona. El análisis de variancia de los resultados de concentración de zearalenona, detectada en las diferentes líneas de maíz en los dos años que duró el experimento, muestra diferencias altamente significativas (0.001) en el comportamiento de las líneas para aceptar la formación de la toxina. El cuadro 12 muestra los resultados del promedio de la concentración de zearalenona en cada una de las líneas durante cada año. Para demostrar las diferencias entre tratamientos, detectadas por el análisis de variancia, se hizo un contraste de medias por el método de intervalo múltiple de Duncan (Steel y Torrie, 1980).

Cuadro 12. Niveles de Zearalenona en líneas de maíz inoculadas, por inyección por un lado de la mazorca, en el campo con una mezcla de dos cepas de *F. graminearum* (ciclos 1976-1977)

Líneas	Zearalenona en mg./kg	
	1976	1977
A632	0.49	1.33
B37	1.26	1.12
B37 <sub>0</sub> C <sub>1</sub>	2.15	2.01
B37SU <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.94	5.45
B37WXWX	1.64	2.02
B73	4.52	5.02
Oh95	5.65	5.56
IL190	6.38	13.24
Mo17	0.62	2.84
N6	12.37	13.23
N28	3.89	16.41
Oh43	6.63	3.53
Oh545	9.30	4.43
Pa762	14.86	12.24
Va26	21.54	20.84

El contraste de medias indica, con una probabilidad 0.05, que la línea más susceptible a la formación de la zearalenona, bajo las condiciones experimentales descritas durante dos años seguidos, es la Va26. Esto coincide con los resultados de los análisis realizados de manera independiente en cada uno de los dos años que duró el experimento; esta diferencia es más clara ya que esta línea es distinta a todas las demás. Las líneas N5, Pa762, IL190 y N28 forman un segundo grupo de susceptibilidad, y en un tercer grupo están las líneas Oh43, N28, IL190 y Pa762; Pa762 es derivada de Oh43, lo mismo que Va26, pero los niveles de susceptibilidad de Va26 son diferentes a los de Pa762 y Oh43 que son iguales entre sí (cuadro 13).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 13. Contraste de medias de la concentración de zearalenona (mg/kg) en diferentes líneas de maíz durante dos años continuos de inoculación con G. zeae

zearalenona	línea
1.18 a	A632
1.19 a b	B37
1.93 a b	B37wxwx
1.83 a b	Mo17
2.08 a b	B37o <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
4.77 a b c	B73
5.20 a b c c	B37eu <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5.71 t c c d d	H95
6.87 c c d d e e	Oh545
7.58 c c d d e e f	Oh43
10.15 d e e f f g	N28
10.81 e e f f g g	I1190
13.55 f f g g g	Pa762
15.55 g	N6
21.19 h	Va26

Los valores seguidos por la misma letra son iguales entre sí. Las letras distintas son diferentes al 5 % (Duncan 0.05).

Con excepción de los valores obtenidos para el híbrido A632 x Pa762, inyectado por el raquis durante la antesis en 1977, en el que se obtuvieron los valores más altos en comparación con los otros materiales del experimento, las concentraciones de zearalenona detectadas en los híbridos son aparentemente más bajas que aquéllas de las líneas, cuadro 14; esto puede deberse a algún factor de dominancia de las líneas resistentes que forman los híbridos probados en este experimento. La línea A632, que forma parte de ambos híbridos, es, de las probadas, una de las más resistente a la formación de la toxina. Lo anterior, sin embargo, no es demostrado estadísticamente debido a que no existen los valores comparables entre los dos tipos de materiales. Para los híbridos inoculados durante la antesis, siguiendo el método de inyección por un lado de la mazorca, no fue cosechado maíz, debido probablemente a que la inyección dañó la mazorca que se estaba formando y ésta no se desarrolló o por problemas de polinización; esta segunda posibilidad es factible ya que los dos híbridos incluyen en su genotipo a la línea A632 que también mostró problemas de polinización cuando fue sembrada sola. En 1977 no fue cosechado material de esta línea y en 1976 el rendimiento fue muy reducido. Para los híbridos no fue realizado un análisis de varianza incluyendo todos los tratamientos y sus diferentes niveles, porque en la mayoría de los casos no fue detectada la

toxina o no fue realizado el análisis químico, por falta de material, este es el caso de los dos híbridos inoculados por el método de inyección por un lado de la mazorca en los que no se cosechó material porque no se formaron los granos (cuadro 14)

Cuadro 14. Concentración de Zearalenona en dos híbridos de maíz inoculados con *G. zeae*, por 3 métodos de inoculación en 4 épocas diferentes

tratamiento			bloque					
			1976			1977		
H	P	M	I	II	III	I	II	III
AxA	0	i/l	*	*	*	*	*	*
		i/r	7.43	11.19	5.28	1.80	0.48	ND
		a	0.44	ND	0.28	ND	ND	ND
	1	i/l	3.69	3.70	4.23	1.49	ND	0.89
		i/r	ND	ND	ND	0.62	0.97	ND
		a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	i/l	0.58	0.65	0.91	1.34	1.85	ND
		i/r	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	i/l	0.21	0.35	0.26	0.39	0.91	ND
		i/r	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AxP	0	i/l	*	*	*	*	*	*
		i/r	10.59	9.69	13.29	31.29	37.52	ND
		a	0.51	1.81	ND	ND	ND	ND
	1	i/l	12.20	4.10	ND	2.34	4.42	ND
		i/r	0.51	0.54	ND	0.21	ND	ND
		a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	i/l	4.66	1.84	5.53	2.17	0.82	1.75
		i/r	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	i/l	0.74	0.97	ND	0.39	0.93	ND
		i/r	0.08	ND	ND	0.06	ND	ND
		a	ND	ND	ND	ND	ND	ND

H= híbridos: AxA= A632 x A619; AxP= A632 x Pa762

P= período de inoculación: 0= antesis; 1, 2 y 3= número de semanas después de la antesis.

M= método de inoculación: i/l= inyección por un lado de la mazorca; i/r= inyección por el raquis; a= aspersión.

ND= No detectada.

Cuando la inoculación fue realizada una, dos y tres semanas después de la antesis, por el método de inoculación por aspersión, no fue detectada zearalenona en ninguno de los dos híbridos durante los dos años que duró el experimento. Los niveles detectados para la época de antesis en 1976 son muy bajos, en una repetición del híbrido A632 x Pa762 fueron detectados 1.3 mg/kg, mientras que para la otra y para las dos repeticiones de A632 x A619, las concentraciones 0.28, 0.44 y 0.51 mg/kg respectivamente, son consideradas como trazas.

En el caso de la inoculación por medio de inyección por el raquis, en ambos híbridos fueron detectadas concentraciones altas de zearalenona cuando la inoculación fue durante la antesis; aparentemente el híbrido A632 x Pa762 es más susceptible que A632 x A619, sin embargo, el análisis de varianza no detecta diferencias significativas. Cuando la inoculación por este método fue realizada una semana después de la antesis, en los casos en los que fue posible detectar la toxina, las concentraciones son consideradas como trazas; para los otros periodos de inoculación no fue detectada zearalenona.

El análisis de varianza para el método de inoculación por medio de inyección por un lado de la mazorca en los diferentes periodos de inoculación, excluyendo la época de antesis para la que no hubo material, indica que para el híbrido A632 x Pa762 no hay diferencias significativas en su capacidad para aceptar la formación de la toxina; para el híbrido A632 x A619, el análisis de varianza sí detecta diferencias. El contraste de medias para saber en donde están esas diferencias, muestra que la concentración de zearalenona es significativamente mayor al 5 % en el material inoculado una semana después de la antesis que en los otros dos periodos que son iguales entre sí (cuadro 15).

Cuadro 15. Contraste de medias entre híbridos de maíz inoculados por inyección por un lado de la mazorca 1, 2 y 3 semanas después de la antesis

semanas	1	2	3
	3.87	0.72	0.31

los valores subrayados con la misma línea son iguales entre sí (Duncan 0.05)

## Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y analizados, podemos decir que, cuando se presenta la pudrición de mazorca inducida por *Gibberella zeae*, la zearalenona puede formarse en el campo, durante el desarrollo de los granos.

Los híbridos, aparentemente, son más resistentes que las líneas y las diferentes líneas tienen capacidades diferentes para soportar la formación de zearalenona.

En los casos de líneas relacionadas entre sí, la resistencia y susceptibilidad de las mismas, debe estar regulada por factores genéticos.

### Literatura citada

- Applegren, L.E., R.G. Arora, y P. Larson. 1982. Autoradiographic studies of (3H) zearalenone in mice. *Toxicology* 25: 243- 253.
- Association of Official Analytical Chemists. 1984. *Official Methods of Analysis* 14th. Edition. AOAC Arlington.
- Bacon, C.W. y H.L. Marks. 1976. Growth of broilers and quail fed Fusarium (Gibberella zeae) infected corn and zearalenone (F-2). *Poultry Science* 55: 1531- 1535.
- Balzer, I., C. Bogdanic y S Muzic. 1977. Natural contamination of corn (Zea mais) with mycotoxins in Yugoslavia. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 425- 430.
- Botalico, A. 1979. On the occurrence of zearalenone in Italy. *Mycopathologia* 67: 119- 121.
- Botalico, A., S. Frisull y V. Piglionica. 1977. Survey of freshly harvested maize from some European localities for Fusarium spp. and zearalenone. in 1976. *Phytopath. Medit.* 16 142- 144.
- Booth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. CMI. Kew, Inglaterra.
- Caldwell, R. W. y J. Tuite. 1970. Zearalenone production in field corn in Indiana. *Phytopathology* 60: 1695- 1697.
- Caldwell, R. W. y J. Tuite. 1974. Zearalenone on freshly harvested corn. *Phytopathology* 64: 752- 753.
- Capellini, R.A. y J.L. Peterson. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a nonsporulating strain of Gibberella zeae. *Mycologia* 57: 962-966.
- Chi, M.S., C.J. Mirocha, G.A. Weaver y H.J. Kurtz. 1980. Effect of zearalenone on female white Leghorn chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1026- 1030.
- Christensen, C.M., G.H. Nelson y C.J. Mirocha. 1965. Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from Fusarium. *Appl. Microbiol.* 13: 653- 659.
- Cullen, D., R. W. Caldwell y E. B. Smalley. 1982. Cultural characteristics, pathogenicity, and zearalenone production by strains of Gibberella zeae isolated from corn. *Phytopathology* 72: 1415- 1418.
- Cullen, D., R.W. Caldwell y E. B. Smalley. 1983. Susceptibility of maize to Gibberella zeae ear rot: Relationship to host genotype, pathogen virulence, and zearalenone contamination. *Plant Disease*:

57 89-91.

Curtin, T.M. y J. Tuite. 1986. Emesis and refusal in swine associated with *Gibberella zeae*-infected corn. *Life Sciences* 5:1937-1944.

Eppley, R. M. 1963. Screening method for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin. *Journal of the AOAC* 51: 74-78.

Eppley, R. M., L. Stoloff, M. W. Trucksess y C. W. Chung. 1974. Survey of corn for *Fusarium* toxins. *Journal of the AOAC* 57: 632-635.

Eugenio, C. P., C. M. Christensen y C. J. Mirocha. 1970. Factors affecting production of the mucotoxin F-2 by *Fusarium roseum*. *Phytopathology* 60: 1055-1057.

Forgacs, J., W.T. Carll. 1962. Mycotoxicoses. *Adv. Vet. Res.* 7: 273-382. Gay, J. P. 1982. The action of mycotoxins on french corn. en: Inglett, G. E. (Ed.). *Maize. Recent Progress in Chemistry and Technology!* Academic Press. Nueva York. pp 91-94.

García-Aguirre, G. 1983. Estudios preliminares sobre formación de zearalenona en maíz en el campo. En: E. Moreno y M. Ramírez (comp.) *Memorias del coloquio internacional sobre conservación de semillas y granos almacenados.* Oaxtepec, Mor. Méx. octubre 20 a 25, 1980.

Hagan, S.H. y W.H. Tietjen. 1975. A convenient chromatographic cleanup procedure for screening several mycotoxins in oils. *Journal of the AOAC* 58:620-621.

Hesseltine, C. 1974.

Irving Jr., G.W. 1971. Aflatoxin research. A review of agricultural research service studies. *ARS* 20-17: 1-12.

Kiessling, K. H. y H. Patterson. 1978. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 43: 285-290.

Koehler, B. 1959. Corn ear rots in Illinois. *Bull.* 639. Illinois Agricultural Experimental Station. pp 14.

Korpinen, E.L., K. Kallela y Y. Ylimaki. 1972. Estrogenic activity of *Fusarium graminearum* on rats in experimental conditions. *Nord. Vet.- Med.* 24: 62-66.

Frogg, P. 1977. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. *Pure Appl. Chem.* 49: 1719-1721.

Malher, C. 1931. Ear rots and root rots in maize in Kenya and some suggestions for their control. *Kenya Dept. Agr. Bul.* 5.

- Marks, H.L. y C.W. Bacon. 1976. Influence of Fusarium- infected corn and F-2 on laying hens. *Poultry Science* 55: 1864- 1870.
- McErlean, B.A. 1952. Vulvovaginitis in swine. *Vet. Rec.* 64:539-540.
- McNutt, S.H., P. Purwin y C. Murray. 1923. vulvovaginitis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 73: 494-492.
- Mirocha, C.J. 1960. Fusarium toxins in corn. En *Memorias del Coloquio Internacional sobre Conservación de Semillas y Granos*. E. Moreno y M. Ramirez (compiladores). Oaxtepec, Mor. Méx.
- Mirocha, C.J. y C.M. Christensen. 1974. Fungus metabolites toxic to animals. *Ann. Rev. Phytopath.* 12: 303- 320.
- Mirocha, C.J. 1976. Mirocha, C.J., C.M. Christensen y G.H. Nelson. 1967. Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn. *Appl. Microbiol.* 15: 497-503.
- Mirocha, C.J., C.M. Christensen y G.H. Nelson. 1971. F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. En *Microbial Toxins*, ed. S. Kardis, A. Ciegler y S.J. Ajl. vol. 7 pp 107- 138.
- Mirocha, C.J., J. Harrison, A.A. Nichols y M. McClintock. 1968. Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* 16: 797- 798.
- Mundruk, B.B. 1934. Some preliminary experiments with scabby barley. *Phytopath.* 24: 1237- 1243.
- Nelson, G.H., C.M. Christensen y C.J. Mirocha. 1973. Fusarium and estrogenism in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163: 1276-1277.
- Palyusik, M. 1971. Experimental swine fusariotoxicosis (vulvovaginitis) induced with *Fusarium graminearum*. *Comptes rendus des communications V Congrès de la Société Internationale de Mycologie Humaine et Animale*. pp. 297- 303.
- Schoop, G. 1958. *Proc 3rd. Intern. Congr. Animal Reprbd., Artif. Insem., Cambridge, Engl., 1956* p 97.
- Schuller, P.L., H.P. van Egmond y L. Stoloff. 1983. Limits and regulations on mycotoxins. *Proc. Int. Symp. Mycotoxins* pp. 111-129.
- Shank, R. C. 1976. The role of aflatoxin in human disease. En: *Rodricks J. V. (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*. *Adv. Chem. Ser.* 194. Amer. Chem. Soc. pp31- 57.
- Shannon, G.M., G.L. Shotwell, A.J. Lyons, D. J. White y G. García-Aguirre. 1980. Laboratory screening for zearalenone formation in corn hibridas and inbreds. *Journal of the AOAC* 63: 1275- 1277.

- Sharma, V.W., R.F. Wilson y E.L. Williams. 1974. Reproductive performance of female swine fed corn naturally molded or inoculated with *Fusarium roseum*, Ohio isolates band Can. J. Animal Science 38: 598- 602.
- Sherwood, R. F. y J. F. Peberdy. 1974. Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grains. Grain storage at reduced temperatures. J. Sci. Fd. Agric. 25: 1031-1087.
- Sherwood, R. F. y J. F. Peberdy. 1974. Production of the mucotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. II Treatment of wheat grain with organic acid. J. Sci. Fd. Agric. 25: 1093- 1093.
- Shipchandler, M.T. 1975. Chemistry of zearalenone and some of its derivatives. Heterocycles 3: 471-520.
- Shotwell, O. L., G. A. Bennett, M. L. Goulden, R. D. Plattner y C. W. Hesseltine. 1990. Survey for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin in U.S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. Journal of the AOAC 63: 923- 926.
- Shotwell, O. L. C. W. Hesseltine, E. E. Vandegrift y M. L. Goulden. 1971. Survey of corn from different regions for aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. Cereal Science Today 16: 226- 273.
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden, G. A. Bennett, R. D. Plattner y C. W. Hesseltine. 1977. Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone and ochratoxin. Journal of the AOAC 60: 1977-
- Shotwell, O. L., M. L. Goulden, R. J. Bothast y C. W. Hesseltine. 1975. Mycotoxins in hot spots in grains. I Aflatoxin and zearalenone occurrence on stored corn. Journal of the AAC 52: 687-697.
- Shotwell, O.L, C.W. Hesseltine y M.L. Goulden. 1973. Incidence of aflatoxin in southern corn, 1969-1970. Cereal Science Today 18: 192-195.
- Shurtleff, M. (Ed.). 1980. Compendium of Corn Diseases. Amer. Phytopath. Soc. pp.45, 52.
- Steel, R.G., J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 2<sup>o</sup> Ed. McGraw-Hill Book Co. Nueva York.
- Steele, J.A., J.R. Lieberman y C.J. Mirocha. 1974. Biogenesis of zearalenone (F-2) by *Fusarium roseum* "Graminearum". Can. J. Microbiol. 20: 531-534.

Stobb, M., R.S. Baldwin, J. Tuite, F.F. Andrews, K.G. Gillette. 1962. Isolation of an anabolic uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature* 196: 1318. Stoloff, L. 1979. The three eras of fungal toxin research. *Journal of the AOAC* 56: 764-78.

Stoloff, L., S. Henry y O. J. Francis Jr. 1976. Survey for aflatoxins and zearalenone in 1973 crop corn stored on farms and in country elevators. *Journal of the AOAC* 59: 118- 121.

Szep, I., M. Palyusik, A. Szabo y L. Vass. 1962. Effect of *Fusarium graminearum* on young geese. *Kulonlenyomat az Agrartudományi Egyetem* 35-39.

Tuite, J., G. Shanner, G. Rambo J. Foster y R.W. Caldwell. 1974. The *Gibberella* ear rot epidemics of corn in Indiana in 1965 and 1972. *Cereal Sci. Today* 19: 238- 241.

Urry, W.H., H.L. Wahrmeister, E.B. Hodge, P.H. Hidy y G.h. Jones. 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters* 27: 3109-3114.

Zuber, M. S., O. H. Calvert, E. B. Lillehoj y W. F. Kwolek. 1976. Preharvest development of aflatoxin B1 in corn in the United States. *Phytopathology* 66: 1120- 1121.