

MOVILIDAD DE *ASPERGILLUS FLAVUS* LINK EX FRIES EN MAZORCAS DE CINCO GENOTIPOS DE MAÍZ (*ZEA MAYS* L.) EMPLEANDO TRES METODOS DE INOCULACION

Néstor Villalobos
German Rivera
Carlos Araya
Fabio Blanco

Escuela de Ciencias Agrarias.
Universidad Nacional. Heredia,
Costa Rica.

RESUMEN

Tres técnicas para evaluar la reacción de los granos de maíz a la infección causada por *A. flavus*, fueron probadas en cinco diferentes genotipos bajo condiciones de campo. Las inoculaciones se realizaron 20 días después del 50 % de la floración, usando 0.5 ml. de una suspensión de 10^5 conidios por mililitro; los métodos fueron: a) inyección de pequeñas cantidades de inóculo en cada grano de una hilera vertical (M_1); b) inyección en los primeros granos bien desarrollados alrededor de la parte superior de la mazorca (M_2); c) inyección del inóculo en un semicírculo de granos en la base de la mazorca (M_3). Dos semanas después de la inoculación, las mazorcas fueron cosechadas y los granos no heridos fueron separados de acuerdo con su posición respecto de los que recibieron el inóculo. Luego se esterilizaron superficialmente y se cultivaron sobre PDA, para determinar el porcentaje de infección. Los métodos M_1 y M_2 fueron los más eficientes porque produjeron altos niveles de infección. Sin embargo M_1 es considerado como el mejor, debido a que provee mayor número de granos para procesar y es el más sencillo. No hubo diferencias estadísticas significativas entre los genotipos, pues en todos ellos hubo igual movilidad del hongo inoculado.

ABSTRACT

Three inoculation techniques for evaluating reaction of corn to kernel infection by *Aspergillus flavus* were tested in the field on five different genotypes. Inoculations were made 20 days after mid-silk stage, using 0.5 ml. of 10^5 conidial suspension. The methods were: a) injection of small amounts of inoculum in each kernel of a vertical row (M_1); b) injection in the first well developed kernels around the top part of the ear (M_2); c) injection of inoculum in the kernels at the lower part of the ear, forming a semicircle (M_3). Two weeks after inoculation ears were harvested, and kernels not wounded were separated according to its position to the inoculated kernels, then surface sterilized and plated on PDA, to determine the infection percentage. M_1 and M_2 were found very efficient because they produced higher infection levels. M_1 is considered the best because it provided a larger number of kernels for assay and was easy to use. No statistical difference was found among genotypes.

INTRODUCCION

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los granos básicos más importantes en Costa Rica, porque co-

mo el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.), forma parte esencial de la dieta del costarricense (Monge, 1981).

En los últimos años la producción de este grano no ha logrado satisfacer la demanda del mercado nacional, por lo que ha sido necesario importarlo en considerables cantidades para solventar tal deficiencia. Esto ha hecho que se multipliquen los esfuerzos por mejorar la productividad, utilizando la tecnología generada a través de varios años de investigación (Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1982).

Sin embargo, los estudios sobre la patología poscosecha del maíz son muy escasos y han brindado hasta el momento una limitada cantidad de información (Fernández, 1982; Quesada, 1983). Según algunas organizaciones, a nivel mundial, ésta ha sido la trayectoria histórica de los principales granos que se consumen en el mundo (FAO, 1977). De tal modo que en los países en vías de desarrollo, muchas veces, a pesar de lograr buenos rendimientos, se dan pérdidas poscosecha que anulan el esfuerzo realizado.

La necesidad de reducir el deterioro de productos después de la cosecha, ha tomado gran importancia en la actualidad y ha determinado que la reducción de estas pérdidas se reconozca como la forma económicamente más factible y expedita de incrementar la oferta mundial de productos alimenticios (Lieberman, 1983). En nuestro país, a pesar de que no existen datos oficiales sobre pérdidas poscosecha en maíz, el Consejo Nacional de la Producción realiza grandes esfuerzos para evitar las condiciones propicias al deterioro causado por hongos. El hongo al que se presta mayor atención es *Aspergillus flavus* Link ex Fries, pues según un estudio de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, éste es el principal organismo que afecta los granos almacenados en Costa Rica y otros países del área (FAO/OMS/PNUMA, 1977).

La importancia del hongo estriba en la putrefacción y decoloración del grano, así como la capacidad de producir sustancias cancerígenas sumamente tóxicas llamadas aflatoxinas (Christensen, 1985). La producción de estos compuestos puede iniciarse en el campo, poco después de la penetración del hongo (King y Scott, 1982) y se aumenta durante el almacenamiento cuando no hay un buen control de humedad, temperatura y aireación. Esto obliga a desechar el producto, pues se transforma en una amenaza para la salud humana y animal (Christensen y Kautman, 1976).

Entre las estrategias recomendadas por varios autores (Calvert et al, 1978; Jones et al, 1980; King y Scott, 1982) para el combate de *A. flavus*, está la búsqueda de material genético resistente, pues es la forma más eficaz, económica y segura de proteger el grano. En este sentido se han realizado dos trabajos en el país (Fernández, 1982; Quesada, 1983), tratando de encontrar una forma confiable de evaluar el material genético con que contamos. Sin embargo, no se han realizado pruebas en las que se evalúe la movilidad del hongo como indicador de resistencia en la mazorca.

El objetivo que persigue esta investigación, es determinar la efectividad de tres métodos de inoculación, midiendo la movilidad del micelio de *A. flavus* a partir del punto de inoculación artificial.

MATERIALES Y METODOS

Trabajo de campo

Las parcelas de maíz se establecieron el 10 de febrero de 1984, en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, de la Universidad de Costa Rica, ubicada en Barrio San José, provincia de Alajuela, con una altitud de 840 m. sobre el nivel del mar, precipitación y temperatura promedio anual de 1964.2 mm. y 22,4°C, respectivamente (Costa Rica, Instituto Meteorológico Nacional, 1983).

El material genético utilizado fue: las variedades Tico V-1 "M" y los Diamantes 8043; los híbridos X 104 A, X 107 A y la F₆ correspondiente al cruce entre la variedad mejicana Nuevo León V-S-1-e y Tico H₅.

Los métodos de inoculación que se utilizaron en el trabajo fueron los siguientes: en el primero (M₁), se abrieron las brácteas de un lado de la mazorca y se escogió una hilera vertical de granos, sobre la cual se distribuyó homogéneamente el inóculo, inyectando pequeñas proporciones de él en cada grano. En el segundo (M₂), se abrió la mazorca y se inyectó el inóculo distribuyéndolo en el primer anillo bien formado de granos en la parte superior. En el tercero (M₃), se abrieron por completo las brácteas y se inyectó el inóculo en un semicírculo de granos ubicado en la base de la mazorca. Los tratamientos cuarto, quinto y sexto correspondieron a los testigos respectivos de M₁, M₂ y M₃.

La inoculación se realizó 20 días después del 50 % de la floración, por ser ésta la edad más propia para este proceso (King y Scott, 1982). La aplicación del inóculo se hizo utilizando una aguja hipodérmica de 1,0 ml. de capacidad, para aplicar 0.5 ml. de una suspensión de 1×10^5 conidios por mililitro, concentración recomendada por King y Scott (1982). En el caso de los testigos se aplicó agua destilada estéril (igual volumen). Una vez tratadas las mazorcas, se cubrieron de nuevo con las brácteas, las cuales se sujetaron con bandas de hule. La cosecha de ellas se efectuó 15 días después de la inoculación y se llevaron al laboratorio para su análisis.

El experimento fue un factorial cinco por seis en el que el primer factor estuvo constituido por los cinco genotipos y el otro por tres métodos de inoculación y sus respectivos testigos.

El diseño experimental siguió un esquema de parcela dividida con cuatro repeticiones, donde los genotipos fueron asignados a las parcelas grandes y los tratamientos de inoculación a las pequeñas. Cada parcela estuvo formada por un surco de 40 plantas y en la parte central de cada uno, se seleccionaron diez para aplicarles el tratamiento respectivo en la mazorca superior.

Trabajo de laboratorio

El inóculo se preparó a partir de un aislamiento puro de *A. flavus*, obtenido del departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Missouri. Este hongo se cultivó en placas de Petri con papa-dextrosa-agar (PDA) y se mantuvo durante diez días en la oscuridad de 28°C con el fin de obtener un óptimo crecimiento (Fernández, 1982). Luego, a dos de los cultivos mejor desarrollados se les extrajeron los conidios agregándoles agua estéril con 0,1 % de Tween 20, que actuó como dispersante. La suspensión así obtenida, se transfirió a un frasco erlemeyer de 1.000 ml. y se diluyó agregándole agua destilada estéril. Para homogenizarla se empleó un agitador magnético y conforme se diluía, se tomaron muestras sucesivas para realizar el conteo de conidios en una cámara de contaje con rayado de "Newbawer" de 9 mm² (hematocímetro). Este procedimiento se repitió hasta lograr la concentración de conidios requerida para la inoculación.

El análisis practicado en las mazorcas cosechadas se hizo de la siguiente manera: a cada una se le eliminó las brácteas y los granos inoculados. Luego, para poder observar la movilidad de *A. fla-*

vus hacia los granos adyacentes, se procedió a separarlos según su posición respecto de aquellos donde se aplicó el hongo. Así en el primer método, se consideró como posición uno a los granos que estaban en la primera hilera a la derecha de la inoculada, la siguiente se designó como posición dos y así sucesivamente hasta la posición cuatro. En el segundo método se desgranaron separadamente cuatro anillos sucesivos de granos, en forma descendente a partir de los que recibieron el inóculo, denominándose como posición uno al primero y dos, tres y cuatro a los siguientes. Para el tercer método se siguió un procedimiento similar, desgranándose cuatro semicírculos ascendentes, denominando cada uno según su posición respecto del semicírculo inoculado.

Para determinar la infección del hongo se seleccionaron muestras al azar de 50 granos por cada posición y se colocaron en una estufa regulada a 32°C, por tres días. Una vez secas, se pasaron a bolsas de papel y se almacenaron en frascos con silicagel a 10°C, hasta que se efectuaron los cultivos sobre PDA.

El procedimiento del cultivo fue el siguiente: cada muestra fue desinfectada superficialmente sumergiéndola durante tres minutos en hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5 %, luego se lavó dos veces consecutivas en agua destilada estéril. Después en la cámara de transferencia, se procedió a colocar los granos en placas de Petri con PDA sólido y acidificado con dos gotas de ácido láctico al 25 %. Finalmente se incubó cada cultivo por cinco días a 25°C, al cabo de los cuales, se determinó el número de granos con *A. flavus* y otros hongos que normalmente se establecen en la mazorca.

Tomando en cuenta que cuando se inocula *A. flavus* bajo condición de campo, generalmente éste aparece acompañado por otros hongos comunes en la mazorca, se estudiaron dos variables: a) número de granos infectados sólo por *A. flavus* y b) número de granos infectados por *A. flavus* y otros hongos. Para cada variable se efectuó la prueba de Waller-Duncan y análisis de contrastes.

RESULTADOS

Al comparar los métodos de inoculación por la prueba de Waller-Duncan cuando hubo infección sólo por *A. flavus* (Cuadro 1), se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos y las de sus testigos; pero además de esto se puede apreciar que los tratamientos

CUADRO 1

NUMERO PROMEDIO DE GRANOS INFECTADOS POR *A. FLAVUS* EN CADA UNO DE LOS METODOS DE INOCULACION UTILIZADOS EN EL ENSAYO, CON BASE EN 50 GRANOS ANALIZADOS

TRATAMIENTO	POSICION 1	POSICION 2	POSICION 3	POSICION 4
M ₁	34,40 a b (1)	36,00 a	37,70 a	32,80 a
M ₂	35,60 a	33,65 a	35,20 a	30,90 a
M ₃	30,00 b	26,95 b	27,45 b	29,65 a
M ₄	10,85 c	10,95 c	10,65 c	8,70 b
M ₅	9,15 c	8,85 c	10,15 c	9,90 b
M ₆	10,95 c	8,35 c	11,15 c	10,40 b

(1) Promedios con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes según prueba de Walker-Duncan (Razón K = 100).

M₁ y M₂ mostraron los promedios de infección más altos sin tener diferencias estadísticamente significativas entre ellos para ninguna de las posiciones, lo que los coloca en similar nivel de eficiencia. El tratamiento M₃ tuvo promedios de infección menores que los otros en todas las posiciones y presentó diferencias significativas con al menos uno de ellos en las tres primeras posiciones de los granos.

La prueba de Waller-Duncan (Cuadro 2), aplicada a los promedios de infección con *A. flavus* y otros hongos presenta algunas diferencias respecto de lo observado en el cuadro anterior. Al comparar los métodos de inoculación con los testigos correspondientes se observan diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los casos, excepto para el tercer método que en todas las posiciones brindó datos estadísticamente similares al testigo respectivo. También este método que había mostrado en el Cuadro 1 promedios de infección inferiores a los métodos M₁ y M₂, en este caso tiene valores que no son significativamente diferentes, pero que muestran la tendencia a ser inferiores respecto de los otros dos.

Al comparar los cinco genotipos se encontró que las diferencias entre los promedios de infección correspondientes no fueron significativos ($P \leq 0.05$) en las dos variables estudiadas. Sin embargo, la F₆ del cruce entre Nuevo León V-S-1-e y Tico H₅, mostró una tendencia a producir menores promedios de infección.

Entre los géneros de hongos diferentes al inoculado, el más importante fue *Fusarium* sp. El Cuadro 3 presenta un análisis de la relación que tu-

vo éste con la manifestación a *A. flavus* en los granos analizados. Los restantes hongos, debido a su baja frecuencia, se agruparon como una sola unidad, bajo el rubro "otros". Al analizar los promedios de infección del hongo inoculado en relación con *Fusarium* sp. y la micoflora restante se observa que cuando se aplicó *A. flavus* (M₁, M₂ y M₃) el número de granos infectados exclusivamente por él, predomina sobre las otras posibilidades de infección. Sin embargo, en los testigos (M₄, M₅ y M₆) los promedios de infección causada solo por *A. flavus* bajaron y fueron superados por la infección conjunta de *A. flavus* y *Fusarium* sp. Del mismo modo, las infecciones por *Fusarium* sp. y *A. flavus* más otros hongos, tuvieron un incremento considerable.

DISCUSION

Tradicionalmente se ha utilizado el porcentaje de infección o el número de granos infectados para evaluar la reacción de diversos genotipos al hongo *A. flavus* (La Prade y Manwiller, 1976; Widstrom et al, 1981; Fernández, 1982). Sin embargo, King y Scott (1982) sugieren que una forma adecuada de conocer la reacción de los materiales que se evalúan, es determinar la capacidad de movilización del hongo inoculado. En el presente trabajo se determinó que bajo las condiciones experimentales dadas, es posible usar este parámetro para evaluar resistencia, pues con los métodos M₁ y M₂ se obtuvieron altos índices de infección y alta movilidad. Esto ocurrió tanto en los casos en que hubo infección con solo *A. flavus*, como cuando éste apareció asociado con otros hongos. Lo anterior demuestra que ambos métodos son igualmente eficientes a pesar de la posible competencia estableci-

CUADRO 2

NUMERO PROMEDIO DE GRANOS INFECTADOS CONJUNTAMENTE POR *A. FLAVUS* Y OTROS GENEROS, EN CADA UNO DE LOS METODOS PROBADOS EN EL ENSAYO, CON BASE EN 50 GRANOS ANALIZADOS

TRATAMIENTO	POSICION 1	POSICION 2	POSICION 3	POSICION 4
M ₁	43,15 a (1)	43,90 a	44,20 a, b	43,40 a, b
M ₂	47,65 a	46,50 a	46,65 a	44,85 a
M ₃	41,50 a	39,70 a, b	39,00 a, b, c	42,30 a, b
M ₄	29,35 c	31,05 b	34,95 c, d	28,55 c
M ₅	31,60 c	31,55 b	29,50 d	34,85 b, c
M ₆	34,95 b, c	32,85 b	36,90 b, c, d	35,30 b, c

(1) Promedios con la misma letra dentro de cada columna, no son significativamente diferentes, según prueba de Waller-Duncan (Razón K = 100).

CUADRO 3

PROMEDIO TOTAL DEL NUMERO DE GRANOS INFECTADOS POR: *A. FLAVUS*, *A. FLAVUS* + *FUSARIUM*, *FUSARIUM* SP. Y *A. FLAVUS* + OTROS HONGOS, EN CADA TRATAMIENTO

HONGOS PRESENTES	TRATAMIENTOS					
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
<i>A. flavus</i>	34,46	33,77	28,21	10,30	9,53	10,21
<i>A. flavus</i> + <i>Fusarium</i>	5,11	8,23	6,47	13,37	13,42	17,7
<i>Fusarium</i> sp.	1,17	1,65	2,41	10,20	7,68	6,18
<i>A. flavus</i> + otros*	3,65	6,39	4,29	6,72	5,38	7,43

* Bajo esta categoría se incluyen: *Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp., *Wardomyces*, *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. y *Helminthosporium* sp.

da por la micoflora que en forma natural se establece en la mazorca.

Aunque M₁ y M₂ muestran igual grado de movilidad, se considera el método M₁ como el mejor por presentar mayores ventajas en cuanto a manejo. En primer lugar, la aplicación del inóculo es más sencilla, pues las hileras ya están organizadas en líneas fáciles de seguir en el proceso de inoculación, mientras que en los otros casos hay que establecer las líneas horizontales y no siempre son regulares. En segundo lugar, este método permite asignar las posiciones preestablecidas a ambos lados de la línea de inoculación, siguiendo el diseño natural de la mazorca, lo cual también facilita la extracción de los granos al momento de separarlos

por posición. Finalmente, aplicando el inóculo de esta forma, se logra un mayor número de granos infectados, dando más facilidad a la hora de tomar la muestra final (King y Scott, 1982), situación que ha sido una de las limitantes mayores en otros métodos probados por Widstrom et al (1981) y Quesada (1983).

El segundo método, a pesar de que presenta buenos resultados, tiene la desventaja de que si se derrama alguna gota de la suspensión inoculada, ésta puede descender y depositarse sobre los granos de las posiciones inferiores, distorsionando los resultados. Puesto que en este experimento lo que interesa es la movilidad del hongo, de ocurrir tal situación no hay forma de distinguir si la infección

fue provocada por la expansión del hongo o por el líquido derramado.

Los valores promedios obtenidos para el método M_3 fueron siempre los más bajos y para algunas posiciones resultaron ser estadísticamente diferentes a los otros métodos. Tales resultados parecen indicar una eficacia muy limitada, lo que se reafirmó al presentarse casos en que los promedios de infección del tratamiento y su respectivo testigo no fueron diferentes estadísticamente. Esto es explicable por características propias del método, puesto que el inóculo fue ubicado únicamente en una pequeña franja basal que abarcaba solo unos cuantos granos, originando una alta concentración de propágulos en un número reducido de unidades. Esto posiblemente favoreció la invasión natural de otros hongos en la zona de muestreo, lo que se reflejó en la no diferenciación estadística del testigo y su tratamiento cuando se contabilizó la presencia de *A. flavus* más otros hongos.

Como resultado de lo anterior, se puede asumir que la distribución del inóculo en la mazorca es un factor importante en este tipo de pruebas, pues en los tratamientos M_1 y M_2 hubo un mayor número de granos receptores de inóculo, lo que se manifestó como una eficiencia similar en ambos casos. En otras investigaciones (La Prade y Manwiler, 1976; Calvert, et al, 1978; King y Scott, 1982; Quesada, 1983), se han presetado resultados similares, donde tratamientos con el inóculo muy localizado han dado resultados poco prometedores o muy erráticos, mientras que aquellos en que el inóculo estuvo más extendido se logró mayor eficiencia.

Los promedios de infección obtenidos en cada genotipo no presentaron ninguna diferencia estadística significativa, lo que se interpreta como igual susceptibilidad para cada uno de ellos, pues

A. flavus avanzó con facilidad aún en competencia con otros hongos. Esto corrobora resultados obtenidos previamente donde X 107 A, X 105 A y la F_6 (Nuevo León V-S-1-e X Tico H₅) habían mostrado susceptibilidad al mismo hongo (Fernández, 1982; Quesada, 1983). Sin embargo, la F_6 mostró algún grado de resistencia que limitó el avance de *A. flavus*, que manifestó menores promedios de infección. Similar observación hizo Quesada (1983) respecto del mismo material, cuando éste fue inoculado de cuatro formas diferentes bajo condiciones completamente distintas.

Cuando se hacen inoculaciones de *A. flavus* en el campo, normalmente hay interacción entre éste y otros hongos (Stoloff et al, 1975; Lillehoj et al, 1976; Wicklow et al, 1980; Fernández, 1982; Quesada, 1983). En el presente trabajo el que tuvo mayor influencia, aparte del hongo inoculado, fue *Fusarium* sp., situación que también se presentó en estudios similares hechos por Fernández (1982) y Quesada (1983) en épocas diferentes.

La posible competencia entre *A. flavus* y otros hongos, pareciera ser más severa cuando pequeñas cantidades de inóculo arriban a la planta, pues en los tratamientos donde se aplicó la suspensión de esporas (M_1 , M_2 y M_3), se obtuvo una mayor cantidad de granos infectados exclusivamente por *A. flavus* y menores valores para la infección simultánea de éste con *Fusarium* sp., o de cualquier otro hongo. En el caso de los testigos se dio una situación opuesta, pues solamente recibieron inóculo natural. Esto sugiere que es necesario una presión de inóculo mayor que la natural, para contrarrestar el efecto de otros hongos que normalmente invaden los granos en el campo. Evitándose así el posible efecto inhibitorio que éstos puedan tener (Stoloff et al, 1975; Lillehoj et al, 1976; Wicklow, 1980).

LITERATURA CITADA

- CALVERT, O.H., LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F. and ZUBER, M.S. 1978. Aflatoxin B₁ and G₁ production in developing *Zea mays* kernels from mixed inocula of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Phytopathology*. 68: 501-506.
- CHRISTENSEN, C.M. 1985. Deterioration of stored grain by fungi. *Annual review of Phytopathology*. 3: 69-84.
- _____. y KAUFMAN, H.H. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados. Trad. de la 1^a ed. inglesa por Ernesto Moreno Martínez. México D.F. Pax, 199 pp.
- COSTA RICA. INSTITUTO METEOROLOGICO NACIONAL. 1983. Registro de datos. San José. sp.
- _____. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 1982. Dirección General de Investigaciones Agrícolas. Evaluación 1981 y programación nacional de investigaciones agrícolas para la producción. 83 pp.
- FAO/OMS/PNUMA. 1977. Conferencia mixta. Sobre micotoxinas. Nairobi, Kenya. Perspectiva sobre micotoxinas. Roma. 182 pp.
- FERNÁNDEZ, A.V. 1982. Comparación de métodos de inoculación de *Aspergillus flavus* Link en cultivares de maíz (*Zea mays*) mediante análisis de micoflora. Tesis Ing. Agr. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, 59 pp.
- JONES, R.K., DUNCAN, H.E., PAYNE, G.A. and LEONARD, K.J. 1980. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk inoculated corn. *Plant Disease*. 64: 859-863.
- KING, S.B. and SCOTT, G.E. 1982. Field inoculation techniques to evaluate maize for reaction to kernel infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*. 72: 782-785.
- LA PRADE, J.C. and MANWILLER, A. 1975. Aflatoxin and fungal growth on single cross corn hybrids inoculated with *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*. 66: 675-677.
- LIEBERMAN, M. 1983. *Post harvest Physiology and Crop Preservation*. New York, Plenum. 572 pp.
- LILLEHOJ, E.B., FENNELL, D.I. and KWOLEK, W.F. 1976. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Iowa corn before harvest. *Crop Science*. 193: 495-496.
- MONGE, L.A. 1981. *Cultivos básicos*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 298 pp.
- QUESADA, M.A. 1983. Comparación de cuatro métodos de inoculación de *Aspergillus flavus* Link ex Fries en seis genotipos de maíz (*Zea mays* L.). Tesis Ing. Agr. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional, Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Escuela de Ciencias Agrarias. 70 pp.
- RAMBO, G.W., TUIE, J. and CRANE, P. 1974. Preharvest inoculation of dent corn ears with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*.
- STOLOFF, L., MISLEVEC, P. and KULIK, M.N. 1975. Susceptibility of freshly piked ear corn to invasion by fungi. *Applied Microbiology*. 29: 123-124.
- THOMPSON, D.L., RAWLINGS, J.P., ZUBER, M.S., PAYNE, G.A. and LILLEHOJ, E.B. 1984. Aflatoxin accumulation in developing kernels of eight single crosses after inoculation with *Aspergillus flavus*. *Plant Disease*. 68: 465-467.
- WICKLOW, D.T., HESSLTINE, C.W., SHOTWELL, O.L. and ADAMS, G.L. 1980. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology*. 70: 761-764.
- WIDSTROM, N.W., WILSON, D. and MC MILLIAN, W. 1981. Aflatoxin contamination of preharvest corn as influenced by timing and method of inoculation. *Applied and environmental microbiology*. 42: 249-251.