

Efecto Antifúngico de Gobernadora (*Larrea tridentata*) para Inhibir el Crecimiento de *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus* en maíz

Zurivey Díaz Cortés^{1*}, Federico Facio Parra¹, Ricardo Hugo Lira Saldivar²

¹Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923, Colonia Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México. E.mail: zury_uaaan@yahoo.com.mx (*Autor responsable). ²CIQA. Centro de Investigaciones en Química Aplicada. Bvd. Enrique Reyna Hermsillo No. 140, Saltillo, Coah., México, CP 25100.

Abstract

The corn grains (*Zea mays*) are susceptible to the proliferation of toxigenic molds like *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus ochraceus*. In addition to the direct damages caused by the infected plants, these molds produce a great variety of secondary metabolites, some of which are toxic when ingested by humans and animals, via contaminated foods. In this assay the effects of hydrosoluble methanolic extract of *gobernadora* (*Larrea tridentata*) was evaluated (*L. tridentata*) to 25 % of total solids, for its action against the infestation of *F. moniliforme*, *A. flavus* and *A. ochraceus* in corn grains stored for a 180-day period checking for results every 30 days. The extract was assayed in doses of 4,000; 6,000 and 8,000 ppm. The results showed that in a dose of 6,000 ppm the percentage of infestation with *A. flavus*, and *A. ochraceus* was lower, however, for *F. moniliforme* the doses that inhibited the pathogen were: 4,000 and 8,000 ppm. All the doses had a fungicide effect. As the storage period was increased, the infestation percentage became higher.

Key words: Infestation, abstract, dose, inoculation, storage.

Resumen

Los granos de maíz (*Zea mays*) son susceptibles a la proliferación de mohos toxigénicos como *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*. Además de los daños directos que ocasionan a las plantas infectadas, estos hongos producen una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son tóxicos al ser ingeridos, por humanos y animales en alimentos contaminados. En este estudio se evaluó el efecto del extracto metanólico hidrosoluble de gobernadora (*L. tridentata*) al 25 % de sólidos totales, sobre la acción contra la infestación de *F. moniliforme*, *A. flavus* y *A. ochraceus*, en granos de maíz almacenados por un periodo de 180 días realizando evaluaciones cada 30 días. Se probaron dosis de 4,000; 6,000 y 8,000 ppm de extracto de gobernadora. Los resultados mostraron que a dosis de 6,000 ppm el porcentaje de infestación de *A. flavus* y *A. ochraceus* fue menor, sin embargo, para *F. moniliforme* las dosis que inhibieron al hongo fueron: 4,000 y 8,000 ppm. Todas las dosis tuvieron efecto fungicida, ya que conforme se incrementó el período del almacenamiento, el porcentaje de infestación también lo hizo.

Palabras clave: Infestación, extracto, dosis, inoculación, almacenamiento.

Introducción

La producción de maíz es susceptible de ser alterada por factores diversos que afectan tanto la cantidad como la calidad de granos cosechados, en muchas áreas de producción como en zonas tropicales, las condiciones ambientales favorecen la proliferación de mohos

toxigénicos en los granos, como es el caso de *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*. Siendo *F. moniliforme* un hongo de gran importancia por tener una distribución cosmopolita en todos los tipos de climas y poseer un amplio ámbito de hospederos; destacando entre las enfermedades que produce, la

germinación prematura del maíz y la pudrición de la mazorca. Además de los daños directos que ocasiona a las plantas infectadas, este hongo produce una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales son tóxicos al ser ingeridos por humanos y animales en alimentos contaminados (Ayvar-Serna, 1997; Pittet *et al.*, 1992). Por otra parte, la especie *Aspergillus flavus* se considera como un hongo que presenta una mayor distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el ecuador. Se considera la principal especie productora de aflatoxinas que se desarrolla en el maíz (Herrera y Ulloa, 2004).

Por su parte *A. ochraceus* es el productor de la ochratoxina la cual, ocasiona varios síntomas en animales domésticos (Agris, 2004), estas toxinas constituyen un serio problema que afectan la germinación y desarrollo de plantas de este cereal (Herrera y Ulloa, 2004). Para la prevención y manejo de este problema, existen diversas medidas como son: la regulación de la humedad del grano, el uso de variedades tolerantes o resistentes, algunas prácticas culturales y el tratamiento de las semillas con fungicidas. Sin embargo, estos productos han sido cuestionados por los riesgos de sus residuos en alimentos (Bhatnagar *et al.*, 1994; Payne, 1992).

El uso potencial de productos naturales de origen vegetal para el combate de hongos que dañan los granos en almacén es uno de los aspectos menos estudiados, aunque existen algunos reportes como el de Vargas-Arispuro *et al.* (1997) quienes encontraron que el extracto de *L. tridentata* obtenido con diclorometano, inhibió en 92 y 86 % el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Por otra parte, Montes-Belmont y Flores (2000) demostraron la acción antifúngica *in vitro* contra diversos hongos fitopatógenos de gran importancia económica, algunos de ellos caracterizados por tener una gran capacidad metabólica como los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Se ha determinado que los extractos de *L. tridentata* tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica; de igual manera extractos y material vegetativo molido en polvo e incorporado al suelo han confirmado inhibir o controlar seis hongos en cultivos agrícolas (Lira-Saldivar, 2003). Desafortunadamente todos estos estudios se han efectuado mediante el contacto directo entre los productos vegetales y el hongo en medio de cultivo artificial y no hay precedentes sobre lo que ocurre al aplicarlos a substratos naturales como granos de maíz. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto protector de *L. tridentata* contra *F. moniliforme*, *A. flavus* y *A. ochraceus* en semillas de maíz por un período de 180 días.

Materiales y Métodos

Microorganismo

Se usaron cepas de *F. moniliforme*, *A. flavus* y *A. ochraceus* de origen monospórico, proporcionadas por la Unidad de Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La cepa se preservó en gel de sílice en de tubos de ensaye, posteriormente se hicieron transferencias a medio de cultivo malta sal agar (MSA) para reactivar su crecimiento y esporulación. La siembra se realizó inoculando una muestra de gel de sílice de cada hongo en el centro de una caja petri, la cual se mantuvo a $5\pm 1^\circ\text{C}$ durante el tiempo que duró el trabajo. Los cultivos se incubaron periódicamente por 8 d a $25\pm 1^\circ\text{C}$, para todas las pruebas.

Extracto de *L. tridentata*

El extracto metanólico al 25 %, fue proporcionado por el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) de Saltillo, Coah., México, donde se realizaron diluciones de 4,000; 6,000 y 8,000 ppm.

Protección de semillas de maíz

Esta prueba se realizó en semillas de maíz del híbrido H-446, proporcionado por el Instituto Mexicano del Maíz. Consistió en la adhesión de 1334 semilla de maíz por cada dosis de extracto de *L. tridentata*, una vez adherida cada dilución, la semilla se almacenó en frascos de vidrio a una temperatura de 25°C por 180 d.

Germinación de esporas y desarrollo micelial

Del cultivo de *F. moniliforme*, *A. flavus* y *A. ochraceus* en cajas petri con medio MSA, se raspó con un hisopo esterilizado y se le agregó agua destilada estéril para ajustar a un volumen de 10 mL y se realizaron diluciones de 10^1 para *F. moniliforme* y *A. flavus* y de 10^2 para *A. ochraceus*; esto con el fin de asegurar la posibilidad de utilizar una misma cantidad de esporas. Se realizaron un total de seis muestreos, uno cada 30 días. Posteriormente se sembraron con pinzas punta roma, en cada caja petri, 10 semillas de maíz tratadas con las dosis de *L. tridentata*; en seguida se inoculó con un concentrado de esporas de los hongos ($10\mu\text{L}$) y se incubaron durante 7 días, para al final de ese tiempo determinar el número de granos infestados por repetición, por hongo y por dosis de extracto (4,000; 6,000 y 8,000 ppm). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con nueve tratamientos y cuatro repeticiones. Para todas las pruebas anteriores los datos fueron sometidos a análisis de varianza y a la prueba Tukey de comparación de medias.

Resultados y Discusión

Germinación de esporas y desarrollo micelial

Los extractos de *L. tridentata* en todas las dosis evaluadas mostraron efecto fungicida con relación al testigo, que mostró el 100 % de infestación (Cuadro 1). El tratamiento con extracto de *L. tridentata* a 4,000 ppm permitió el menor porcentaje de infestación de *A. flavus* (47 %); mientras que los extractos de *L. tridentata* a 6,000 ppm permitieron una infestación del 40 % del hongo *A. ochraceus* y para el caso de *F. moniliforme* se observó un 45 % de infestación al aplicar extractos de *L. tridentata* a las dosis de 4,000 y 8,000 ppm.

En el mismo cuadro se observa que, con excepción de la dosis de 6,000 ppm (83 % de infestación), todas las dosis de extractos de *L. tridentata* probadas contra *F. moniliforme*, tuvieron un efecto fungicida. En general las dosis efectivas para la inhibición de los hongos en relación con el testigo fueron 4,000 y 8,000 ppm contra *F. moniliforme*; 4,000 ppm contra *A. flavus* y 6,000 ppm contra *A. ochraceus*. Sin embargo, el mejor efecto fungicida se observó con la dosis de 6,000 ppm de extractos de *L. tridentata* contra *A. ochraceus* con una infestación del 40 %.

Cuadro 1. Porcentaje de infestación de tres hongos, en semillas almacenadas de maíz del híbrido H-446, con la aplicación del extracto metanólico de *L. tridentata* a tres concentraciones.

Extracto (ppm)	Infestación (%)		
	FM	AF	AO
4,000	45	47	41
6,000	83	47	40
8,000	45	50	45
Testigo	100	100	100

FM = *F. moniliforme*; AF = *A. flavus*; AO = *A. ochraceus*

En el Cuadro 2 se presenta el porcentaje de infestación de *F. moniliforme*, *A. flavus* en semillas de maíz tratadas con extracto de gobernadora aplicando a tres concentraciones, que fueron almacenadas durante un período de 180 d.

En este cuadro se observa que el efecto protector de los extractos de *L. tridentata* para inhibir el crecimiento de los hongos inoculados en las semillas de maíz no fue persistente, ya que desapareció después de 90 días en todas las dosis; a excepción de la dosis 6,000 ppm, que mostró mejor efecto preventivo contra *F. moniliforme*, después de 90 d de almacenamiento. Todas las semillas tratadas con *L. tridentata* mostraron una infestación superior al

50 %, lo cual indica la disminución del efecto protector de los productos orgánicos.

Cuadro 2. Infestación de *Fusarium moniliforme* y *Aspergillus flavus* en semilla de maíz a través del tiempo, después de aplicar extractos de *L. tridentata* a tres concentraciones.

Tiempo en Almacén (d)	Extractos de <i>L. tridentata</i> (ppm)			
	4,000	6,000	8,000	Testigo
	Infestación (%)			
<i>Fusarium moniliforme</i>				
30	0n	0n	0n	100a
60	30j	20l	10m	100a
90	40h	25k	35i	100a
120	45g	55f	55f	100a
150	75d	60e	80c	100a
180	80c	100a	90b	100a
<i>Aspergillus flavus</i>				
30	0j	0j	5i	100a
60	10h	25g	25g	100a
90	45f	45f	50e	100a
120	60c	50e	55d	100a
150	65b	65b	65b	100a
180	100a	100a	100a	100a

Los fitoquímicos presentes en la resina de gobernadora tiene una potente acción antifúngica *in vitro* contra hongos fitopatógenos de gran importancia económica, algunos de ellos caracterizados por tener una gran capacidad metabólica como los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Montes-Belmont y Flores, 2000). Sin embargo, el efecto protector de la gobernadora solo se observó en los primeros meses del almacenamiento.

Lo anterior coincide con los señalado por Montes-Belmont *et al.* (1997), quienes al estudiar 106 especies de plantas en forma de polvos, extractos acuosos, metanólicos y hexánicos sobre la germinación de esporas y el desarrollo del micelio de *A. flavus* en granos de maíz, encontraron que los productos vegetales que mostraron acción contra la infección de este hongo fueron: *Larrea tridentata*, *Rosmarinus officinalis*, *Tridax coronopifolia* y *Coleus blumei*, disminuyendo significativamente la contaminación por este hongo en granos de maíz. Sin embargo, también existe una vulnerabilidad de este tipo de extractos a las condiciones ambientales, esto pone de manifiesto que en períodos largos de almacenamiento y condiciones de almacén no controladas, el efecto protector de los productos orgánicos sobre la semilla disminuye.

Conclusiones

Los extractos de *Larrea tridentata* en la dosis de 4,000 ppm mostraron efecto inhibitorio contra *F. moniliforme*,

A. flavus y *A. ochraceus*, ya que en esta dosis sólo se observó un porcentaje de infestación por debajo del 50 %. Por otra parte, en los tres hongos en estudio se observó que, en períodos largos de almacenamiento, y en condiciones no controladas de almacén, el efecto protector de los productos orgánicos sobre la semilla disminuye y, como consecuencia, aumenta el porcentaje de infestación.

Literatura Citada

- Agrios, N.G. 2004. Fitopatología. Editorial Limusa. México. 838 p.
- Ayvar-Serna, S. 1997. Aislamiento e identificación de las micotoxinas producidas por el hongo *Fusarium moniliforme*, en maíz y su relación con las enfermedades denominadas pudrición de la mazorca y germinación prematura. Tesis de Doctorado. México, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 20-30.
- Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Cotty, P.J. 1994. Mycological aspects of aflatoxin formation. 327-346 p. *In*: Eaton, D.L. and Groopman, J.D. (Eds.) The toxicology of aflatoxin formation. Human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press. London.
- Herrera, T. y Ulloa M. 2004. El reino de los hongos. Micología Básica y Aplicada. UNAM. México D.F.552 p.
- Lira-Saldívar, R.H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville] Rev. Mex. Fitopatol. 21: 214-22.
- Montes-Belmont, R., Carvajal, M., Figueroa, B.R. y Méndez, I. 1997. Extractos sólidos, acuosos y hexánicos de plantas para el combate de *Aspergillus flavus* link en maíz. Rev. Mex. Fitopatol. 15: 26-30.
- Montes-Belmont, R. y Flores M.H.E. 2000. Tratamiento de semillas de sorgo con aceites esenciales para el combate de *Fusarium moniliforme*. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco. 20 p.
- Payne, G.A. 1992. Aflatoxin in maize. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 423-440.
- Pittet, A., V. Parisond and M. Schellenberg. 1992. Occurrence of fumonisins B 1 and B 2 in corn and products from the Swiss market. pp. 259-265.
- Vargas-Arispuro, I., Araujo-Bernal, S., Martínez-Tellez, M.A. y Ortega-Nieblas M. 1997. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Rev. Mex. Fitopatol. 15: 91-95.
-