

Efecto del Extracto de Estigmas de Maíz sobre *Aspergillus* spp

Carlos Manuel Bucio Villalobos*, Hugo Alberto Luna Olvera**, Oscar Alejandro Martínez Jaime* y Doralinda Guzmán de Peña***

RESUMEN

Un extracto de estigmas del híbrido de maíz A-791 fue adicionado a un medio de cultivo, evaluándose su efecto sobre el crecimiento, esporulación y síntesis de micotoxinas de *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 y *A. nidulans* FGSC-26. Se encontró un efecto estimulador en el crecimiento de ambos hongos y la esporulación del primero, contrastado con el efecto inhibitorio en la síntesis de aflatoxinas de *A. parasiticus* y estimulador en la de esterigmatocistina de *A. nidulans*. Los resultados sugieren la presencia de compuestos en los estigmas frescos del maíz que estimulan el crecimiento y esporulación de *A. parasiticus*, pero inhiben la síntesis de aflatoxinas.

ABSTRACT

A silk (stigmas) extract of hybrid A-791 of maize was added to synthetic culture, evaluating its effect on growth, sporulation and synthesis of micotoxins of *Aspergillus parasiticus* ATCC 16992 and *A. nidulans* FGSC-26. It was observed a stimulatory effect in growth of both fungi and sporulation of on the first, contrasting with inhibiting effect in the synthesis of aflatoxins of *A. parasiticus* and stimulatory in the sterigmatocystin of *A. nidulans*. Results suggest the presence of compound in stigmas fresh of maize that stimulate the growth and sporulation of *A. parasiticus*, but inhibit the aflatoxins synthesis.

Recibido: 7 Nov 2006
Aceptado: 2 Mayo 2007

INTRODUCCIÓN

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* son hongos que se desarrollan sobre una gran variedad de sustratos, donde pueden producir aflatoxinas (Bhattacharya y Raha, 2002). Estos compuestos son extremadamente tóxicos y pueden unirse al DNA humano y animal, formando aductos que posteriormente originan cáncer en ciertas especies animales (Wang y Groopman, 1999). La carcinogénesis producida por las aflatoxinas en humanos es menos clara, pero se ha correlacionado positivamente con el consumo de alimentos contaminados, en algunas partes del mundo (Egal *et al.*, 2005).

La contaminación de granos con aflatoxinas fue considerada un problema de almacén durante los primeros años después de su descubrimiento, al inicio de los 70's, y fue posteriormente que se descubrió que dicha contaminación podía darse desde que las plantas se encontraban en el campo (Windstrom, 1992). Este hecho determinó que se iniciaran investigaciones acerca de la relación hongo-planta, que dieran información de cómo *Aspergillus* podía modificar su capacidad de síntesis de aflatoxinas, en función de su interacción con su hospedante.

En el caso de la relación *A. flavus*-maíz, se ha demostrado que la penetración del hongo en las mazorcas del maíz ocurre, exclusivamente, cuando los estigmas están en un estado fisiológico posterior a la polinización (Marsh y Payne, 1984a; Marsh y Payne, 1984b); de tal manera que existe la posibilidad de que algunos compuestos del maíz presentes en ese momento sean muy exclusivos y determinantes para que la cascada de señales de comunicación entre hongo y planta ocurran, dando como consecuencia la colonización del hongo y la síntesis de aflatoxinas.

Diferentes trabajos han sido realizados en el Laboratorio de Micotoxinas de la Unidad Irapuato del CINVESTAV, con la finalidad de estudiar

Palabras clave:

Aspergillus; Extractos de maíz.

Keywords:

Aspergillus; Maize extracts.

* Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato. Correo electrónico: bucioc@dulcinea.ugto.mx.

** Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Correo electrónico: drhugoluna@aol.com.

*** CINVESTAV, Unidad Irapuato. Correo electrónico: dguzman@ira.cinvestav.mx.

si en la relación *Aspergillus*-maíz-aflatoxinas, existen compuestos presentes en la planta que pudieran actuar como señales para activar los genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas. Diversos reguladores de crecimiento vegetal, extractos y tejidos de estigmas, elote y brácteas florales de maíz han sido evaluados para conocer su efecto sobre el crecimiento, la diferenciación y la síntesis de micotoxinas en *A. parasiticus* (cepas Ap³⁻⁵ y ATCC 16992) y *A. nidulans* (cepa FGSC-26), como modelo fúngico. El objetivo de la presente investigación es evaluar el efecto del extracto de estigmas de maíz sobre el crecimiento, la esporulación y la síntesis de micotoxinas en *Aspergillus parasiticus* y *A. nidulans*.

MÉTODOS

Cepas utilizadas. Las cepas utilizadas fueron: ATCC 16992 de *Aspergillus parasiticus*, adquirida en la American Type Culture Collection en Manassas, VA, USA, que produce las cuatro aflatoxinas, B₁, B₂, G₁ y G₂ y presenta buena estabilidad en su producción; y la cepa FGSC-26 de *A. nidulans*, donada por el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México; *A. nidulans* es un modelo fúngico y cuenta con la ventaja de tener la misma ruta de síntesis que tienen *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* para producir aflatoxinas, con excepción de un último paso, por lo que en *A. nidulans* el producto final es la toxina esterigmatocistina.

Medio de cultivo. *A. parasiticus* creció en el medio sintético utilizado por Guzmán-de-Peña (1996), el cual es reportado como no inductor de aflatoxinas y utiliza peptona como fuente de carbono. En este estudio se utilizó glucosa como fuente de carbono, tornándolo en un medio sintético inductor. Para *A. nidulans* fue utilizado como, base el medio, sintético propuesto por Käfer (1977).

Obtención de inóculo. Cajas de Petri con Papa Dextrosa Agar contenían el hongo, fueron incubadas durante 5 días. Al término de la incubación se añadió a cada caja 3 ml de agua Tritón X-100 estéril al 0.01 % y se obtuvo el inóculo en condiciones estériles. La cuenta de esporas se realizó utilizando la cámara de Neubauer. Se utilizó 1 ml de una suspensión de esporas a 1×10^7 esporas/ml para cada matraz erlenmeyer de 250 ml de capacidad, conteniendo 50 ml de medio de cultivo.

Condiciones de incubación. Se utilizaron dos temperaturas de incubación: 28 °C y 37 °C. La primera se utilizó para incubar a *A. parasiticus*, mientras que la segunda fue para *A. nidulans*. Los matraces

con el medio de cultivo líquido fueron incubados en condiciones estacionarias durante 3 y 6 días. El mayor tiempo se utilizó en *A. parasiticus*, por ser de crecimiento más lento que *A. nidulans*.

Extracto de estigmas de maíz. El extracto de tejidos de estigmas de maíz fue obtenido utilizando mazorcas del híbrido A-791 cosechadas entre los 15 y 20 días después de emerger los estigmas. Inmediato a la cosecha de las mazorcas, 150 gramos de peso fresco de estigmas fueron colocados en 600 ml de etanol y calentados en baño maría por 15 minutos a 80 °C. Después de dejar reposar toda la noche y eliminados los estigmas, el etanol fue evaporado hasta sequedad, resuspendiendo el residuo en 900 ml de agua destilada; la suspensión fue filtrada en papel Whatman No. 1 para eliminar todos los sólidos, guardándose el filtrado a -12 °C hasta su posterior uso. Para evitar la posible degradación con el calor, el extracto de maíz fue esterilizado por filtración, a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore 0,45 µm, 25 mm, HAWP), previo a ser agregado al medio de cultivo.

Parámetros evaluados. Tres parámetros fueron evaluados a los 6 días de desarrollado el cultivo, para *Aspergillus parasiticus* y 3 días para *A. nidulans*: el crecimiento micelial, la esporulación y la síntesis de micotoxinas. Para el crecimiento micelial, el micelio fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 1, con peso constante. El papel con el micelio se colocó a 60 °C por 24 horas para su total secado, y el crecimiento se determinó por diferencia de peso. Para el caso de la esporulación, al término de la incubación, el micelio fue transferido a un tubo de ensayo, al que se le agregaron 10 ml de agua - Tritón al 0,01 %. Las esporas fueron separadas del micelio por agitación, con una espátula, tomándose posteriormente una alícuota para la cuantificación de esporas en la cámara de Neubauer. El micelio y las esporas fueron regresados al matraz con el medio de cultivo para, realizar la extracción de las aflatoxinas de *A. parasiticus* y esterigmatocistina de *A. nidulans*, utilizándose para esto último la metodología propuesta por Keller *et al.*, (1994) y realizándose su cuantificación en un equipo de HPLC, marca RAININ Instrument Co. modelo 4800XL.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se montaron dos experimentos individuales para *Aspergillus parasiticus* y dos para *A. nidulans*. Para el primer hongo los tratamientos fueron los extractos de estigmas de maíz a 4 %, 8 % y 16 %, mas un control con agua destilada, mientras que para el segundo sólo se usó la concentración de 4 % y el control. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los datos conjuntos de ambos experimentos individuales para

cada caso. En cada experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 5 repeticiones. La unidad experimental consistió de un matraz erlenmeyer con 50 ml de medio de cultivo. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y las pruebas de separación de medias de Duncan para el caso de *A. parasiticus* y Diferencia Mínima Significativa para *A. nidulans*, usándose en todos los casos un nivel de significancia del 1 %. Para todos los análisis se utilizó el programa M Stat (Russel y Eisensmith, 1984).

RESULTADOS

El peso seco de micelio de *Aspergillus parasiticus* se incrementó en todas las concentraciones del extracto acuoso de estigmas de maíz evaluadas (tabla 1), las cuales resultaron significativamente diferentes al control. La esporulación también se vio significativamente estimulada cuando se utilizaron las concentraciones del extracto de 8 % y 16 % (tabla 1); la cantidad de esporas se incrementó en un 580 % cuando se utilizó la máxima concentración del extracto acuoso de estigmas. Contrario al efecto estimulador encontrado en el crecimiento y la esporulación, se observó una significativa inhibición en la síntesis de aflatoxinas al utilizar cualquiera de las concentraciones evaluadas de ese extracto (tabla 1). La inhibición de este proceso metabólico llegó a ser de hasta un 83 % respecto al control cuando se utilizó la máxima concentración del extracto.

Tabla 1.
Efecto del extracto acuoso de estigmas de maíz después de 6 días de crecimiento de *Aspergillus parasiticus* en medio sintético.

| Tratamiento | Peso seco de micelio (mg) | Número de esporas totales ($\times 10^7$) | Aflatoxinas (ng/mg de micelio) |
|-----------------------------|---------------------------|---|--------------------------------|
| Control | 520,0 b | 11,5 c | 1 267,9 a |
| Extracto de estigmas (4 %) | 644,7 a | 15,0 c | 174,3 b |
| Extracto de estigmas (8 %) | 655,9 a | 29,1 b | 167,8 b |
| Extracto de estigmas (16 %) | 645,4 a | 66,8 a | 206,2 b |

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Duncan con $\alpha=0.01$).

Para *A. nidulans*, la única concentración del extracto de estigmas de maíz utilizada, incrementó significativamente el crecimiento micelial en un 10 % y la síntesis de esterigmatocistina en 536 %, mientras que la esporulación no se vio afectada (tabla 2).

Tabla 2.
Efecto del extracto acuoso de estigmas de maíz después de 3 días de crecimiento de *Aspergillus nidulans* en medio sintético.

| Tratamiento | Peso seco de micelio (mg) | Número de esporas totales ($\times 10^7$) | Esterigmatocistina (ng/mg de micelio) |
|----------------------------|---------------------------|---|---------------------------------------|
| Control | 291,7 b | 93,1 a | 103,7 b |
| Extracto de estigmas (4 %) | 322,6 a | 61,2 a | 556,5 a |

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (DMS con $\alpha=0.01$).

DISCUSIÓN

El extracto acuoso de estigmas de maíz tuvo un efecto estimulador sobre el crecimiento micelial, tanto de *Aspergillus parasiticus* como de *A. nidulans*. Los resultados sugieren la presencia de compuestos que estimulan el crecimiento micelial de *A. parasiticus* y *A. nidulans*, en los estigmas tiernos del maíz, estado fisiológico de las mazorcas, en que *Aspergillus flavus* se ve favorecido para que, mediante el crecimiento micelial, ocurra la infección y colonización del interior de la mazorca, según lo reportado por Marsh y Payne (1984a y 1984b). Algunos otros extractos de plantas también han sido reportados como estimuladores al crecimiento de *A. flavus* (Sinha, 1985).

El extracto acuoso de estigmas de maíz también estimuló significativamente la esporulación de *A. parasiticus*, sobre todo a las concentraciones más altas (8 % y 16 %). En *A. nidulans* este efecto no fue encontrado, aunque no se evaluaron concentraciones mayores al 4 %. Esto sugiere que quizá *Aspergillus* podría esporular aún en etapas tempranas de la formación de la mazorca, estimulado por compuestos del maíz presentes en los estigmas.

Por otro lado, en la síntesis de aflatoxinas por *A. parasiticus*, ocurrió un efecto contrario y la producción de dichas toxinas se vio significativamente inhibida por el extracto de estigmas de maíz. Efectos en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus*, utilizando extractos acuosos de plantas, fueron reportados por Sinha en 1985. Este investigador evaluó 86 extractos acuosos de plantas medicinales y silvestres, de los cuales 22 inhibieron y cuatro estimularon dicho proceso.

Los resultados obtenidos muestran que los compuestos presentes en los estigmas frescos del maíz, favorecieron el crecimiento y la esporulación de *A. parasiticus*, más no así, la síntesis de aflatoxinas. Las condiciones de la mazorca fresca podrían ser favorables para estimular los genes responsables del crecimiento

y la esporulación, pero no los de la síntesis de aflatoxinas, proceso que se efectúa posteriormente, cuando la mazorca está más madura.

Contrario al efecto inhibitorio de la aflatoxina en *A. parasiticus*, la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*, se vio estimulada con el extracto acuoso de estigmas de maíz. Considerando que este último hongo es usado como un modelo fúngico en muchos estudios, con estos resultados se ilustra el cuidado que se debe tener al inferir su comportamiento a otras especies de hongos. La misma diferencia se ha reportado para la respuesta a la 2,4-Diaminobutanona (Guzmán de Peña *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de estigmas de maíz estimuló el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus parasiticus*, y el crecimiento de *A. nidulans*. El efecto fue contrario en la síntesis de aflatoxinas de *A. parasiticus*, al haberse inhibido su producción, mas no así la de esterigmatocistina de *A. nidulans*, que permaneció estimulada.

REFERENCIAS

- Bhattacharya, K. and Raha, S. (2002). Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean by fungi in storage. *Mycopathologia* 155:135-141.
- Egal, S., Hounsa, A., Gong, Y.Y., Turner, P.C., Wild, C.P., May, A.J., Hell, K., and Cardwell, K.F. (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 104:215-224.
- Guzmán-de-Peña, D. (1996). *Regulación de la síntesis de micotoxinas durante el desarrollo de Aspergilli*. Tesis doctoral. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Departamento de Genética y Biología Molecular. 164p.
- Guzmán-de-Peña, D., Aguirre, J., and Ruiz-Herrera, J. (1998). Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emicella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:199-205.
- Käfer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19:33-131.
- Keller, N.P., Kantz, N.J., and Adams, T.H. (1994). *Aspergillus nidulans* var A is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1444-1450.
- Marsh, S.F. and Payne, G.A. (1984a). Scanning EM studies on the colonization of dent corn by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74:557-561.
- Marsh, S.F. and Payne, G.A. (1984b). Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74:1284-1289.
- Russel, D.F. and Eisensmith, S.P. (1984). M Stat-C design and analysis of agronomic research. Ed. Crop and Soil Sciences Department. Michigan State University. USA.
- Sinha, K.K. (1985). Screening of chlorophyllous plants against aflatoxin production and aflatoxin producing fungi. *J. Food Science Tech.* 22:225-228.
- Wang, J.S. and Groopman, J.D. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Res.* 424:167-181.
- Windstrom, N.W. (1992). Aflatoxin developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. In: Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., and Aroora, D.K. (eds). *Handbook of Applied Mycology. Vol 5: Mycotoxins in Ecological System* (p. 23-58). Marcel Dekker, Inc. USA.