

ISBN: 970-27-0770-6

## EVALUACIÓN DEL USO DE ALCALOIDES DERIVADOS DEL *Lupinus* COMO FUNGICIDA EN EL CONTROL DE *Fusarium verticillioides*.

**Figueroa Gómez Rosa Marina; Reynoso Maria Marta;  
Reyes Velázquez Waldina Patricia.  
Laboratorio de Residuos Tóxicos II, Depto de Salud Pública, CUCBA, UDG.  
Correo: waldinar@cucba.ud.mx**

### Introducción

El maíz es el cultivo de mayor importancia en México, representa el 43 % de la superficie cultivada y es el alimento básico para la población, correspondiendo al estado de Jalisco el primer lugar en producción, en el año 2002 se obtuvo 3,029,144 toneladas en una superficie de 651,077 hectáreas (SAGARPA, 2003).

El maíz es considerado el sustrato ideal de especies de *Fusarium*, las cuales pueden causar enfermedades de plántulas, podredumbre del tallo, raíz y mazorca, así como daño en el maíz almacenado aunque también puede aislarse de granos asintomáticos. La podredumbre de la raíz y el tallo constituye una de las principales enfermedades del maíz en México, la cual es causada principalmente por *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *F. culmorum*. (Nelson, 1992).

El control de las infecciones causadas por *F. verticillioides* es necesario, no solo por su calidad de patógeno del cultivo sino también por tratarse de una especie capaz de producir numerosas toxinas en diversos sustratos. Actualmente se están evaluando y desarrollando numerosas estrategias para reducir principalmente en contenido de fumonisinas (FBs) en maíz. Algunas de ellas son, la búsqueda de resistencia a la infección fúngica o la reducción de las concentraciones de FBs en el grano, otras están focalizadas en la decontaminación del maíz contaminado. Cualquiera que sea la estrategia empleada, se debe considerar las tres fases de producción: pre-cosecha, cosecha y post-cosecha, a fin de minimizar los riesgos en la salud de los consumidores, tanto humanos como animales. En el campo, se ha probado el uso de cultivares menos susceptibles a la producción de toxinas, el control de insectos y malezas, y las prácticas de cultivos. El uso de antioxidantes han demostrado algunos efectos sobre la germinación de conidios, crecimiento y producción de micotoxinas de especies aflatoxicogénicas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Thompson, 1991). Estudios recientes *in vitro* e *in situ* han demostrado que diferentes antioxidantes, tales como propilparabeno (PP) e hidroxianisol butilado (BHA) controlarían el crecimiento y producción de FBs por *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en diferentes condiciones de temperatura y  $a_w$  (Etcheverry *et al.* 2002; Reynoso *et al.* 2002; Torres *et al.* 2003).

Entre las estrategias que permite el control del crecimiento de hongos patógenos a nivel de cultivo se encuentran también, el uso de extractos vegetales, los cuales poseen características idóneas para inhibir el desarrollo y reproducción de especies productoras de micotoxinas. Los extractos de alcaloides de *Lupinus* han sido evaluados previamente, sin

embargo son escasos los estudios relacionados con su uso como fungicida. Zamora *et al.* (2002) encontraron inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, cuando los extractos de lupanina obtenidos a partir de *L. montanusse* se agregaron en niveles de 450 ppm. Arias *et al.* (2002), analizaron el efecto fungicida de extractos de alcaloides modificados de *Lupinus* (tioanálogos de lupanina, (+)-2- thinosparteína) y de lupanina, sobre especies de *Fusarium*, aisladas de *Agave tequilana* Weber; los resultados mostraron reducción del crecimiento fúngico principalmente por los extractos modificados.

El objetivo principal fue (i) evaluar *in vitro* la capacidad de fungicida de los alcaloides del *Lupinus exaltatus* y comparar dicha capacidad con la del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides*.

## Materiales y métodos

**Extracción del alcaloide de *Lupinus exaltatus*.** La extracción del alcaloide a partir de las semillas de *L. exaltatus* se llevará a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Wink (1993).

**Prueba fungicida.** Se utilizará una cepa de *F. verticillioides* (UDG 271) productora de altos niveles de FBs aislada del híbrido ALSA 036W, cosechado en parcelas experimentales del CUCBA durante el 2003.

**Inoculación y condiciones de cultivos.** Se utilizará el medio de cultivo Agar Harina de Maíz (AHM) al 2% para evaluar la capacidad fungicida del extracto del alcaloide de *L. exaltatus* y del antioxidante BHA. La  $a_w$  del medio de cultivo se ajustará a 0.995, 0.975 y 0.95 por la adición de una concentración adecuada de glicerol previo a la esterilización del mismo. El extracto del alcaloide de *L. exaltatus* y el antioxidante (BHA) preparado en una solución de etanol al 95%, se agregarán al medio del cultivo por el método de placa vertida. Se evaluarán 4 concentraciones del extracto (0, 1, 5, 10 y 20 mg ml<sup>-1</sup>) y 5 concentraciones del antioxidante (0, 0.5, 1, 5 y 10 mmol l<sup>-1</sup>). Las diferentes experiencias se llevarán a cabo con 4 repeticiones por tratamiento.

Las placas de AHM se inocularán centralmente con un disco de micelio de 5 mm de la cepa *F. verticillioides* ensayada y se incubarán a 25° C en la oscuridad. La velocidad de crecimiento radial se determinará midiendo el diámetro de las colonias desarrolladas en el medio AHM, diariamente en 4 direcciones hasta que la misma llegue a las márgenes de la placa. Los radios de las colonias desarrolladas en el medio AHM en cada tratamiento serán graficados versus el tiempo, y la caída de la extensión micelial se determinará por regresión lineal. Al final del período de incubación se analizará el contenido de fumonisinas en las placas de cada tratamiento.

**Análisis de fumonisinas.** Las fumonisinas serán extraídas y cuantificadas a partir de cada uno de los tratamientos según la metodología propuesta por Shephard *et al.* (1990) modificada por Doko *et al.* (1995).

**Análisis estadístico.** Para analizar los datos obtenidos en el presente estudio se usará el programa estadístico Sigma Stat Versión 2.03 para Windows 95 y NT.

## Resultados parciales

La tabla 1 muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre la fase lag (h) y la velocidad de crecimiento ( $\text{mm d}^{-1}$ ) de *F. verticillioides*. La fase lag (h) incrementó a medida que disminuyó la  $a_w$  en todos los tratamientos evaluados. Un incremento en la dosis de BHA de 0.5 a 1.0  $\text{mM l}^{-1}$  aumentó la fase lag de 30 a 53 h a una  $a_w=0.995$ , y de 32 a 87 h a una  $a_w=0.95$ . No se observó crecimiento durante los 28 días de incubación en las concentraciones más altas de BHA (5 y 10  $\text{mM l}^{-1}$ ).

En el tratamiento control y en el que se le adicionó solamente alcohol etílico al 95%, *F. verticillioides* mostró similar velocidad de crecimiento, de 12.1, 7.7 y 5.3  $\text{mm d}^{-1}$  y 11.1, 6.7 y 4.5  $\text{mm d}^{-1}$  respectivamente a niveles de  $a_w$  de 0.995, 0.975 y 0.955 (Tabla 1). En las concentraciones de 0.5 y 1.0  $\text{mM l}^{-1}$ , la velocidad de crecimiento disminuye marcadamente en todas las  $a_w$  evaluadas cuando se las compara con el tratamiento control.

**Tabla 1.** Efecto del antioxidante hidroxianisol butilado (BHA) y la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre la velocidad de crecimiento y la fase lag de *Fusarium verticillioides* cultivado en agar harina de maíz a 25° C.

Tratamiento	Concentración ( $\text{mmol l}^{-1}$ )	Velocidad de crecimiento ( $\text{mm/d}$ )			Fase lag (h)		
		Actividad de agua ( $a_w$ )					
		0.995	0.975	0.955	0.995	0.975	0.955
Control		12.1	7.7	5.3	7	9	10
EtOH 95%		11.1	6.7	4.5	9	13	16
BHA	0.5	4.5*	3.5*	1.9*	30*	29*	32*
BHA	1.0	2.0*	1.6*	0.8*	53*	67*	89*
BHA	5.0	-	-	-	-	-	-
BHA	10.0	-	-	-	-	-	-

\* Diferente significativamente con respecto al tratamiento control ( $P < 0.001$ ), *F* test

Este estudio muestra que existe potencial para el control del crecimiento de *F. verticillioides* usando un antioxidante usado en la industria alimenticia bajo un amplio rango de  $a_w$ . Las concentraciones de BHA  $\geq 5 \text{ mmol l}^{-1}$  inhibieron completamente el crecimiento en todos los valores de  $a_w$  evaluados. Debido a que este antioxidante se usa en la industria alimenticia, podría tener útiles aplicaciones en los diferentes materiales destinados al procesamiento de alimentos para consumo humano.

Actualmente se está analizando el contenido de fumonisinas en todos los tratamientos evaluados para determinar si las concentraciones de BHA a distintas condiciones de  $a_w$ , además de inhibir el crecimiento de *F. verticillioides*, también inhiben la producción de dicho metabolito tóxico.

Por otro lado, se prevé completar el presente estudio y evaluar la capacidad fungicida de los extractos de *L. exaltatus*.

## Bibliografía

- Arias, G. A.; García, L. P.; Ruiz, L. M.; Wysocka, W. (2002). Inhibition in *Fusarium* growth by a new lupanine thionaloge, (+)-2-thinosparteine and (+)lupanine. En: E. van Santen, M. Wink, S. Weissman and P. Romer (eds.). Lupin, an ancient crop for the new millennium. Proc. Of the 9<sup>th</sup> International Lupin Conference. Klink/Muritz, 20 – 24 June, 1999. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Doko, B.; Rapior, S.; Visconti, A.; Schjoth, J. (1995). *J. Agric. Food Chem* 43: 429-434.
- Etcheverry, M.; Torres, A.; Ramírez, M. L.; Chulze, S.; Magan, N. (2002). *J. Appl. Microol.* 92:624-632.
- Nelson, P. E. (1992). *Mycopathologia* 117: 29-36.
- Reynoso, M. M.; Torres, A.; Ramírez, M.; Rodríguez, M.I.; Chulze, S.; Magan, N. (2002). *Mycol Res* 106: 1093-1099.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2003). <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Scott, P.; Trenholm, H.; Sutton, M. (1985). *Nat. Res. Corencil.*
- Shephard, G. S.; Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A. (1990).. *J. Liq. Chromatogr* 13: 2077-2080.
- Thompson, D. P. (1991). *Mycologia* 54: 375-377.
- Torres, A. M.; Ramírez, M. L.; Arroyo, M.; Chulze, S. N.; Magan, N. (2003). *Intern J. Food Microb.* 83:319-324.
- Wink, M. (1993). *Methods in plant biochem.* 8: 197-239.
- Zamora, C.; Virgen, G.; Bernal, A. A.; Fausto, G. S.; Ruiz L., M. A. (2002). INE van Santen (ed.) Wild and Cultivated *Lupinus* from the Tropics to the Poles. 19 24 June International Nupin Association. Canterbury, New Zeland.