

ESTUDIO DE LA EFICACIA DE CUATRO METODOS DE INOCULACION ARTIFICIAL CON *ASPERGILLUS FLAVUS* LINK EX FRIES EN SEIS GENOTIPOS DE MAIZ (*ZEA MAYS* L) BAJO CONDICION DE CAMPO

Miguel Quesada
German Rivera
Fabio Blanco
Carlos Araya

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

RESUMEN

Cuatro diferentes métodos de inoculación fueron probados en seis genotipos de maíz, bajo condiciones de campo. En todos los casos se aplicó un ml. de una suspensión de 5×10^5 conidios por mililitro, usando los siguientes métodos: inyección con una aguja hipodérmica en la parte central de la mazorca (M_1), inyección en el canal de los estigmas (M_2), deposición del inóculo sobre una sección de la mazorca herida con agujas (M_3) y deposición del inóculo sobre los estigmas (M_4). De acuerdo con el análisis estadístico, el método más eficiente fue M_3 , seguido por M_1 , M_4 , y M_2 . *Fusarium* spp. y *A. flavus* mostraron una correlación negativa altamente significativa ($p > 0.01$) entre ellos. Los métodos donde el inóculo fue ubicado en la parte superior de la mazorca mostraron una mayor competencia de *Fusarium* y otros hongos con *A. flavus*, así como una menor eficacia. No hubo diferencias estadísticas significativas entre los genotipos.

ABSTRACT

Four different inoculation methods were tested on six corn genotypes, under field condition. In all cases 1 ml. of 5×10^5 conidial suspension was applied, as follows: injection with a hypoder-

mic needle in the central part of the ear (M_1), injection in the silk channel (M_2), inoculum deposition on a wounded section of the ear (M_3), inoculum deposition on the ear silk (M_4). According to the statistical analysis the most efficient method was M_3 , followed by M_1 , M_4 , and M_2 . *Fusarium* spp and *A. flavus* showed a significant negative correlation ($p > 0.01$) among them. Methods where inoculum was placed on the upper part of the ear showed more *Fusarium* and other fungi competition with *A. flavus*, and less efficiency. No statistical difference was found among genotypes.

INTRODUCCION

Los estudios fitopatológicos del maíz en Costa Rica se han orientado principalmente a las enfermedades en el campo, dedicándose muy pocos recursos a la investigación en poscosecha. Debido al volumen actual de producción y a las importaciones hechas, poco a poco se ha comenzado a prestar atención a los problemas de origen fungoso en el maíz almacenado. Uno de los principales hongos que actúa como agente causal de esos problemas es *Aspergillus flavus* Link ex Fries, el cual no solamente deteriora el grano, sino que también produce sustancias conocidas comúnmente como aflatoxinas. Estos compuestos son altamente tóxicos y se les considera como potentes agentes del

cáncer en animales y humanos (Christensen y Kaufmann, 1976). Según un estudio preliminar de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 1977), en Costa Rica y República Dominicana existe el problema de aflatoxinas en el maíz y probablemente éste sea común al resto de naciones del área. Tanto el clima como las formas de cosecha y almacenamiento usados en estos países, brindan las condiciones propicias para que *A. flavus* se desarrolle y produzca toxinas.

Por investigaciones previas realizadas en otros países (Rambo et al, 1974; Lillehoj, 1975; Cristensen y Kaufmann, 1976; Jones et al, 1980) se conoce que el grano es infectado en el campo, especialmente bajo condiciones de alta humedad y temperatura cálidas, desarrollándose rápidamente después de la cosecha y antes del secado, o cuando éste es deficiente. Debido a que no siempre se cuenta con las facilidades necesarias para combatir la infección por medio del secado y el buen almacenamiento, se está buscando en la actualidad la forma de usar variedades resistentes a la penetración de *A. flavus* (FAO, 1977). El primer paso en esta búsqueda de fuentes de resistencia genética es la selección de un método de inoculación artificial que permita evidenciar en forma eficiente la respuesta de los genotipos probados.

Este trabajo pretende evaluar la eficacia de infección, a nivel de campo, de cuatro métodos de inoculación en seis genotipos de maíz.

MATERIAL Y METODOS

Material genético utilizado

Seis genotipos de maíz fueron seleccionados para este ensayo: Tuxpeño, Tocuemen, X-107 A, Tico V₁ y la quinta generación resultante del cruce entre la variedad mejicana Nuevo León VS 1e y el híbrido Tico H-5. Esta generación se encuentra en proceso de selección, como parte del programa de mejoramiento del maíz, que realiza la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional.

Ensayo de campo

Las parcelas experimentales se plantaron el 10 de julio de 1982 en la Estación Experimental Santa Lucía de la Universidad Nacional, situada en Santa Lucía de Barva, provincia de Heredia, a una altura de 1.200 msnm. con una precipitación de 2.000 a 2.500 mm. y una temperatura de 19 a 20°C, como promedios anuales, respectivamente

(Costa Rica, Instituto Meteorológico Nacional, 1982).

Los tratamientos consistieron en un arreglo factorial de seis genotipos y cuatro métodos de inoculación. Se empleó un diseño completamente aleatorio con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo formada por cinco hileras de diez plantas cada una, sembradas a 0.80 m. entre sí y 1.00 m. entre hileras. La inoculación se realizó únicamente en las tres hileras centrales.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de un aislamiento puro preservado en sílica gel y suministrado por el Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Missouri-Columbia. El cultivo inicial se realizó en cinco platos Petri con papa-dextrosa-agar (PDA), incubándose en la oscuridad por 10 días a 25°C.

La extracción de conidios se efectuó agregando 10 ml. de agua destilada estéril con dos gotas del dispersante Tween 20, a dos de los cultivos mejor desarrollados. Luego, utilizando un agitador de vidrio, se removió la mayor cantidad posible de conidios. La suspensión final se filtró a través de gasa sobre un erlenmeyer de 1.000 ml. y se ajustó a una concentración de 5×10^5 conidios por ml., haciendo uso de un hematocímetro óptico de Neubauer.

Inoculación en el campo

La inoculación se realizó a los 20 días después de alcanzarse el 50 % de la floración, utilizando cuatro métodos diferentes, a saber:

M₁: Consistió en aplicar 1 ml. de la suspensión de esporas a través de las brácteas y en la parte central de la mazorca, empleando para ello una aguja hipodérmica.

M₂: Se inyectó 1 ml. de la suspensión en el punto de emergencia de los estigmas (extremo superior de la mazorca).

M₃: Se abrieron algunas brácteas de la mazorca, con el fin de exponer los granos y hacerles heridas. Para esto, se utilizó un tapón de hule número ocho con 25 agujas de acero que fueron insertadas en la parte central de la mazorca. Luego se aplicó 1 ml. de la suspensión, depositado en forma de gotas sobre la zona lesionada. Finalmente se cerró la mazorca, colocando las brácteas en su posición original y sujetándolas con una banda de hule.

M₄: Consistió en aplicar 1 ml. de suspensión en forma de gotas depositadas directamente sobre los estigmas expuestos.

Recolección y procesamiento de las muestras

La cosecha de las mazorcas se realizó 15 días después de la inoculación, escogiéndose aleatoriamente cuatro de las diez mazorcas inoculadas en cada unidad experimental. Este material se llevó al laboratorio, donde se procedió a remover las brácteas y extraer los granos cercanos a la zona inoculada. Finalmente se escogió al azar una muestra de 25 granos por mazorca, que se colocaron en platos Petri. Este material se introdujo en una estufa regulada a 32°C por un período de tres días, al cabo de los cuales se procedió a la determinación de los granos infectados.

El procedimiento seguido para detectar la infección, consistió en desinfectar superficialmente los granos con hipoclorito de sodio (NaClO), al 0.5 % durante tres minutos. Seguidamente, se lavaron dos veces consecutivas en agua destilada estéril para remover excesos de NaClO. Posteriormente, dentro de una cámara de transferencia, se colocaron en platos Petri que contenían PDA sólido y acidificado con dos gotas de ácido láctico al 25 %. Por cada plato se colocó un máximo de diez granos suficientemente separados entre sí.

La incubación se realizó por espacio de cinco días a una temperatura de 25°C. Al final del período se contabilizó el número de granos infectados con *A. flavus*, así como de otros hongos que aparecen comúnmente en granos procedentes del cam-

po. La identificación de los hongos se hizo inicialmente con ayuda del microscopio y luego por simple inspección visual.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se presentan los porcentajes de granos infectados por *A. flavus* y por otros hongos, ordenados según el método de inoculación. En este cuadro se observa que el hongo inoculado fue el que mostró los porcentajes más altos de infección, excepto en el segundo método. En este caso, *Fusarium spp* fue el que se desarrolló en poco más del 50 % de los granos examinados. El cuarto método también dio como resultado un alto porcentaje de granos con *Fusarium spp*, pero sin superar el hongo inoculado artificialmente. En los otros dos métodos no se presentó mayor interferencia de este hongo, obteniéndose altos índices de infección por *A. flavus*. Estos resultados indican que existe una estrecha relación entre la zona inoculada y la presencia de *Fusarium spp*, pues los métodos donde se aplicó la suspensión de conidios sobre los estigmas (M₂) o en la base de éstos (M₄), fueron los que mostraron mayor porcentaje de granos infectados por este hongo; lo que es explicable dado que *Fusarium* penetra por los estigmas (Fernández, 1982). Por el contrario, cuando el inóculo se inyectó (M₁) o se aplicó sobre heridas en la parte central de la mazorca (M₃), se obtuvo un bajo porcentaje de ese hongo. Esto sugiere que es más conveniente hacer las inoculaciones artificiales hacia el centro de las mazorcas, para evitar la infección por otros hongos diferentes al inoculado.

En cuanto a la eficacia de los métodos de inoculación, se obtuvieron diferencias estadísticas

CUADRO 1

PORCENTAJE DE GRANOS INFECTADOS POR *ASPERGILLUS FLAVUS* Y OTROS HONGOS EN CADA UNO DE LOS METODOS DE INOCULACION

Método	<i>A. flavus</i> *	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Aspergillus**</i>	Sin infección	total
M ₁	60.83	4.14	3.06	0.14	0.68	31.13	100
M ₂	20.65	51.88	0.11	0.88	0.21	26.26	100
M ₃	94.82	3.15	0.04			1.08	100
M ₄	54.32	40.29		0.05		5.33	100

* Todos los porcentajes de infección con este hongo son significativamente diferentes entre sí, según prueba DMS ($p > 0.01$).

** Otras especies de *Aspergillus* diferentes a *A. flavus*.

CUADRO 2

PORCENTAJE DE GRANOS INFECTADOS POR *A. FLAVUS* Y OTROS HONGOS EN LOS GENOTIPOS DE MAIZ UTILIZADOS.

GENOTIPO	<i>A. flavus</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Asprgillus spp.</i>	Sin Infectar	Total
Tuxpeño	66.46	15.50	0.60	1.09	0.48	15.76	100
Tocumen	61.68	20.31	0.49	0.16	.	17.34	100
X 105 A	54.30	23.37	1.39	0.40	0.15	20.39	100
X 107 A	54.40	27.30	1.09	0.75	0.75	16.38	100
Tico V 1	50.03	25.52	1.45	0.07	0.07	22.83	100
H ₅ *	48.84	36.09	0.33	—	0.05	14.66	100

* Quinta generación resultante del cruce entre la variedad mejicana Nuevo León VS-1e y el híbrido Tico H-6.

altamente significativas al compararlos entre sí, según la prueba de Fischer. El método que consistió en depositar la suspensión de esporas, luego de herir los granos con agujas (M₃) resultó ser el más eficiente al compararlo con los demás; en relación con el número de granos infectados en cada observación le siguieron en orden descendente, el método de inyección en la parte central de la mazorca (M₁), el de deposición de los estigmas expuestos (M₄) y el de inyección en el punto de emergencia de los estigmas. Esto reafirma lo expresado anteriormente, respecto de la ubicación del inóculo en la mazorca, puesto que los métodos donde se hizo la aplicación en la parte central, mostraron mayor eficiencia que aquellos donde se aplicó en la parte superior. Otro factor que actuó como determinante en la penetración de *A. flavus*, fue la presencia de heridas en los granos, hechas en el M₃, las que permitieron incrementar la eficacia, tal y como lo sugiere Rambo et al (1974). Al método 1, no obstante ser menos eficiente que el anterior, podría introducirse alguna variante con el fin de evitar la concentración del inóculo en un área muy pequeña, debido a que ésta es su principal limitante. Sin embargo, es un método sumamente rápido que facilita mucho el trabajo en el campo. Los otros dos métodos presentaron problemas debido principalmente a la gran actividad fungosa que se da en los estigmas o la base de los mismos, compitiendo con el hongo inoculado.

Por lo anteriormente expresado y bajo las condiciones experimentales en que se realizó esta prueba, el método más eficaz fue el de herir los granos centrales de la mazorca y luego depositar la suspensión de inóculo sobre ellos (M₃). Este método

tiene la desventaja de no permitir la manifestación de resistencia morfológica dada por la dureza de pericarpio, presente en algunas variedades (Rambo et al, 1974; Zuber et al, 1978). Pero a su vez permite detectar otras formas de resistencia que pueden tener las plantas, a pesar de las heridas provocadas por insectos (La Prade y Manwiller, 1975) y aves (King y Scoth, 1975) que incrementan la infección por *A. flavus*.

Los genotipos probados manifestaron, según se aprecia en el Cuadro 2, que en aquellos donde se presentó la mayor infección por *Fusarium spp.*, fue donde hubo menores porcentajes de *A. flavus* y viceversa. Esta aparente relación entre ellos, hizo que se investigara una posible correlación, obteniéndose un valor negativo altamente significativo ($p > 0.01$), para los cuatro métodos de inoculación. Lo anterior indica la posibilidad de que estos organismos se inhiban uno al otro y que la prevalencia depende de cuál de los dos se establezca primero; lo que no implica que sean completamente excluyentes, pues en los seis genotipos un alto porcentaje de granos fueron infectados simultáneamente por ambos patógenos. La incidencia de los dos hongos parece indicar que se trata de un caso de competencia por el sustrato y no de antibiosis; lo cual concuerda con lo expresado por diversos autores (Diener y Davis, 1966; Stoloff et al, 1975; Lillehoj et al, 1976; Fernández, 1982).

Independientemente del método utilizado, todos los genotipos fueron igualmente susceptibles al hongo inoculado, pues no hubo diferencias estadísticas significativas entre ellos. Aunque la genera-

ción F₅ mostró cierta tolerancia al hongo, esto pudo deberse al alto porcentaje de granos infectados por *Fusarium spp.* Los resultados de este experimento indican que en futuras pruebas deben con-

siderarse métodos de inoculación donde se hagan heridas, aplicando el inóculo en zonas de la mazorca relativamente alejadas del ápice para evitar el efecto competitivo de *Fusarium spp.*

LITERATURA CITADA

- CRISTENSEN, C.M. y KAUFMANN, H.H. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados. México, D.F. PAX. 199 pp.
- COSTA RICA, INSTITUTO METEOROLOGICO. 1982. Registro de datos. San José. s.p.
- DIENER, V.L. and DAVIS, N.D. 1966. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. Phytopathology. 53: 1.390-1.393.
- FAO. 1977. Perspectiva sobre micotoxinas. Conferencia mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotocinas, Nairobi, Kenya. Roma. FAO. 182 pp.
- FERNANDEZ, V.A. 1982. Comparación de métodos de inoculación de *Aspergillus flavus* Link., en cultivos de maíz (*Zea Mays* L.) mediante análisis de micoflora. Tesis Ing. Agr., San José, 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 SCOTH, G.E. 1975. Field inoculation techniques to evaluate maize for reaction to kernel infection by *Aspergillus flavus*. Phytopathology. 66: 675-677.
- LA PRADE, J.C. and MANWILLER, A. 1975. Relation of insect damage vector and hybrid reaction to aflatoxin B₁ recovery from field corn. Phytopathology. 67: 544-547.
- LILLEHOJ, E.B. 1975. Aflatoxin production in *Aspergillus flavus* inoculated ears of corn grown at diverse locations. Crop Science. 15: 267-269.
- LILLEHOJ, E.B., FENNEL, D.I. and KNOLEK, W.F. 1976. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Iwoa corn before harvest. Crop Science. 193: 495-496.
- RAMBO, G.W., TUTTLE, J. and CRANE, P. 1974. Pre-harvest inoculation and infection of dent corn ears with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Phytopathology. 64: 797-800.
- STOLOFF, L., MISLEVEC, P. and KULIK, M.N. 1975. Susceptibility of freshly picked ears corn to invasion by fungi. Applied Microbiology. 29 (1): 123-124.
- ZUBER, M.S., CALVERT, O.H., KWOLFER, W.F., LILLEHOJ, E.B. and KANG, M.S. 1978. Aflatoxin B₁ production in an eightline diallel of *Zea mays* infected with *Aspergillus flavus*. Phytopathology. 68: 1.346-1.349.