

EFFECTIVIDAD DE FILTRADOS DE HONGOS PRESENTES EN FRUTOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) SOBRE *Fusarium moniliforme*

Janeth Reyes, Juan Pineda, Maria Elena Sanabria.

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"; Decanato de Agronomía; Postgrado de Fitopatología. Apartado 400, Cabudare, estado Lara, Venezuela. FAX: 251-2592571. janethfrancoise@hotmail.com

Resumen

Los frutos de maíz son portadores de hongos, como el caso de *Fusarium moniliforme*, que producen micotoxinas, las cuales pueden ser altamente tóxicas, por lo tanto es necesario controlar su presencia en los mismos. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la efectividad de filtrados puros de hongos presentes en frutos de maíz sobre dicho patógeno. De muestras provenientes de localidades de los Estados Lara, Yaracuy y Portuguesa, se obtuvo la micobiota: *Aspergillus niger*, *A. ustus*, *A. heterotallicus*, *F. moniliforme* y *Trichoderma* sp. los cuales fueron cultivados en APD, luego se transfirió un disco de agar con micelio de cada uno de ellos a los medios líquidos Gliotoxin y Melaza-Levadura y se colocaron en agitación, 2 horas diarias por 15 días; posteriormente se realizó la separación del micelio filtrando con la ayuda de papel de filtro y filtro miliporo. Las pruebas se hicieron en diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} contra *F. moniliforme*. Se determinaron los metabolitos secundarios (MS) presentes. Los resultados demuestran que hubo diferencias significativas cuando se probó con filtrados producidos en melaza levadura, obteniéndose una reducción del crecimiento micelial de *F. moniliforme*, siendo mejores los tratamientos *A. ustus* y *A. niger*, a la mayor concentración, aunque para *A. heterotallicus* y *Trichoderma* sp. los valores de inhibición fueron más estables en las tres diluciones. En los filtrados se detectaron alcaloides débilmente básicos, básicos, sales cuaternarias de amonio, taninos y polifenoles.

Palabras clave: Micotoxinas, Biocontrol, Metabolitos Secundarios, *Zea mays*.

Summary

Filtrate effectiveness of fungi in maize fruits (*Zea mays* L) on *Fusarium moniliforme*

The maize fruits can be carrying of some fungi as *Fusarium moniliforme*, producer of micotoxinas, which can be highly toxic, therefore it is necessary to control its presence on the grain. The objective of this investigation was to evaluate the effectiveness on this pathogen of filtrates pure of fungi stablished in maize fruits. In fruit maize samples from Lara state, Yaracuy state and Portuguesa state, was obtained the micobiota (*Aspergillus niger*, *A. ustus*, *A. heterotallicus*, *F. moniliforme* and *Trichoderma* sp); these fungi were cultivated in PDA and once obtained the cultures on agar disc with micelia of each fungus was transferred to the Gliotoxin and Molasses-yeast liquid media and were placed in agitation, 2 hours daily by 15 days; the separation of micelia of the fungus was made leaking with the aid of filter paper and milipore filter. The filtrates were proved in 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions against *F. moniliforme*. Secondary metabolites were determined. The results demonstrate significant differences when was proved with filtrates produced in the molasses-yeast media, obtaining a reduction of the micelial growth of *F. moniliforme*, being better *A. ustus* and *A. niger* treatments at the higher concentration, to *A. heterotallicus* y *Trichoderma* sp. the inhibition values were more stables in the three dilutions. Were detected weakly basic alkaloids, basic, quaternary ammonium salts, tannins and polifenoles in the filtrates.

Key words: Micotoxins, Biocontrol, Secondary Metabolites, *Zea mays*.

Introducción

La calidad de los frutos está determinada por eventos que ocurren antes de la cosecha. Desde su formación en la planta madre en el campo, hasta su transformación en alimentos, están expuestos a la acción de factores bióticos

y abióticos que condicionan la calidad de los mismos y que pueden ocasionar su deterioro acelerado, dependiendo del número y la intensidad de ellos actuando simultáneamente. Los hongos han recibido especial atención por sus implicaciones tanto en la disminución de la calidad de los frutos, como en salud pública y animal (Mazzani 2002).

Cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de microorganismos, los mohos que proliferan sobre los frutos son una de las principales causas de las pérdidas. El deterioro y la contaminación con micotoxinas alcanzan altos niveles en las regiones tropicales húmedas, particularmente en Venezuela, donde no se dispone de estadísticas exactas sobre pérdidas durante la post-cosecha y se estima que un 25 % del maíz, sorgo y arroz producido resulta altamente deteriorado (Mazzani 2002).

En los frutos infectados con *Fusarium moniliforme* se producen diferentes tipos de fumonisinas, las cuales son altamente tóxicas para humanos y animales, pudiendo también ser cancerígenas y es quizás el hongo más perjudicial en nuestras condiciones porque invade a la planta en forma sistémica y de allí pasa a los frutos (Mazzani *et al.* 2000, Mazzani 2001).

La contaminación con micotoxinas no es el único aspecto de interés en la infección de frutos por hongos toxigénicos y atoxigénicos, ya que durante su crecimiento producen cambios desfavorables que alteran el valor nutritivo, disminuyen el contenido de grasas, proteínas y carbohidratos; decoloran y manchan total o parcialmente los frutos y alteran las características organolépticas, comunicando a los granos sabores y olores atípicos. Aunado a esto ocasionan la muerte del embrión, aspecto de interés en aquellos donde la pre-germinación es importante para la industria (Jugenheimer 1990).

A juicio de Cantoral (2000) la diversidad característica de los hongos incide como efectos contrarios sobre la actividad humana, algunos son grandes productores de metabolitos secundarios (MS) que el hombre ha sabido explotar, sin embargo otros causan daños considerables, especialmente en el campo de la agricultura. Debido a las repercusiones industriales y económicas, se hace necesario su estudio en dos facetas, como agentes fitopatógenos, en el caso de *Fusarium*, así como en el antagonista *Trichoderma* y también como productores de MS de gran valor comercial en el caso de *Penicillium* y *Acremonium*.

La aparición de cepas de hongos fitopatógenos resistentes a una gran variedad de fungicidas químicos, ha hecho que las dosis empleadas sean cada vez mayores, con la consiguiente persistencia de los mismos y una mayor preocupación por el medio ambiente, sin descartar su elevado costo; esto ha hecho que en la actualidad se planteen métodos más racionales de biocontrol, mediante la utilización de fungicidas de naturaleza biológica que evitarían los efectos secundarios de los químicos, potenciados por la utilización conjunta de microorganismos con actividad antifúngica (Cantoral 2000).

Por lo anteriormente expuesto surgió la necesidad de buscar vías para controlar estos hongos y sus posibles efectos, planteándose como objetivo el conocer el efecto de los filtrados de hongos presentes en la superficie de frutos de maíz, sobre el patógeno productor de

micotoxinas *F. moniliforme* y determinar los metabolitos secundarios (MS) presentes en los filtrados obtenidos.

Materiales y Métodos

A. Aislamiento e identificación de hongos presentes en frutos de maíz (*Zea mays* L.)

A partir de una muestra consistente de 1 kg de maíz provenientes de campo en Sanare, estado Lara; silos de Promasa, en Yaracuy y de Proarepa, en Portuguesa, Venezuela, se seleccionaron cuatro frutos y se colocaron en placas Petri conteniendo medio Agar Papa Dextrosa (APD) para obtener la microbiota presente en los mismos. Se realizaron dos tratamientos: para el primero se desinfectaron los frutos con hipoclorito de sodio (10%) por 1 min, luego se procedió a lavarlos con agua destilada estéril (ADE) y se colocaron en papel absorbente estéril para el secado rápido de los mismos; el segundo tratamiento se realizó sin desinfección.

Las cepas aisladas fueron identificadas a nivel de género a través de la clave de Barnett & Hunter (1972). Para las especies de *Aspergillus* (Raper & Fennell 1977) se tomó un disco de micelio de cada uno de los aislamientos de este hongo y se cultivaron en Agar Czapek's. Las cajas fueron incubadas por 7 a 10 días a $\pm 26^\circ\text{C}$.

Mediante la observación macroscópica se describió el desarrollo de las colonias durante 10 días en los medios citados, determinándose el color, presencia y/o ausencia de exudados, color del medio de cultivo al reverso de las placas Petri y se midió el diámetro de la colonia con la ayuda de una regla milimetrada. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiostar, provisto de una escala con la cual se midió la longitud y el diámetro de los conidióforos, de las vesículas y de las conidias de los hongos aislados.

B. Obtención de los filtrados puros de hongos

Este ensayo se realizó en los medios de cultivo líquido Gliotoxin y Melaza-Levadura contenidos en matraces de 250 cc, esterilizados en autoclave a 121°C y 15 psi de presión durante 20 min, se inocularon con un disco de micelio de cada hongo (*Aspergillus niger*, *A. heterothallicus*, *A. ustus* y *Trichoderma* sp), luego de dos días se colocaron en agitación por 2 h diarias, durante 15 días, para proveer de oxígeno al hongo y desplazar los MS formados en la parte superior del medio.

Para obtener un filtrado puro se separó el cuerpo del hongo del medio de cultivo mediante filtrado, con la ayuda de gasa estéril, papel de filtro Whatman No. 1 y No. 4 y un filtro miliporo de porosidad $0,2\ \mu\text{m}$, utilizando una bomba de vacío Gast^{MR}.

Para verificar la pureza de los filtrados se tomó 1 ml de los mismos y se colocó en placas Petri con APD, incubándose por 3 días. El no desarrollo de los hongos (*A. niger*,

A. heterothallicus, *A. ustus* y *Trichoderma* sp.) en el medio de cultivo fue indicativo de la pureza de los mismos; posteriormente fueron mantenidos a 8 °C, para conservarlos y utilizarlos en la determinación de MS y las pruebas de efectividad in vitro contra *Fusarium moniliforme*.

C. Determinación de metabolitos secundarios

En los filtrados fúngicos puros se determinó la presencia de MS de forma cualitativa siguiendo la metodología recomendada por Marcano & Hasegawa (1991).

Los alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio se determinaron agregándole a una pequeña cantidad de los filtrados ácido clorhídrico (HCl) al 10%, la mezcla se agitó con cloroformo, lográndose la separación de dos fases; la acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio (NH₄OH) y se extrajo con cloroformo, obteniéndose dos nuevas, las cuales junto a la primera se analizaron por separado para los tres tipos de alcaloides utilizando el reactivo de Meyer y de Dragendorff (Marcano & Hasegawa 1991).

Los Polifenoles y Taninos se detectaron por la aparición de una coloración parda al agregarle al filtrado una solución de cloruro férrico (1%). Para corroborar estos resultados se trató el filtrado con solución de gelatina (1%) en cloruro de sodio (NaCl) de igual concentración. La formación de un precipitado fue evidencia positiva de su presencia.

Las saponinas se determinaron por medio de agitación manual del filtrado; la aparición de una espuma consistente, que permaneció durante 20 min, contados desde el momento en que se dejó reposar la mezcla, demostró la presencia de estos MS.

Para detectar las antraquinonas se trató el filtrado con hidróxido de potasio (KOH) 0,5%, luego se acidificó con ácido acético, se agitó con benceno y se alcalinizó con hidróxido de amonio (NH₄OH). La aparición de una coloración rojiza, indicó la presencia de estos MS.

La detección de los flavonoides se realizó tratando el filtrado con HCl concentrado y virutas de magnesio. La reacción se consideró positiva si se producía una coloración rojiza al dejar en reposo la mezcla durante 20 min. Una segunda prueba consistió en colocar una gota del filtrado sobre un papel de filtro y se roció con cloruro de aluminio (1 %); la aparición de una mancha amarilla fosforescente al colocarlo bajo luz UV, corroboró los resultados obtenidos en la primera prueba.

D. Pruebas de efectividad de los filtrados fúngicos

Se realizaron contra *Fusarium moniliforme* y se hicieron 4 repeticiones por tratamiento, las cuales consistieron en diluciones seriadas de 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ colocadas 2,5 ml de cada una en 10 ml de medio PDA líquido a +/- 50 °C. Una vez solidificado el medio se procedió a inocularlo con un disco de micelio del hongo en el centro de la placa Petri.

Se midió el desarrollo micelial durante 7 d o hasta que en el tratamiento testigo llenara el plato completamente.

El análisis de los resultados se realizó en un diseño estadístico completamente aleatorizado, para el análisis de varianzas se utilizó el programa STATISTIX versión 2 para un 5% de probabilidad del error; la comparación de medias por tratamiento se realizó mediante la prueba de Tukey.

Resultados y Discusión

A. Aislamiento e identificación de hongos presentes en frutos de maíz (*Zea mays* L.)

Luego de cinco días de incubación de las placas Petri conteniendo APD y los frutos de maíz provenientes de campo (Sanare, estado Lara); silos de Promasa, (estado Yaracuy) y de Proarepa (estado Portuguesa), desinfectados y sin desinfectar se observó el desarrollo de colonias fúngicas con diferentes características, tanto a partir de los primeros como de los segundos y en estos últimos la incidencia fue mayor, debido a que muchos hongos se encuentran en el ambiente y crecen en la superficie de los mismos, observándose la mayor en aquellos provenientes Portuguesa (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de frutos de maíz (*Zea mays* L.) con hongos, en muestras provenientes de los estados Lara, Yaracuy y Portuguesa.

Tratamientos	Lara	Yaracuy	Portuguesa
Frutos desinfectados	49%	60%	75%
Frutos sin desinfectar	93%	82%	100%

De los aislamientos se obtuvieron cinco especies de hongos, las cuales correspondieron a:

- *Especie 1.* Las colonias con macroconidias largas y paredes muy delgadas; en su mayoría con tres septos y producidas en conidioforos largos y angostos. Microconidias dispuestas en cadenas largas y no se formaron clamidosporas. El medio de cultivo de color violáceo y el diámetro de la colonia fue de 9 cm a los 10 d. Estas características se correspondieron con las descritas por Toussoun & Nelson (1976) y Booth (1977) para *Fusarium moniliforme*.
- *Especie 2.* Las colonias jóvenes con un micelio blanco, la coloración amarillo pálido y en las adultas con el centro marrón y gris oliváceo, con marcadas áreas marginales. El diámetro de las colonias fue de 4 cm a los 10 d. Los exudados fueron amarillos y al reverso de la placa se observó una coloración amarillo-naranja, la cual se oscureció con la edad. Los conidioforos jóvenes sin pigmentación, sobre el sustrato de las hifas; con 5 µm de diámetro y 16,25 µm de largo; las vesículas con 0,75 µm de ancho y 1 µm de largo,

de globosas a subglobosas, rectas en el conidióforo y cubiertas por esterigmas incoloros en dos series, siendo los secundarios en forma de botella. Las conidias globosas de 1 μm de diámetro, notándose en la cicatriz de unión células de hulle abundantes, esparcidas en la masa de la colonia sin relacionarse con el color del micelio, desde periformes hasta elongadas; correspondiendo estas características a las que describió Raper & Fennell (1977) para *Aspergillus ustus*.

- *Especie 3.* Colonias jóvenes con coloración de crema a amarillo; con un cambio de color gris marrón en el centro, por la presencia cabezas conidiales en ésta área y un diámetro de colonias de 4 cm a los 10 d. Se observó un exudado amarillo, esta misma coloración se presentó al reverso de la placa, oscureciéndose al pasar el tiempo hasta una vinácea. Las células de hulle variables de globosas a subglobosas; los esterigmas en dos series, los secundarios en forma de botella; conidias globosas, verde amarillentas con un diámetro de 2,5 μm . Estas características se correspondieron con las señaladas por Raper & Fennell (1977) para *Aspergillus heterothallicus*.
- *Especie 4.* Las colonias negras, con un diámetro de 8 cm a los 10 d de cultivo. Las cabezas conidiales de color carbón, formas globosas, conspicuas, con ondulaciones y columnas bien definidas y conidias en cadenas con 0,5 μm . Los conidióforos marrones de 0,88 μm de diámetro; las vesículas globosas con un diámetro de 2,33 μm . Estas características correspondieron a las descritas por Raper & Fennell (1977) para *Aspergillus niger*.
- *Especie 5.* Las colonias con crecimiento rápido produciendo conidióforos ramificados repetidamente; las filides divergentes, en forma de frasco, las conidias de hialinas a verdes y con las paredes lisas o rugosas; las clamidosporas generalmente hialinas en los cultivos viejos. Estas características se correspondieron con las descritas por Gilman (1971) para *Trichoderma sp.*

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pineda & Carrasco (1997a, b), quienes encontraron en frutos de maíz colectados en el estado Lara a *Penicillium sp.*, *Curvularia sp.*, *Alternaria sp.*, *Bipolaris sp.* y *F. moniliforme*. Del mismo modo con Raybaudi *et al.* (2000) quienes a partir de muestras adquiridas en el mercado mayorista de Caracas, encontraron que un 58% de la muestra

presentó *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Por otra parte Mazzani *et al.* (2001) encontraron un alto porcentaje de hongos, entre los cuales destacó *A. flavus*, con incidencia de 19,5 a 55,8%, además se encontraron *F. moniliforme* entre 9 y 31% y otros hongos no identificados, con incidencia de 54,5 a 82,5%.

B. Obtención de los filtrados puros de hongos

En la superficie del medio líquido se evidenció un denso desarrollo del micelio de los hongos *Aspergillus niger*, *A. heterothallicus*, *A. ustus* y *Trichoderma sp.* y un cambio de color del medio Gliotoxin a amarillo verdusco, en el medio Melaza-Levadura no se observó cambio debido a su color oscuro.

Gutiérrez *et al.* (2000), Raybaudi *et al.* (2000) y Torrenegra & Baquero (2003) obtuvieron filtrados puros a partir de aislamientos de *Trichoderma sp.* y *P. verrucosum* en medio Papa-dextrosa y Melaza-levadura, con la finalidad de producir MS y biopreparados que pudieran ser utilizados para el control de otros hongos.

C. Determinación de Metabolitos secundarios

Los resultados de la aplicación de las pruebas químicas para la determinación de los MS en filtrados de *Aspergillus heterothallicus*, *A. niger*, *A. ustus* y *Trichoderma sp.* se muestran en el Tabla 2. Se detectó la presencia de alcaloides básicos, débilmente básicos, sales cuaternarias de amonio, taninos y polifenoles en todos los filtrados obtenidos de los hongos ya mencionados.

Tomando en consideración lo establecido por Izco (1997), la presencia de los alcaloides débilmente básicos, básicos, sales cuaternarias de amonio, taninos y polifenoles tiene mas valor que la ausencia de antraquinonas y flavonoides; sin dejar de considerar la posibilidad de que los compuestos ausentes sean sintetizados por el hongo en fases distintas al ciclo vital, o que los resultados estén influenciados por la variación estacional o diaria en la producción de estos MS. También pudo haber ocurrido la destrucción del compuesto durante las fases previas a su extracción e identificación.

Estos resultados coinciden con lo señalado por Cantoral (2000) y Gutiérrez *et al.* (2000) en el sentido de que los hongos, entre los cuales se incluyen *Aspergillus*, *Penicillium* y *Acremonium*, producen gran variedad de MS y

Tabla 2. Pruebas químicas para determinación de metabolitos secundarios (MS) en filtrados de *Aspergillus heterothallicus*, *A. niger*, *A. ustus* y *Trichoderma sp.* DB: Débilmente básicos; B: Básicos; SCA: Sales cuaternarias de Amonio. + = Presencia; - = Ausencia.

Hongos	Alcaloides			Taninos	Antraquinonas	Polifenoles	Saponinas	Flavonoides
	DB	B	SCA					
<i>A. heterothallicus</i>	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>A. niger</i>	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>A. ustus</i>	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Trichoderma sp</i>	+	+	+	+	-	+	-	-

se convierten en factorías celulares que, con las modificaciones adecuadas, pueden producir estos compuestos naturales en cantidades económicamente significativas.

Se coincide además con Sutton (1996) en el sentido de que en los hongos estudiados, los MS detectados son producidos por especies del género *Aspergillus* (*A. heterothallicus*, *A. niger* y *A. ustus*); los mismos compuestos son sintetizados por *Trichoderma* sp.

A diferencia de lo señalado por Albornoz (1980) y lo obtenido por Torrenegra & Baquero (2003), en este caso no hubo variación en el tipo de producto natural sintetizado por los microorganismos. Habría que considerar lo establecido por Albornoz (1980) en el sentido de que existen factores extrínsecos e intrínsecos, pueden influir en la producción de estos compuestos.

Tomando en consideración los resultados de Torrenegra & Baquero (2003), en cuanto a que el crecimiento y la producción de MS por hongos filamentosos no están relacionados en la forma de producirlos, debido a que éstos pueden crecer con nutrientes desnaturalizados o con estructuras complejas y que, para la síntesis de estos productos naturales se necesita que los nutrientes no se encuentren alterados en sus propiedades químicas por factores como pH extremos, temperaturas altas, humedad extrema y por reacciones químicas con otros compuestos, se puede inferir que los medios Gliotoxin y Melaza-levadura y las condiciones del cultivo fueron adecuadas (Demain 1986, Demain & Davies 1999).

La determinación de MS en los filtrados de *A. heterothallicus*, *A. niger*, *A. ustus* y *Trichoderma* sp. constituye un aspecto importante a considerar cuando se trate de estudios relacionados con el combate de hongos fitopatógenos y la degradación de compuestos tóxicos, aplicaciones éstas que se le asignan a los productos naturales sintetizados por estos microorganismos y que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de otros hongos, para evitar la competencia dentro de un mismo ambiente (Vargas et al. 2002).

Entre los MS detectados, los alcaloides ya habían sido señalados por Albornoz (1980) como producidos por hongos. En cuanto a las antraquinonas y los flavonoides, aún cuando se trata de compuestos fenólicos considerados como universales, las fuentes más importantes de las primeras son los hongos *Penicillium* y algunos líquenes (Marcano & Hasegawa 2002); en el presente trabajo no fueron detectadas por el método utilizado, sin embargo habría que tener presente que las antraquinonas son consideradas como las precursoras de las aflatoxinas, las cuales representan un grupo de sustancias producidas por algunos hongos en pequeña cantidad, como MS (Previdi & Casolari 1986) o quizás el método no fue lo suficientemente sensible como para detectarlos a bajas concentraciones (Marcano & Hasegawa 2002).

Según Marcano & Hasegawa (2002) a las quinonas y xantonas se les atribuye la cualidad de tener efecto

antimicrobial y a los taninos o flavonoides poliméricos, de tener actividad biológica antibacteriana, molusquicida, antihelmíntico, antihepatóxica, antiviral, antitumoral, citotóxica e inhibidora de enzimas, lo cual permite inferir que los compuestos aromáticos (taninos y polifenoles) producidos por los hongos utilizados en este estudio, pudieron tener algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial del patógeno *Fusarium moniliforme*.

D. Pruebas de efectividad de los filtrados fúngicos

Se pudieron observar diferencias altamente significativas en el crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme* en medio melaza-levadura, tratado con filtrados puros de *Aspergillus niger*, *A. heterothallicus*, *A. ustus* y *Trichoderma* sp. (Tabla 3), lo que sugiere que las diluciones usadas fueron estadísticamente diferentes al testigo (sin filtrado) y que cualquiera de ellas tiene efecto sobre el crecimiento del patógeno.

Tabla 3. Crecimiento de *Fusarium moniliforme* en medio Melaza-Levadura en la interacción filtrado por dilución. Prueba de Tukey ($p = 0.05$). Los valores promedio identificados con la misma letra son estadísticamente iguales. ** El testigo de *Aspergillus niger* midió 7.97 cm.

Filtrados	Dilución	Crecimiento (cm)	% Inhibición
<i>A. niger</i>	10 ⁻¹	1.53 ^a	80.80
	10 ⁻²	4.20 ^d	47.30
	10 ⁻³	3.98 ^d	50.06
<i>A. heterothallicus</i>	10 ⁻¹	1.88 ^{ab}	78.99
	10 ⁻²	1.90 ^{abc}	78.77
	10 ⁻³	1.93 ^{abc}	78.44
<i>A. ustus</i>	10 ⁻¹	1.53 ^a	82.91
	10 ⁻²	5.40 ^e	39.66
	10 ⁻³	5.50 ^e	38.55
<i>Trichoderma</i> sp.	10 ⁻¹	2.43 ^c	72.85
	10 ⁻²	2.28 ^{bc}	74.53
	10 ⁻³	2.33 ^{bc}	73.97
Testigo	0	**8.95 ^g	0

La interacción filtrado por dilución fue estadísticamente significativa, en las pruebas de comparación de medias se observó que el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium moniliforme* con filtrados de *Aspergillus niger* y *A. ustus* depende de la concentración, siendo mayor la inhibición en el menos diluido, mientras que para el caso de *A. heterothallicus* y *Trichoderma* sp., los valores de inhibición fueron más estables, con poca variación dentro de las diferentes diluciones. Esto permite inferir que la concentración de los MS en las diluciones, en algunos casos, puede afectar diferencialmente el crecimiento de *F. moniliforme*.

En el medio Gliotoxin no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *F. moniliforme* con

Tabla 4. Crecimiento de *Fusarium moniliforme* tratado con filtrados de *Aspergillus niger*, *A. heterothallicus*, *A. ustus* y *Trichoderma* sp. cultivado en medio Gliotoxin. * El análisis estadístico resultó no significativo (ns). Promedio de crecimiento de *F. moniliforme* (cm).

Tratamientos (Diluciones)	<i>A. niger</i>	<i>A. heterothallicus</i>	<i>A. ustus</i>	<i>Trichoderma</i> sp
10 ⁻¹	2.76	3.85	2.85	3.6
10 ⁻²	2.87	4.48	4.2	3.9
10 ⁻³	4.46	4.63	4.4	4.4
TESTIGO (sin filtrado)	7.28	7.28	7.28	7.28
Cv	5.04%	6.52%	6.17%	5.28%

respecto al testigo (Tabla 4). El crecimiento fue similar durante la ejecución del ensayo, lo que podría significar que los MS producidos en este medio no fueron efectivos o no se produjeron en cantidades suficientes para mostrar algún efecto. Estos resultados corroboran los resultados de Weber (2000) quien encontró que el combate de hongos fitopatógenos y la degradación de compuestos tóxicos son aplicaciones que se le asignan a los productos naturales sintetizados por estos microorganismos y que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de otros hongos, para evitar la competencia dentro de un mismo ambiente.

Con respecto a *Trichoderma* sp. se comprueba lo señalado por Stefanova *et al.* (1999) en relación a que la actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo incluyendo a *Fusarium oxysporum*, a partir de metabolitos volátiles, provocaron un desarrollo menos denso y la reducción del tamaño de las colonias. Cherif & Benhamou (1990) reportan que las especies de *Trichoderma* presentan habilidades como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas. Aunado a esto Flores *et al.* (1997) señalaron que la producción activa de metabolitos extracelulares por especies de *Trichoderma* y su importancia en el biocontrol.

Conclusiones

A partir de frutos de maíz, tanto de campo como de almacenamiento, se obtuvo desarrollo de colonias fúngicas que correspondieron a mohos micotoxigénicos y otras especies inócuas que pueden competir con los anteriores por diversos mecanismos.

De *Aspergillus niger*, *A. heterothallicus*, *A. ustus* y *Trichoderma* sp. se obtuvieron filtrados puros en los cuales se detectó la producción de MS. La presencia de taninos y polifenoles en los filtrados puede ser indicativo del efecto que tienen estos MS en el control de hongos fitopatógenos.

Los filtrados obtenidos en el medio Melaza-Levadura pueden ser efectivos en el control de *Fusarium moniliforme* en frutos de maíz, aunque en las diferentes diluciones de *Aspergillus heterothallicus* y *Trichoderma* sp. los valores de inhibición fueron más estables.

Referencias

- Albornoz A. 1980. Drogas y productos naturales extraídos de plantas. Universidad Central de Venezuela (UCV). Venezuela.
- Barnett H., Hunter B. 1979. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Minneapolis. Minnesota: Burgess Publishing Company.
- Booth C. 1977. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England.
- Cantoral J. 2000. Microbiología Industrial y Micopatología. IV Congreso Nacional de Micología, Cádiz, 19-21 de Noviembre, 1998. Revista Iberoamericana de Micología 17: 529-530. S
- Cherif M, Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. Phytopathology 80(12):1406-1414.
- Demain A. 1986. Manual of industrial microbiology and Biotechnology. USA: American Society of Microbiology.
- Demain, A, Davies J. 1999. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2ª Ed. Washington D.C.: ASM Press.
- Flores A, Chet I, Herrera A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over expression of the proteinase encoding gene prb 1. curr. Genetic 31:30-37.
- Gilman J. 1971. A Manual of soil fungi. The Iowa State University Press. Ames. Iowa. USA.
- Gutierrez S, Casquero J, Martín J. 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. Revista Iberoamericana de Micología. 17: 554-560.
- Izco J. 1997. Botánica. Madrid: Mc GrawHill, Interamericana de España.
- Jugenheimer R. 1990. Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. México: Limusa.
- Marcano D, Hasegawa M. 1991. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Marcano D, Hasegawa M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Mazzani. C, Borges O, Luzón O, Barrietos V, Quijada P. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y As-

- pergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el Estado Guárico, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia 17: 185- 195.
- Mazzani C, Luzón O, Figueroa R. 2001. Incidencia de *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en granos de maíz bajo riego en Turén, Estado Portuguesa. Fitopatología Venezolana 14(2): 61.
- Mazzani C. 2001. Hongos y micotoxinas en granos y alimentos: Efectos y consecuencias. VIII curso sobre producción de maíz. Venezuela.
- Mazzani C. 2002. Aspectos epidemiológicos de la infección y formación de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. IX curso sobre producción de maíz. Venezuela.
- Pineda J, Carrasco A. 1997a. Presencia y establecimiento de *Fusarium moniliforme* en inflorescencias y mazorca de maíz. Fitopatología Venezolana 10(2): 29.
- Pineda J, Carrasco A. 1997b. Poblaciones de hongos asociados a inflorescencias y mazorca de maíz. Fitopatología Venezolana 10(2): 28.
- Previdi P, Casolari A. 1986. Le aflatoxine. Industria Conserve. 61: 366-378.
- Raper K, Fennell D. 1977. The genus *Aspergillus*. New York: Robert Krieger Publishing Company. Huntington, 686 pp.
- Raybaudi R, Amaury J, Martínez A. 2000. Incidencia e identificación de la microbiota de granos de maíz y comparación de los medios de cultivo para la determinación de mohos toxigénicos. Fitopatología Venezolana 13(1): 15-18.
- Stefanova M, Leiva A, Larrinaga L, Coronado M. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* sp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. 16:509-516.
- Sutton B. 1996. A century of mycology. USA: Cambridge University Press.
- Torrenegra R, Baquero J. 2003. Una cepa nativa colombiana de *Penicillium verrucosum* como fuente de ácido micofenólico. Memorias del XII Congreso Italo-latino Americano de etnomedicina. C015F-TQ. Rio de Janeiro; Brasil 8 al 12 de Septiembre, 108.p.
- Toussoun T, Nelson P. 1976. *Fusarium*. University of Pennsylvania.
- Vargas M, Alessandrini M, Rosso F. 2002. Estudio de la capacidad antioxidante de la corteza del pino caribe. II Simposio Internacional sobre Manejo Sostenible de los Recursos Forestales. Pinar del Río, Cuba. 24-26 abril.
- Weber R. 2000. Aplicaciones biotecnológicas de los hongos. Panorama 395.