

Estudio estructural de penetración de *Aspergillus parasiticus* al cariósido de *Zea mays*

Hernán D. Córdoba Cedeno, Ronald Echandi Zürcher†, Gonzalo Bonilla Salas

Centro Regional Universitario de Azuero, Chitre, Panamá. A.C.

†Fallecido el 1 de Junio de 1994.

Centro de Investigaciones en Nutrición Animal. Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Abstract: The foremost area of penetration of *Aspergillus parasiticus* Speare to the caryopsis of corn (*Zea mays* L.) shell and in ear, was observed through scanning electron microscopy. *A. parasiticus* colonized the epidermal tissues of the bract, the tip cap, pericarp and the remanent oi silk. In addition, the fungus colonized the tip cap tissue exposed to mechanical action of the shell, and invaded the proximal pericarp of the caryopsis in a lapse of 48 hours. The advancement of *A. parasiticus* took place mainly, through the continous intercellular spaces between the spongy parenchyma of the tip cap and the proximal pericarp. Seventy-two hours after inoculation the proximal pericarp of shelled corn, was always colonized by *A. parasiticus*; in contrast, invasion of the proximal pericarp of corn in the ear was observed only once. The results of this work indicates that the spongy tissue of tip cap normally exposed to the mechanic action of the shell, is the main area of penetration of *A. parasiticus* to the caryopsis. The results also indicate that the shelled corn is invaded more frequently than leaf on the ear.

Key words: *Aspergillus*, aflatoxin, caryopsis, parenchyma, pericarp, tip cap.

El descubrimiento de las aflatoxinas en granos de maní (*Arachis hypogaea* L.) provenientes del Brasil, realizado por los ingleses a principios de 1960, evidenció la necesidad de prestar mayor atención al estudio de los factores que favorecen el desarrollo de microorganismos en los granos, y por ende la contaminación de alimentos con compuestos de origen fungoso. A partir de dicho hallazgo, la presencia de *A. flavus*, *A. parasiticus* y de aflatoxinas en granos, y su relación con la salud animal y humana, ha sido objeto de gran atención (Goldblatt 1972, Munro 1976, Hayes 1980 y Patten 1981).

A. flavus y *A. parasiticus* son organismos de distribución universal, que causan problemas principalmente en áreas tropicales y subtropicales, debido a que las condiciones climáticas de estas zonas, son altamente favorables para su crecimiento y producción de aflatoxinas en los granos (Hesseltine 1969, Raper y Fennell 1973 y Christensen 1981).

En las zonas tropicales la invasión del cariósido o grano de maíz por miembros del grupo *Aspergillus*, es muy reducida durante la fase de campo (Montoya-Maquín y Schieber.1970, Guzmán de Peña *et al.* 1985 y Echandi 1986). Sin embargo, las condiciones climáticas imperantes unidas al manejo inadecuado del grano, que prevalece en las zonas tropicales propician en alto grado el ataque por microorganismos en la fase poscosecha (Ramírez Genel 1966, Hall 1971, Castillo-Niño 1978 y Williams y McDonald 1983).

Por las razones anteriores y por la gran demanda de maíz para uso animal y humano en el área centroamericana y en todo el Trópico Americano, queda clara la importancia de investigar el proceso de invasión de los tejidos de los granos por miembros del grupo *Aspergillus*.

Para el proceso de identificación de genotipos resistentes, resulta de gran importancia contar con información y técnicas para detectar

la penetración e invasión de los tejidos del grano de maíz por *Aspergillus*, lo cual hasta el momento ha resultado difícil debido a que, la interacción genotipo ambiente que se produce en estudios de campo, probablemente enmascara las diferencias causadas por la respuesta heredada (King y Scott 1982 y Widstrom y Zuber 1983).

Varios investigadores notaron que en zonas templadas, las vías más comunes para la penetración de *Aspergillus* al cariósido de maíz, son los tejidos del pedicelo expuestos por la acción mecánica del desgrane, la región estilar, y las heridas producidas al pericarpo durante el manejo del grano (Rambo *et al.* 1974, Tsuruta *et al.* 1981 y Marsh y Payne 1984b).

El estudio estructural de penetración de *A. parasiticus* al cariósido de maíz maduro, mediante Microscopía Electrónica de Rastreo (M.E.R.), servirá de base para la aplicación de estas técnicas de microscopía, al desarrollo de una metodología que permita evaluar en condiciones de laboratorio, cultivares de maíz de origen tropical en cuanto a la invasión por *Aspergillus spp.* Además, esta información puede ser utilizada en la elaboración de alternativas para manejo.

Este trabajo se realizó con el fin de observar las áreas más frecuentes de penetración de *A. parasiticus* al cariósido de maíz maduro, y las diferencias que presentan en la invasión de los tejidos cariósidos adheridas a la mazorca con respecto a los desgranados.

MATERIAL Y METODOS

Para este estudio se empleó el híbrido comercial *Zea mays L.* cv X 5800 (Pioneer Hybrid Corp.), cultivado en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (U.C.R), ubicada en Costa Rica. Las mazorcas maduras se cosecharon y manejaron manualmente, y se eliminó en el campo aquellas que presentaban a la vista deterioro por humedad o daño físico por insectos. Después de la cosecha se almacenaron a una temperatura de 8 °C y 54-58 % de humedad relativa. El cultivo de *A. parasiticus* Speare (NRRL 2999) usado en las pruebas fue obtenido directamente del Northern Regional Research Laboratory, United States Department of Agriculture.

Al inicio del trabajo se examinó la microflora presente en los cariósidos según las técnicas de Neergaard (1977). Para el estudio de penetración de *A. parasiticus* se usaron 46 mazorcas, 40 se mantuvieron intactas y 6 fueron desgranadas manualmente. El inóculo se preparó a partir de un cultivo de *A. parasiticus* en Agar Papa Dextrosa NaCl 7,5%, 13 días después de sembrado. Las conidias se removieron del cultivo mediante flotación en una solución 0,8% (v:v) del dispersante polioxietilensorbitano monolaurato (Tween 80) en agua destilada estéril.

Tanto el maíz en mazorca como desgranado fue transferido a solución de hipoclorito de sodio al 1% en agua destilada v:v por 5 minutos, y lavado 3 veces con agua destilada estéril durante 5 minutos. Posteriormente, 21 mazorcas y la mitad del maíz desgranado, fueron inoculados por inmersión en una suspensión acuosa de $4,2 \times 10^4$ conidias/ml, por un lapso de 25 minutos. el resto de las mazorcas y el maíz desgranado fue usado como testigo.

Las mazorcas y granos inoculados fueron colocados en cámaras húmedas rectangulares sobre una malla metálica, una mazorca ó 50 granos en cada cámara. Las cámaras se mantuvieron a 28 ± 2 °C en condiciones de luz alterna (12 horas oscuridad y 12 horas luz), durante 120 horas. Para retardar la germinación de los cariósidos y mantener la humedad, se usó en el fondo de las cámaras una solución de NaCl 4,5% en agua destilada estéril(p:v), que se mantuvo en contacto con el papel absorbente estéril. Para evitar la desecación, las cámaras fueron colocadas en bolsas plásticas.

Los ensayos iniciales de penetración se prolongaron por un lapso de 48 horas, y posteriormente se efectuaron otras pruebas continuando las observaciones hasta las 120 horas. La muestra para el estudio de penetración en granos adheridos estuvo constituida por 3 mazorcas en cada período; en tanto que, para maíz desgranado se utilizaron 30 cariósidos por período, o sea 10 granos de cada cámara. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación, y se fijó los tejidos en solución de alcohol etílico (95%) - ácido acético glacial-formaldehído (40%) - agua destilada, en una relación 10:1:2:7 (v:v) (Sass 1964). Para separar el cariósido con los tejidos de la inflorescencia, la mazorca fue dividida longitudinalmente y luego se hicieron varias secciones transversales.

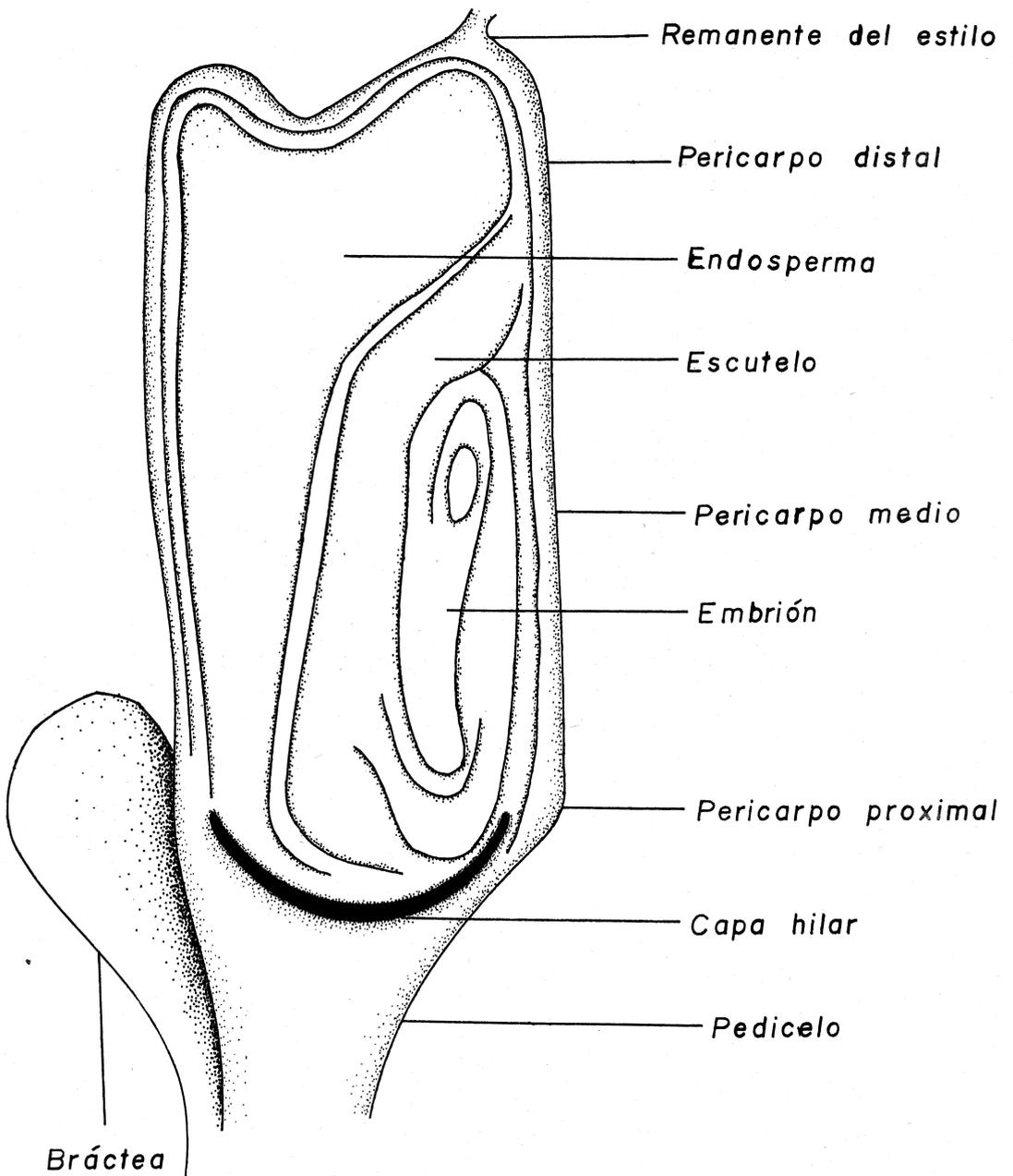


Fig. 1. Sección longitudinal del cariósido de maíz en la que se muestra la ubicación de los tejidos.

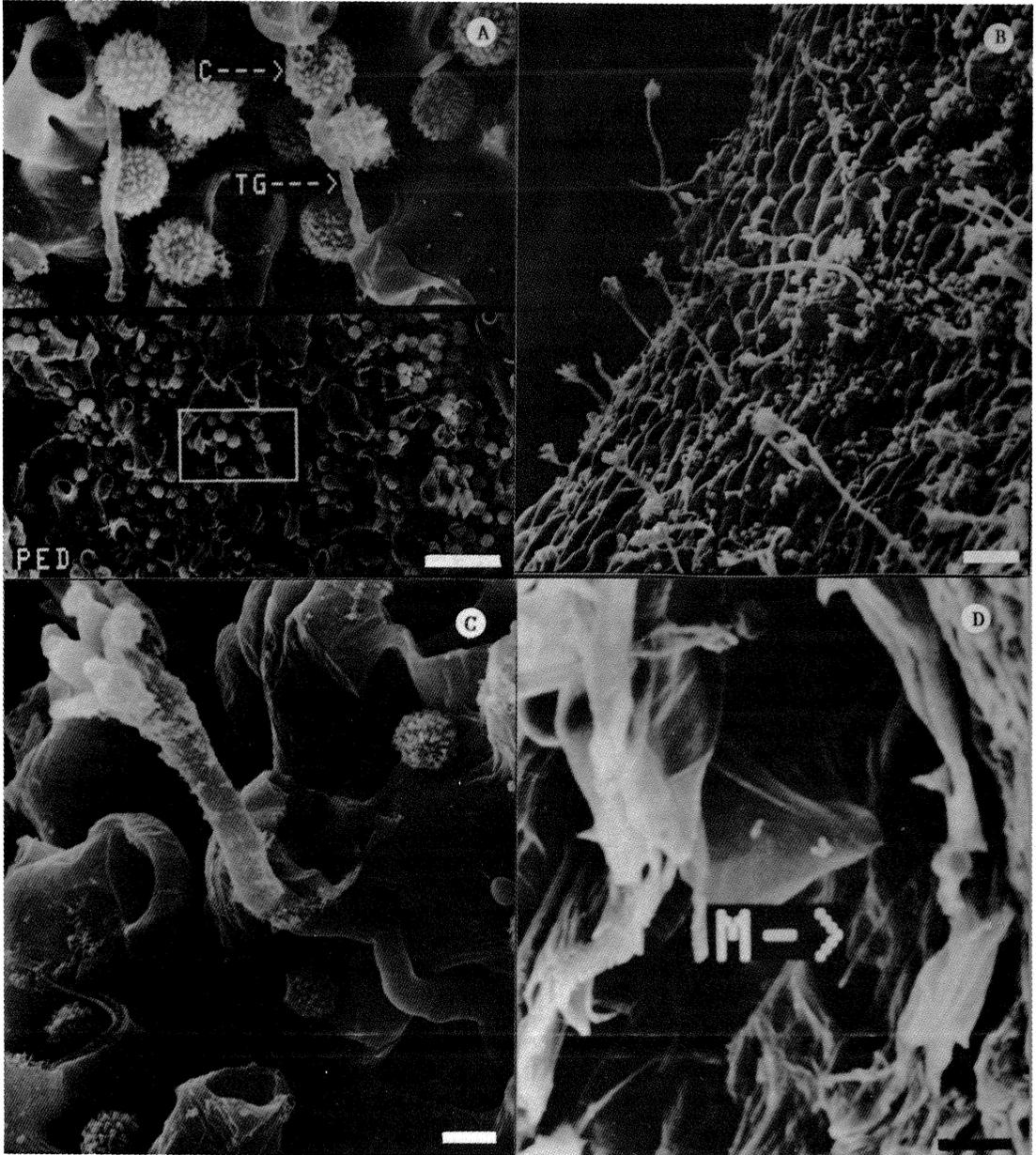


Fig. 2. Germinación y esporulación de *A. parasiticus* en tejidos del cariósido de maíz desgranado. A. Conidias (C) con tubos germinales (TG) en el parénquima esponjoso del pedicelo (PED). Barra: 25 μ m. B. Esporulación en epidermis del pericarpo proximal. Barra: 10 μ m. C. Conidióforo en el parénquima esponjoso del pedicelo. Barra; 25 μ m. D. Hifa (M) en el espacio intercelular de células de cruce del pericarpo proximal. Barra: 5 μ m.

Manualmente se hicieron secciones longitudinales (Fig. 1) y transversales del carióspside y los tejidos de la inflorescencia, que se usaron en el examen mediante M.E.R. Los tejidos se procesaron según el método descrito por Hearle *et al.* (1974). La deshidratación se realizó en una gradiente de agua destilada -alcohol etílico v:v (50-100%), por un lapso de 6 días. Posteriormente, se procedió a lavar los tejidos con CO₂ cada 10 minutos, durante 1 hora y a secarlos a presión de 90-100 Kg-F/Cm². Concluido el proceso de secado a punto crítico, los tejidos fueron montados en bases de aluminio y cubiertos con platino en un cobertor metálico IB-5 (Giko Ltd), por un lapso de 5 minutos. Finalizado el período de cobertura metálica, se procedió a observarlos al microscopio (Hitachi S-570), a un voltaje de aceleración de 15 KV y distancia de trabajo de 15 mm.

RESULTADOS

Las conidias de *A. parasiticus* aplicadas mediante el proceso de inoculación, emitieron generalmente 1 ó 2 tubos germinales que se extendieron sobre las células epidérmicas, y entre las uniones de las paredes anticlinales en el pedicelo, brácteas, pericarpo y el remanente del estilo del maíz desgranado y en mazorca, en un lapso de 12 horas. En los tejidos del pedicelo expuestos por la acción mecánica del desgrane, también germinaron las conidias de *A. parasiticus*, y los tubos germinales invadieron los espacios intercelulares y las células del parénquima esponjoso, en un lapso de 12 horas a partir de la inoculación (Fig. 2A).

No se observaron diferencias en la formación de micelio y de conidióforos de *A. parasiticus* entre los tejidos epidérmicos del maíz desgranado y en mazorca. En un lapso de 24 horas a partir de la inoculación se notó que las hifas de *A. parasiticus* ya formaban micelio y los conidióforos aparecieron al cabo de 48 horas (Fig. 2B).

En ese mismo lapso de 48 horas eran evidentes conidióforos en el parénquima esponjoso del pedicelo del maíz desgranado (Fig. 2C). Además, las hifas de *A. parasiticus* se extendieron hasta las células de cruce del pericarpo proximal (Fig. 2D).

Los espacios intercelulares continuos del parénquima esponjoso del pedicelo y el pericarpo

proximal, mostraron la mayor proliferación de hifas (Fig. 3). En la región proximal del carióspside también se observó que, la capa hilar (Fig.1) parece actuar como barrera al avance del microorganismo, ya que no la penetran.

Micelio de *A. parasiticus* creció sobre el pericarpo del carióspside y penetró a través de heridas en un lapso de 48 horas. También se notó la formación de conidióforos a las 72 horas en heridas que exponían el endosperma. Esas observaciones incluyen maíz desgranado y en mazorca.

Hifas de *A. parasiticus* se extendieron a través de los espacios intercelulares y fisuras en el remanente del estilo; sin embargo, la invasión del pericarpo, se observó sólo en 2 carióspsides desgranados, después de un período de incubación de 120 horas.

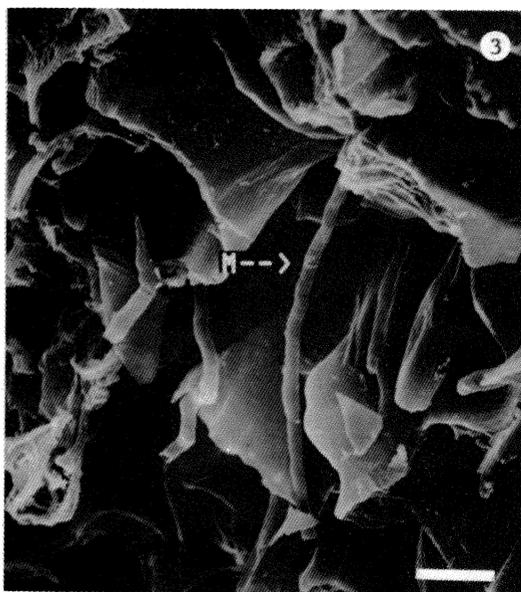


Fig. 3. Parénquima esponjoso del pedicelo del carióspside de maíz desgranado, en el cual hubo proliferación de hifas (M) de *A. parasiticus*. Barra: 5 μ m.

DISCUSION

De los resultados del examen de micoflora se desprende que, los carióspsides que se usaron para los ensayos de penetración, estaban libres de infección natural por *Aspergillus spp.* Esas observaciones coinciden con informes anterior-

res que indican que en las zonas tropicales, la invasión del cariósido de maíz por miembros del grupo *Aspergillus*, es baja durante la fase de campo (Montoya-Maquín y Schieber 1970, Guzmán de Peña *et al.* 1985 y Echandi 1986).

El tiempo que emplearon las conidias de *A. parasiticus* para germinar, y la forma en que los tubos germinales se extendieron sobre la epidermis del cariósido en este estudio, coincide con el informe de Marsh y Payne (1984b) para el caso de *A. flavus* en epidermis del estilo de cariósidos de maíz inoculados adheridos a la mazorca.

Además, en ese lapso de 12 horas, los tubos germinales invadieron los tejidos del pedicelo expuestos por la acción mecánica del desgrane. Tsuruta *et al.* (1981) observaron hifas de *A. flavus* en el pedicelo de maíz desprendido de la mazorca. Sin embargo, anterior a este trabajo no existía evidencia histológica de los tubos germinales de conidias de *A. parasiticus* en el pedicelo del cariósido. Esas observaciones también constituyeron la primera diferencia en cuanto al área de penetración de *A. parasiticus* entre el maíz desgranado y en mazorca.

La formación de conidióforos en un lapso de 48 horas, indica que las condiciones de incubación fueron apropiadas para el desarrollo de *A. parasiticus* en la epidermis del grano. Esas observaciones son congruentes con los resultados de Marsh y Payne (1984b), quienes también observaron conidióforos de *A. flavus* sobre granos de polen, 48 horas después de la aplicación de las conidias en los estilos de la mazorca de maíz.

La presencia de conidióforos y su ubicación en el parénquima esponjoso del pedicelo, indican que *A. parasiticus* se extiende desde los tejidos expuestos por la acción mecánica del desgrane, hacia el extremo proximal del cariósido.

La proliferación de hifas en el parénquima esponjoso del pedicelo, y su ubicación en el pericarpo proximal en un lapso de 48 horas, indica que el avance de *A. parasiticus* se produce principalmente vía espacios intercelulares continuos entre esos dos tejidos. Tsuruta *et al.* (1981) también observaron hifas de *Aspergillus spp* en el pericarpo proximal del maíz desgranado mediante M.E.R.; sin embargo, no establecieron con claridad cual fue la ruta que siguieron esos microorganismos en la invasión del grano, debido a que iniciaron sus observaciones 7 días después de la inoculación.

Las observaciones sobre la posible función de barrera al avance de *A. parasiticus* que parece desempeñar la capa hilar, coinciden con el informe de Tsuruta *et al.* (1981), para el caso de pedicelo de cariósidos de maíz desgranados invadidos por *Aspergillus restrictus in vitro*.

La frecuente presencia de hifas de *A. parasiticus* en el pericarpo proximal del maíz desgranado, unida a su observación esporádica en el pericarpo medio, indica que la invasión prosigue hacia el pericarpo distal. En contraste, el pericarpo proximal del maíz en mazorca presentó hifas del hongo solamente en un caso. Esas observaciones indican que los tejidos del maíz desgranado y en mazorca, presentan diferencias en la frecuencia de penetración de *A. parasiticus*. La evidencia presentada aquí, es congruente con los resultados de Rambo *et al.* (1974) y Marsh y Payne (1984a), quienes informaron que mazorcas de maíz inoculadas *in vitro* con *A. flavus* en la región estilar, presentaron escasos cariósidos invadidos por el hongo en el momento de la cosecha, y su presencia en dichos granos fue relacionada principalmente con el daño físico. Los resultados de este estudio discrepan de los de Marsh y Payne (1984b), quienes informaron que el pedicelo del maíz en mazorca, es un área importante en la penetración de *A. flavus*.

La penetración de micelio a través de heridas indica que la integridad del pericarpo también es un factor físico importante en la invasión del cariósido por *A. parasiticus*. A pesar de que este estudio no incluyó un ensayo sobre daño físico en el pericarpo, se observó que el maíz en mazorca que mostró mayor esporulación de *A. parasiticus*, presentaba heridas que exponían los tejidos de reserva.

Las observaciones en la región estilar indican que, no constituye un área importante para la invasión del pericarpo distal del cariósido por *A. parasiticus*. Marsh y Payne (1984b) informaron resultados similares, en cariósidos de maíz inoculados *in vitro* en el estilo o el pericarpo con *A. flavus*.

A pesar de que, el examen de micoflora mostró la presencia de *Fusarium spp* en una alta proporción de los cariósidos, el examen del testigo usado en el estudio de penetración, indicó que el crecimiento de éste se limitó al pedicelo del grano durante las primeras 72 horas de incubación, y que fue menor en el maíz inoculado con *A. parasiticus*. Además, la formación

de conidióforos en el parénquima esponjoso del pedicelo del maíz desgranado, en un lapso de 48 horas, permite deducir que *Fusarium spp* no interfirieron en el crecimiento de *A. parasiticus* en ese tejido.

Los resultados de este trabajo indican que los tejidos del pedicelo expuestos por la acción mecánica del desgrane, son el área principal de penetración de *A. parasiticus* al cariósido de maíz. *A. parasiticus* se extiende desde el parénquima esponjoso del pedicelo hasta el pericarpo proximal, en un lapso de 48 horas. Trabajos tendientes a la localización de genotipos resistentes, deberían estar orientados a la observación del comportamiento de *Aspergillus* en relación a esos tejidos.

Además de los tejidos del grano que con anterioridad han sido identificados como barreras a la penetración de microorganismos, las observaciones de este trabajo permiten agregar que la capa hilar parece actuar como tal, a la invasión del embrión y los tejidos de reserva del cariósido de maíz por *A. parasiticus*.

De los resultados de este trabajo también se desprende que, existen diferencias en cuanto a las áreas y frecuencia de penetración de *A. parasiticus*, entre los tejidos del maíz desgranado y en la mazorca. Debido a que la frecuencia de penetración es menor en maíz en mazorca, el mantener la cosecha en esta condición puede resultar en una reducción de la incidencia de aflatoxinas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por financiar este trabajo. Al personal del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), y al de la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) de la Universidad de Costa Rica, por facilitar las instalaciones y ayuda técnica. De igual manera agradecemos al Dr. Walter Marín por las sugerencias al trabajo.

RESUMEN

Las áreas principales de penetración de *Aspergillus parasiticus* Speare, al cariósido de maíz (*Zea mays* L.) desgranado y en mazorca, se observaron mediante microscopía electróni-

ca de rastreo. *A. parasiticus* colonizó el tejido epidérmico de las brácteas, pedicelo, pericarpo y del remanente del estilo. Además, el hongo colonizó los tejidos del pedicelo expuestos por la acción mecánica del desgrane, e invadió el pericarpo proximal del cariósido en un lapso de 48 horas. El avance de *A. parasiticus* se produjo principalmente, vía espacios intercelulares continuos entre el parénquima esponjoso del pedicelo y el pericarpo proximal. En un lapso de 72 horas el pericarpo proximal del maíz desgranado siempre presentó hifas de *A. parasiticus*; en contraste, en el pericarpo proximal del maíz en mazorca se observaron únicamente en un caso.

Los resultados de este trabajo indican que el tejido esponjoso del pedicelo expuesto por la acción mecánica del desgrane, es el área principal de penetración de *A. parasiticus* al cariósido. Los resultados también mostraron una mayor frecuencia de penetración del hongo al maíz desgranado que en mazorca.

REFERENCIAS

- Castillo-Niño, A. 1978. Almacenamiento y secamiento de granos en Colombia y América Tropical. Agrosíntesis, Bogotá. 246p.
- Christensen, M. 1981. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* 73:1056-1084.
- Echandi, Z.R. 1986. The relationship between aflatoxin formation and kernel damage in Costa Rican maize, pp.164-171 In M.S.Zuber, E.B. Lillehoj & B.L. Renfro (eds). Aflatoxin in maize: a proceedings of the workshop. (7-11 de abril, 1986. El Batán, Mexico). CIMMYT. Mexico. 389p.
- Goldblatt, L.A. Ed. 1972. Aflatoxin scientific back-ground, control, and implications. Academic Press, New York. 472p.
- Guzmán De Peña, D, L. Mathieu & J.J. Peña Cabriales. 1985. Presencia de aflatoxinas en maíz recién cosechado. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 27:249-252.
- Hall, D.W. 1971. Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las Zonas Tropicales y Subtropicales. Roma, FAO cuadernos de fomento agropecuario N° 90. 400p.
- Hayes, A.W. 1980. Mycotoxins: a review of biological effects and their role in human diseases. *Clin. Toxicol.* 17:45-83.

- Hearle, J.W.S, J.T. Sparrow & P.M. Cross. 1974. The use of the scanning electron microscope. Pergamon, Great Britain. 278p.
- Hesseltine, C.W. 1969. Mycotoxins. *Mycopathologia et mycologia applicata*. 39:371-383.
- King, S.B. & G.E. Scott. 1982. Field inoculation techniques to evaluate maize for kernel infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 72:782-785.
- Marsh, S.F. & G.A. Payne. 1984a. Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74: 1284-1289.
- Marsh, S.F. & G.A. Payne. 1984b. Scanning E M studies on the colonization of dent corn by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 74:557-561.
- Montoya-Maquín, J.M. & E. Schieber. 1970. La práctica del doblado del maíz (*Zea mays L.*) y su relación con la incidencia de hongos en la mazorca. *Turrialba* 20:24-29.
- Munro, I.C. 1976. Naturally occurring toxicants in foods and their significance. *Clin. Toxicol.* 9:647-663.
- Neergaard, P. 1977. Seed pathology. Vol. 1. MacMillan, London. 839 p.
- Patten, R.C. 1981. Aflatoxins and disease. *Am. J. Trop.Med.Hyg.* 30:422-425.
- Rambo, G.W, J. Tuite & P. Crane. 1974. Preharvest inoculation and infection of dent corn ears with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Phytopathology* 64:797-800.
- Ramírez-Genel, M. 1966. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Continental, Mexico. 300 p.
- Raper, K.B. & D.I. Fennell. 1973. The genus *Aspergillus*. Krieger Publishing, New York. 686 p.
- Sass, J.E. 1964. Botanical microtechnique. 3ed. Iowa State University, Iowa. 227p.
- Tsuruta, O, S. Gohara & M. Saito. 1981. Scanning electron microscope observations of a fungal invasion of corn kernels. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 22:121-126.
- Widstrom, N.W. & M.S. Zuber. 1983. Sources and mechanisms of genetic control in the plant, pp.72-76 In Diener, U.L.; R.L. Asquith, J.W. Dickens (eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Auburn University, Alabama Agricultural Experiment Station, Dep. of Research Information Southern Cooperative Series. Bulletin 279. 112p.
- Williams, R.J. & D. Mc Donald. 1983. Grain molds in the tropics: problems and importance. *Ann.Rev. Phytopathol.* 21:153-178.