

Artículo Científico

Actividad antifúngica de accesiones de maíz (*Zea mays* L.) de grano con presencia de fenoles coloridos

Antifungal activity of corn (*Zea mays* L.) accessions of grain with presence of colored phenols

Yolanda Salinas-Moreno¹, J. Ricardo Resendiz-Valencia², Ramón I. Arteaga-Garibay³, Norma Y. Zacamo-Velázquez^{4*}

¹ Programa de Maíz, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jal.

² Pasante de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.

³ Centro Nacional de Recursos Genéticos, Tepatitlán de Morelos, Jal.

⁴ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Altos. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

*Correspondencia: normita_zave@hotmail.com (Norma Y. Zacamo Velázquez)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1172>

Recibido: 28 de febrero de 2023; Aceptado: 26 de mayo de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

El grano de maíz contiene una elevada cantidad de compuestos fenólicos los cuales poseen diversas actividades biológicas, entre las que se encuentra la actividad antifúngica (AAF). El objetivo del estudio fue determinar la AAF del extracto acetónico del grano de maíz de accesiones con diferentes coloraciones de grano. En el estudio se emplearon 60 accesiones de grano azul morado (AZM), 34 accesiones de grano rojo cereza (RC) y 26 accesiones de grano rojo ladrillo (RL). Se utilizaron las técnicas de microdilución en placa y la prueba de porcentaje de inhibición fúngica para evaluar la AAF de los granos de maíz. Como agente patogénico se empleó una cepa de *Fusarium oxysporum* y el antifúngico comercial Itraconazol como testigo negativo. La prueba de microdilución en placa funcionó como filtro para los extractos de las accesiones, al reducir en 50 % las muestras que se sometieron a la prueba de porcentaje de inhibición, considerada cuantitativa de la AAF. Los extractos de las accesiones de grano AZM presentaron menor AAF que los de los granos RC y RL. Con la prueba de porcentaje de inhibición se comprobó la mayor AAF de los extractos de maíz con grano RC. Ninguno de los extractos superó la AAF del antifúngico comercial Itraconazol. La AAF del grano de maíz está asociada con su color.

Palabras clave: *Zea mays* L., micotoxinas, compuestos fenólicos, prueba de microdilución, prueba de inhibición.

Abstract

The maize grain contains high amounts of phenolic compounds which have various biological activities, including antifungal activity (AFA). The objective of the study was to determine the AFA of the acetone extract of the maize grain from accessions with different grain colors. In the study, 60 accessions of blue purple maize grain (BP), 34 accessions of cherry red grain (CR) and 26 accessions of brick red grain (BR) were used. Microplate dilution techniques and the percentage of fungal inhibition test were applied to assess the AFA of maize grains. A strain of *Fusarium oxysporum* was used as a pathogenic agent and the commercial antifungal Itraconazole was employed as negative control. The plate microdilution test worked as a "sieve" to filter the extracts of the accessions, by reducing by 50 % the samples that were analyzed with the inhibition percentage test, considered quantitative by the AFA. The extracts from the BP grain accessions presented lower AFA than those from the CR and BR grains. With the inhibition percentage test, the highest AFA of the maize extracts with CR grain was verified. None of the extracts outperformed the AFA of commercial antifungal Itraconazole. The AFA of maize grain is associated with its color.

Keywords: *Zea mays* L., micotoxins, phenolic compounds, microdilution test, inhibition test.

1. Introducción

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es afectado por diferentes enfermedades causadas por hongos. De estos microorganismos, los del género *Fusarium* reciben especial atención, ya que ocasionan daños en raíz, tallo y mazorca, lo que origina pérdidas considerables a los productores de este cereal en diferentes zonas del mundo donde se cultiva (Rivas-Valencia *et al.*, 2011; Gromazdka *et al.*, 2019; Carbas *et al.*, 2021). La pudrición de la mazorca de maíz debido a especies de *Fusarium* ocasiona no solo reducción en la calidad del grano, y pérdidas de rendimiento, sino que las micotoxinas producidas por el hongo representan un problema de salud para el hombre y animales que lo consumen (Ji *et al.*, 2019).

Las plantas producen compuestos fenólicos en sus diferentes estructuras como mecanismo de defensa a factores bióticos y abióticos (Kumar *et al.*, 2020). El maíz es de los cereales que mayor cantidad de compuestos fenólicos (CF) acumulan en sus granos (Adom y Liu, 2002). Los CF presentes en el grano de maíz se integran principalmente por dos grupos que son ácidos fenólicos y flavonoides. El grupo predominante en el grano de maíz es el de los ácidos fenólicos (Salinas-Moreno *et al.*, 2017), con los ácidos ferúlico y p-cumárico como los más abundantes, concentrados particularmente en el pericarpio, aunque el germen alberga también una cantidad relevante de estos compuestos (Das y Singh, 2016; Razgonova *et al.*, 2022).

Los CF poseen múltiples actividades biológicas, de entre las cuales, las más estudiadas son la antioxidante, anticancerígena y anti-infecciosa, por estar implicadas en beneficios a la salud humana. Sin embargo, se ha documentado la actividad de los CF del grano de maíz en la tolerancia a las plagas de almacén (Arnasson *et al.*, 1992), y en trabajos recientes se ha señalado su importancia en la tolerancia a la infestación de los granos por hongos del género *Fusarium* (Pilu *et al.*, 2011; Schöneberg *et al.*, 2018).

México se considera uno de los principales centros de origen y domesticación del maíz, y posee una gran diversidad de esta especie que se halla clasificada en razas, de las que han sido descritas más de

60 (Kato *et al.*, 2009). Al interior de estas razas, se encuentra una gran cantidad de poblaciones de maíz que difieren en distintos aspectos, entre los que se encuentra el color de sus granos. La variación de color desde rosa hasta morado intenso del grano de maíz se debe a la presencia de compuestos tipo antociano (Salinas *et al.*, 1999; Magaña *et al.*, 2020).

Hasta ahora, el grano blanco de maíz es el que más se ha usado en los diferentes estudios sobre participación de los CF en la tolerancia a infecciones por hongos, y poco se sabe sobre el desempeño de los maíces con granos de otros colores sobre estos aspectos. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antifúngica de accesiones de maíz con diferentes colores de grano.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal

Se utilizó el grano de accesiones de maíz de colores azul morado (AZM), rojo cereza (RC) y rojo ladrillo (RL) obtenidas de los bancos de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y del Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Los detalles de las razas de las cuales provinieron las accesiones empleadas se muestran en el Cuadro 1.

2.2 Preparación de los extractos del grano de maíz




Se emplearon entre 30 y 35 granos de maíz de cada accesión, los cuales se trituraron ligeramente con ayuda de un martillo, con el cuidado de no aplastar el germen, el cual se cortó en trozos pequeños con ayuda de una navaja. Las muestras trituradas se depositaron en cartuchos de papel que fueron puestos en un extractor Soxhlet para retirar la grasa. Se utilizó éter de petróleo (J.T. Baker; Xalostoc, Estado de México, México) como solvente, y la extracción se realizó por 8 h. Las muestras desengrasadas se dejaron secar durante 15 h en un horno (GRIEVE, modelo LW-201 C; Illinois, EUA) a 37 ± 2 °C para posteriormente molerlas en un molino tipo ciclónico (UDY Corporation, modelo 3010-080p. USA) con malla 0.5 mm. La harina se colocó en viales ámbar y se le midió su contenido de humedad mediante el método 44-15.02 (AACC, 11a edición).

Se pesó 1.0 g de harina base seca, que se depositó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se agregaron 20 mL del solvente, que fue una solución de acetona /agua /ácido acético 75:24.5:0.5 (*v/v/v*). Se eligió este solvente porque es el que permite extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos del tipo proantocianidinas (Prior *et al.*, 2010). Las proantocianidinas son de los compuestos fenólicos, los de mayor actividad antifúngica (Ullah *et al.*, 2019). La mezcla se agitó y la boca del matraz se cubrió con Parafilm y se llevó a un baño sonicador (BRANSON, modelo 2510R-MT, EUA) por 15 min. Posteriormente se colocó en un agitador horizontal (New Brunswick, modelo G10; New Brunswick, N.J., EUA) durante 60 min, para luego centrifugarse a 2660 g por 10 min (Hettich Zentrifugen Universal 32, Al). El sobrenadante se recuperó, se filtró con papel Whatman No. 4, se ajustó a un volumen de 20 mL con el solvente de extracción, y se colocó en tubo de vidrio, en congelación hasta su análisis. Los extractos obtenidos de esta manera se emplearon para evaluar la actividad antifúngica.

Como referencias para la actividad antifúngica de los maíces con fenoles coloridos, se utilizaron extractos de dos maíces de grano blanco. Una cruz experimental del programa de maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (cruza 200x201) y una variedad de maíz nativo blanco de la raza Tuxpeño proveniente de Veracruz, cuyos extractos se prepararon de la misma manera que los maíces con pigmentos. La incorporación de estas referencias se realizó para determinar la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos no coloridos y se utilizaron únicamente en la prueba de porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico de los extractos.

Cuadro 1. Acciones de razas de maíz con diferente tipo de pigmentación utilizadas en la evaluación de actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*.

Table 1. Accessions of maize races with different pigmentation used in the evaluation of antifungal activity against *Fusarium oxysporum*.

Color de grano	No. de accesiones	Razas de maíz	
Azul morado	60	Arrocillo amarillo (2), azul (4), Bolita (4), Celaya (2), Chalqueño (1), Conejo (2), Cónico (2), Cónico norteño (2), Elotero de Sinaloa (2), Elotes cónicos (9), Elotes occidentales (9), Mushito (1), Nal-Tel (1), Nal-Tel de altura (1), Negro de Tierra Caliente (1), Olotillo (4), Olotón (2), Reventador (1), Tabloncillo (1), Tepecintle (4), Tuxpeño (5)	
Rojo cereza	34	Bofo (1), Bolita (2), Celaya (1), Cónico (4), Cónico norteño (3), Dulcillo del noroeste (1), Elotes cónicos (6), Elotes occidentales (5), Mushito (1), Olotillo (1), Pepitilla (2), Ratón (1), Tabloncillo (1), Tabloncillo perla (1), Tuxpeño (4)	
Rojo ladrillo	26	Ancho (1), Celaya (1), Complejo serrano de Jalisco (1), Cónico (3), Cónico norteño (1), Dulcillo (2), Dzit Bacal (1), Elotes cónicos (5), Elotes occidentales (3), Nal-Tel (2), Olotillo (1), Olotón (3), Pepitilla (1), Tepecintle (1)	

2.3 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica (AAF) de los extractos se evaluó mediante la prueba de microdilución en placa. Esta prueba fue presuntiva de esta actividad. Se aplicó de acuerdo al método de microdilución en placa (Chadha y Kale, 2015) con la adición del compuesto resazurina o Azul de Alamar (AA). El AA es un colorante que, al oxidarse, cambia de color azul a rosa, por efecto del crecimiento del microorganismo. Esta característica se aprovecha para medir de manera indirecta, por el cambio de color que se registra con un espectrofotómetro, el crecimiento del hongo que se utiliza en la evaluación. En este caso se empleó una cepa del hongo *Fusarium oxysporum*.

De cada extracto obtenido en la sección 2.2 se tomaron 5 mL que se evaporaron en un rotavapor (Buchi modelo R-215, Suiza) hasta un volumen aproximado de 1.5 mL. Lo anterior se realizó para remover compuestos del solvente que pudieran tener efectos antimicrobianos como la acetona. Previamente se realizó una prueba con el solvente puro para asegurar que al reducir a 1.5 el volumen inicial de 5 mL de extracto, se eliminaran los residuos tóxicos que pudieran haber quedado. Esta prueba se realizó con el hongo a emplear en el estudio y se comprobó la no inhibición del desarrollo del hongo. El extracto evaporado se ajustó a un volumen de 2 mL con agua destilada, se colocó en tubos eppendorf y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Se utilizó una cepa del hongo filamentoso *Fusarium oxysporum*, proveniente de la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP, cuya identidad es CMCNRG1007, y que está catalogada como virulenta.

2.3.1 Activación de la cepa

Para la activación de la cepa del hongo se utilizó como medio de cultivo caldo papa-dextrosa (CPD) (Dibico) en relación de 20 mL/caja Petri, en la cual se colocó un disco de *F. oxysporum*, conservado a -80 °C en ultracongelador (Thermo, modelo 8607, EUA) donde son resguardados estos microorganismos, y su posterior descongelamiento utilizando baño de agua a 37 °C. Se sembró por medio de impronta para mantener contacto con el medio de cultivo en todo momento. Las cajas se colocaron en incubadora a 30 °C ± 2° por una semana.

2.3.2 Preparación del inóculo fúngico

La preparación del inóculo se basó en el método del documento M38-P del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2002), donde se describen los parámetros para ensayar las actividades antifúngica y fungistáticas (MIC'S, por sus siglas en inglés) en hongos filamentosos. De la cepa de *F. oxysporum* activada se tomó con asa micológica un explante cuadrado de 5 cm del hongo desarrollado y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 150 mL de CPD estéril. En el matraz se instaló un tapón de algodón para el ingreso de oxígeno y se incubó a 30 °C en una estufa (Techne, modelo TSI500, RU) durante dos días y con movimientos circulares suaves (120 rpm).

Luego se cribó sobre un vaso de precipitado utilizando una gasa estéril lo que propició una suspensión de conidios libre de hifas. La concentración final de conidios se ajustó a 2×10^5 UFC/mL,

con el empleo de una cámara Neubauer, de acuerdo con la metodología para conteo celular de Bastidas (2013).

2.3.3 Inhibición del crecimiento fúngico mediante el ensayo de microdilución con azul de alamar

Se empleó el compuesto resazurina o AA como indicador indirecto del crecimiento fúngico, al ocurrir una reacción de óxido-reducción entre este compuesto y las células del hongo. La resazurina es un compuesto inocuo permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina, que funciona como un aceptor artificial de electrones en la cadena de transporte electrónico, que produce fluorescencia roja muy brillante o rosa. Las células viables realizan esta reacción, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad (Chadha y Kale, 2015).

El ensayo se llevó a cabo colocando 50 μL de la suspensión de conidios en cada pocillo de la microplaca, para luego añadir 50 μL del extracto a evaluar. En el caso del testigo positivo se utilizaron 50 μL de la suspensión de conidios. Para el testigo negativo, se utilizaron 50 μL de concentraciones del antifúngico comercial Itraconazol (5, 10, 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), disuelto en CPD, con el fin de establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos probados frente al hongo. El itraconazol es un antifúngico usado contra hongos filamentosos (Chadha y Kale, 2015). Cada muestra, incluyendo los testigos positivo y negativo se evaluaron por triplicado. Se realizó una prueba de control de esterilidad de la placa, para lo cual se colocaron 100 μL de CPD en 4 pocillos de la placa. Tanto la placa de control de esterilidad como la que contenía los ensayos de los extractos se sellaron con Parafilm y se colocaron en una incubadora (Binde, modelo BF115, aronTuttlingen, Alemania) a 30°C durante 24 h. Ya que el ensayo es rápido, se logró analizar un elevado número de muestras por día. La Fig. 1 ilustra la forma de preparación de ensayos y testigos, así como la prueba de esterilidad.

Después de la primera incubación, se añadieron 10 μL del reactivo Azul de Alamar (Thermofisher, EUA), en cada pocillo de la placa. Se realizó una segunda incubación a 37 °C durante 4 h al interior de un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO (Thermofisher modelo 1510, Finlandia). Al concluir esta segunda incubación, se realizó la lectura de la absorbancia de los pocillos de la placa a una longitud de onda de 570 nm.

Se calculó el promedio de las tres lecturas de absorbancia de cada extracto, así como el promedio de todos los extractos para obtener la media poblacional. Como punto de corte positivo o superior se definió la absorbancia media de la fila de pocillos con la solución de conidios y CPD (testigo positivo). La absorbancia promedio a la cual ya no se observó crecimiento del hongo o cambio en el color del pocillo, fue definida como punto de corte inferior o control negativo.

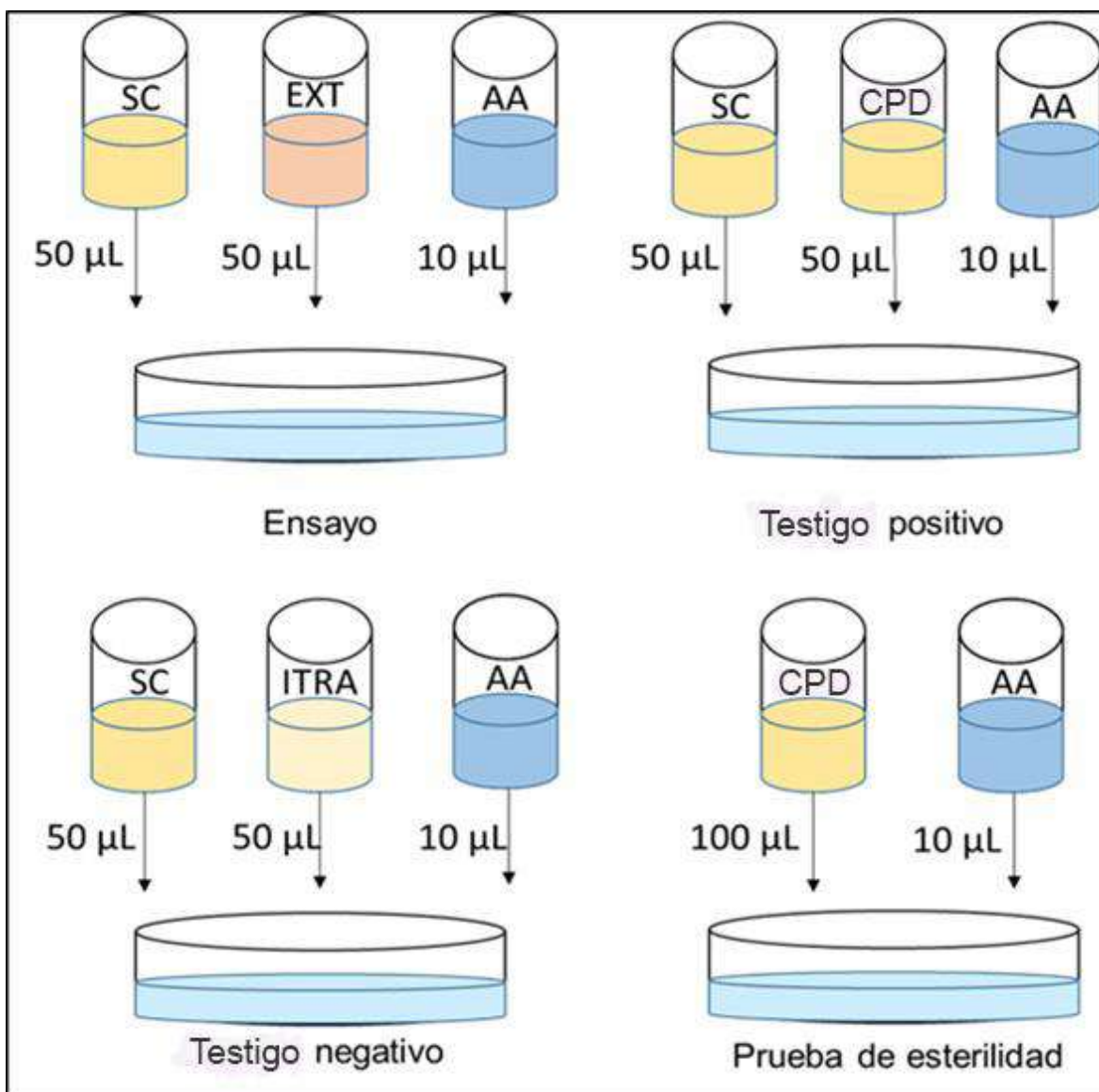


Figura 1. Esquema de preparación de muestras y testigos, así como de la prueba de esterilidad en la implementación de la técnica de microdilución en placa. SC: Suspensión de conidios (2×10^5 UFC/mL); EXT: Extracto del grano de maíz; AA: Azul de alamar; CPD: caldo papa-dextrosa; ITRA: Itraconazol diluido en CPD ($20 \mu\text{g/mL}$).

Figure 1. Scheme of the preparation of samples and controls as well as the sterility test in the implementation of the microdilution plate technique for each of the tested forms SC: Conidia suspension (2×10^5 CFU/mL); EXT: Acetone extract of corn grain; AA: Alamar blue; CPD: potato-dextrose broth; ITRA: Itraconazole diluted in CPD ($20 \mu\text{g/mL}$).

2.4 Prueba de porcentaje de inhibición fúngica

Esta prueba se basa en la evaluación del crecimiento micelial radial del hongo en CPD en cajas Petri. Al medio esterilizado y antes de que solidifique, se le agrega una alícuota conocida del extracto

a evaluar. Volúmenes de 10 mL de CPD se depositaron en tubos de ensayo de 13X16 mm y se esterilizaron en autoclave.

Una vez enfriados los tubos (35-40°C) y bajo condiciones asépticas (en campana de flujo laminar), se agregó una alícuota de 500 µL del extracto a evaluar, se agitó y se vertió en caja Petri para su solidificación. Luego, se colocó un explante cuadrangular (0.5x0.5 cm) del crecimiento del hongo realizado previamente en caja Petri por siete días, en el centro de ésta. De manera paralela se prepararon los testigos positivo y negativo. Como testigo positivo se consideró al tubo con CPD sin la agregación del extracto, y el negativo consistió en agregar al tubo 500 µL del Itraconazol a una concentración de 20 µg/mL (ppm), que fue la concentración mínima inhibitoria determinada para el hongo previamente. Las cajas con los explantes del hongo se incubaron a 30 °C ± 2 en oscuridad. La incubación se prolongó hasta que el testigo positivo mostró un crecimiento del hongo tal que cubrió toda la superficie de la caja, condición que se alcanzó aproximadamente a los siete días. Cada extracto se evaluó por duplicado.

Se midió el diámetro de crecimiento en dos direcciones opuestas del desarrollo micelial con un vernier. El valor promedio de estas lecturas se relacionó con el diámetro de la caja del testigo positivo (Ochoa *et al.*, 2012).

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo por medio de la Ecuación (1).

$$\text{Porcentaje de inhibición (PI)} = \left(\frac{CMP - CMT}{CMP} \right) (100) \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde: CMP= crecimiento micelial del testigo positivo; CMT= crecimiento micelial del tratamiento

3. Resultados y discusión

3.1 Inhibición del crecimiento fúngico mediante el ensayo de microdilución con Azul de alamar

En la Fig. 2 se muestra el desarrollo de los conidios con los extractos del grano de tres accesiones una vez concluida la prueba de microdilución, así como la diferencia en el color de cada pocillo. La actividad antifúngica del extracto de la accesión 156 fue elevada al impedir el crecimiento del hongo y con ello disminuir la oxidación del colorante. El extracto 114 permitió el desarrollo del hongo, el cual oxidó el colorante cambiando el color del pocillo de azul a rosa.

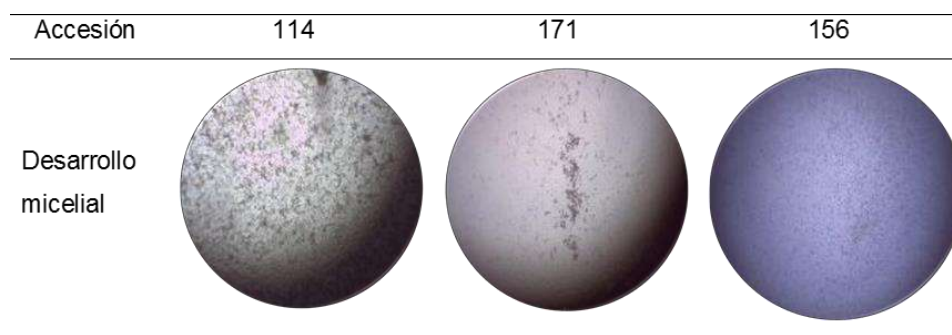


Figura 2. Desarrollo micelial del hongo *F. oxysporum* en los pocillos de la microplaca para diferentes accesiones de grano azul morado, durante el desarrollo de la prueba de microdilución en placa con Azul de alamar.

Figure 2. Mycelial development of the fungus *F. oxysporum* in the wells of the microplate for different accessions of purple blue grain, during the development of the microdilution plate test with Alamar blue.

3.1.1 Accesiones de grano azul morado

De las 60 accesiones con color de grano azul morado evaluadas con la técnica de microdilución en placa para el hongo *F. oxysporum*, solamente 30 presentaron absorbancias por debajo del punto de corte (Figs. 3 A y B) que se estableció en 0.142; las muestras que mostraron valores menores de absorbancia, se consideraron como candidatas para someterlas a la prueba de inhibición. El testigo negativo (Itraconazol), a su concentración mínima inhibitoria (20 µg/mL) obtuvo una absorbancia de 0.135; el testigo positivo de la cepa de *F. oxysporum* mostró una absorbancia de 0.189. Los valores de absorbancia obtenidos para las accesiones variaron en un intervalo de 0.130 a 0.166. EL extracto de la accesión 102, perteneciente a la raza Olotillo fue la que obtuvo el menor valor de absorbancia. Esto significa que mostró un elevado efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los conidios del hongo, lo que provocó menor oxidación de la resazurina al haber menos células para oxidar al compuesto. Así mismo, la accesión 31, de la raza Elotes Occidentales, con un valor de absorbancia de 0.166 fue la de menor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los conidios.

La respuesta diferencial del crecimiento del hongo a los extractos denota diferencias en la composición química de éstos. El grano de maíz posee compuestos fenólicos diversos, entre los cuales los más abundantes son los ácidos fenólicos (Salinas-Moreno *et al.*, 2017), con predominancia de ferúlico, p-coumárico y gálico (Libron *et al.*, 2021). La toxicidad de cada ácido fenólico difiere según la especie de *Fusarium* de que se trate, pero en general, los ácidos ferúlico y p-coumárico exhiben alta actividad antifúngica (Ferruz *et al.*, 2016).

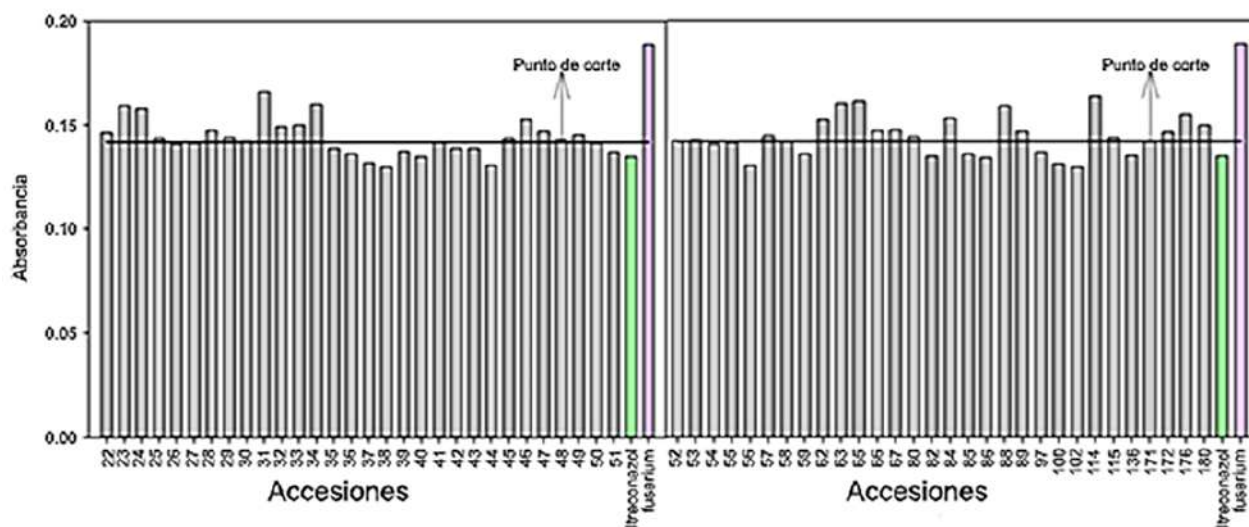


Figura 3. Valores de absorbancia y punto de corte de las accesiones de maíz con grano azul morado de la prueba de inhibición del crecimiento mediante ensayo de microdilución en placa.

Figure 3. Absorbance values and cut-off point of maize accessions with blue-purple kernels from the growth inhibition test using the microdilution plate assay.

Otros compuestos fenólicos presentes en maíces con pigmentos antociano son las antocianinas y flavonoides del tipo flavanoles y flavan 3-ols. Estos últimos cuando se presentan en forma de oligómeros se denominan proantocianinas (Hümmer y Schreier, 2008).

Las proantocianidinas (PAs) derivan de la catálisis de la antocianidin reductasa, y se consideran metabolitos secundarios que regulan la síntesis río abajo de los flavonoides, particularmente antocianinas, por lo que en tejidos que acumulan gran cantidad de estos pigmentos se encuentran en menor proporción (Han *et al.*, 2012). Estos flavonoides (PAs) tienen una participación definitiva en la tolerancia de cultivares de algodón (*Gossypium* spp.) a *Fusarium oxysporum* Schlecht. (Su *et al.*, 2022), o de pepino (*Cucumis sativus* L.) a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Li *et al.*, 2022).

3.1.2 Accesiones de grano rojo cereza

De las accesiones con color de grano rojo cereza, 70.6 % presentaron valores de absorbancia por debajo del punto de corte. Las que mostraron valores extremos en absorbancia fueron la 21 perteneciente a la raza Cónico, con 0.130, y la accesión 208 de la raza Elotes Occidentales la cual tuvo un valor de absorbancia de 0.161 (Fig. 4A). Los maíces de grano rojo cereza presentan menor contenido de antocianinas que los de grano azul morado (Salinas *et al.*, 1999), pero es posible que posean mayor contenido de proantocianidinas (PAs), lo que explicaría su mayor AAF

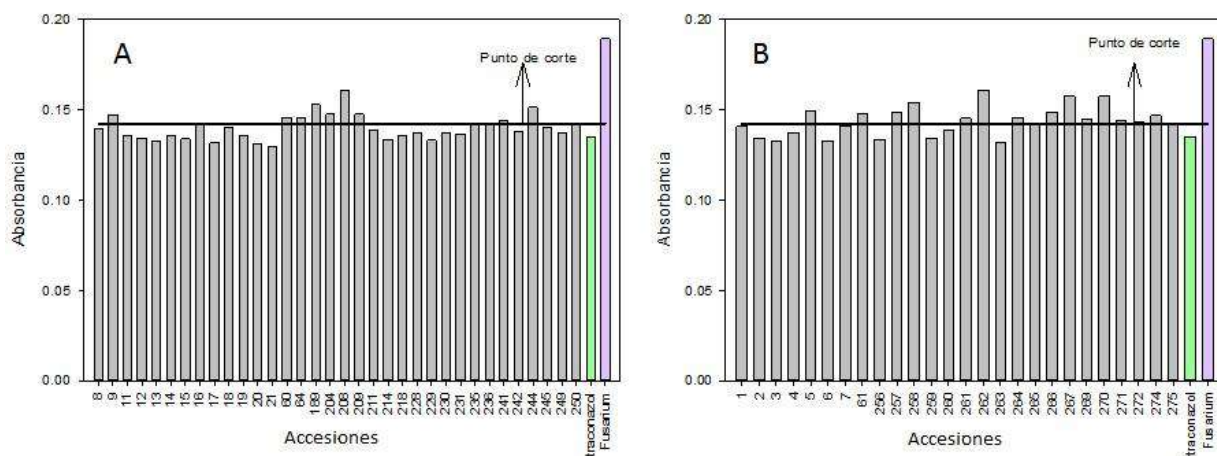


Figura 4. Valores de absorbancia y punto de corte de las accesiones de maíz con grano rojo cereza (A) y rojo ladrillo (B) de la prueba de microdilución en placa.

Figure 4. Absorbance values and cut-off point of cherry red (A) and brick red (B) maize accessions from the microdilution plate test.

3.1.3 Accesiones de grano rojo ladrillo

El porcentaje de accesiones con grano rojo ladrillo cuyos extractos mostraron valores de absorbancia por debajo del punto de corte fue 34.6, que es un valor inferior al de las accesiones con grano azul morado (Fig. 3) y rojo cereza (Fig. 4A).

3.2 Prueba de porcentaje de inhibición fúngica

Las pruebas de microdilución en placa y prueba de inhibición están relacionadas de manera negativa. Un bajo valor de absorbancia en la prueba de microdilución debería asociarse con un elevado porcentaje de inhibición. Sin embargo, esta relación no fue contundente entre las muestras analizadas, debido a que la prueba de microdilución es presuntiva. De acuerdo con la Fig. 5, la accesión 8, con un valor de absorbancia muy cercano al punto de corte (0.141) mostró un valor de inhibición de 22 %, en tanto que la accesión 218 con una absorbancia de 0.131 presentó un porcentaje de inhibición de 41.3. Es posible también que la lectura de absorbancia a 570 nm usada como indicador del crecimiento celular no haya sido lo suficientemente sensible para esta actividad biológica. Lo ideal es medir en lugar de absorbancia, la fluorescencia del pocillo. Sin embargo, disponer de un fluorómetro es mucho menos factible que disponer de un espectrofotómetro, por cuestiones del costo de un equipo y otro.

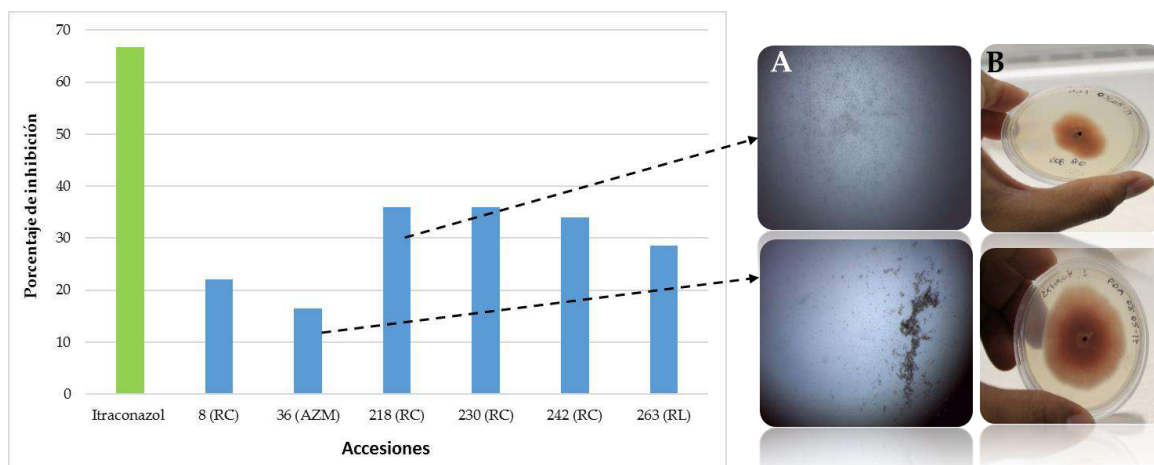


Figura 5. Relación entre las pruebas de microdilución en placa (A) y % de inhibición de crecimiento del hongo (B) en extractos de accesiones de grano de maíz con diferentes colores. RC: rojo cereza, AZM: azul morado, RL: rojo ladrillo.

Figure 5. Relationship between plate microdilution tests (A) and and percentage of fungal growth inhibition (B) in extracts from accessions of maize grains with different colors. colors. CR: cherry red, BP: blue purple, BR: brick red.

3.2.1 Accesiones de grano azul morado

En las 30 accesiones de maíz con grano de color azul morado evaluadas mediante la prueba de PI, se observó una variación de 16.5 a 49.0 %. El tratamiento con el Itraconazol mostró valores de PI arriba de 60 % (Fig. 6A). Los maíces de grano blanco presentaron valores de PI entre 5 y 8 %, que se ubican muy por debajo de los observados en los maíces de grano azul morado, lo que demuestra que el grano de maíz con esta coloración posee compuestos fenólicos con mayor AAF.

La accesión que presentó el mayor PI fue la 50, que pertenece a la raza Elotes Occidentales. Esta accesión se ubicó 14 puntos porcentuales debajo del antifúngico comercial Itraconazol empleado a 20µg/mL que fue la concentración mínima inhibitoria; la accesión 36, de la raza Bolita presentó el menor porcentaje de inhibición de todas las accesiones con este color de grano. Las accesiones de grano azul morado presentaron un porcentaje promedio de inhibición de 27.8 % y un coeficiente de variación de 30.21 %.

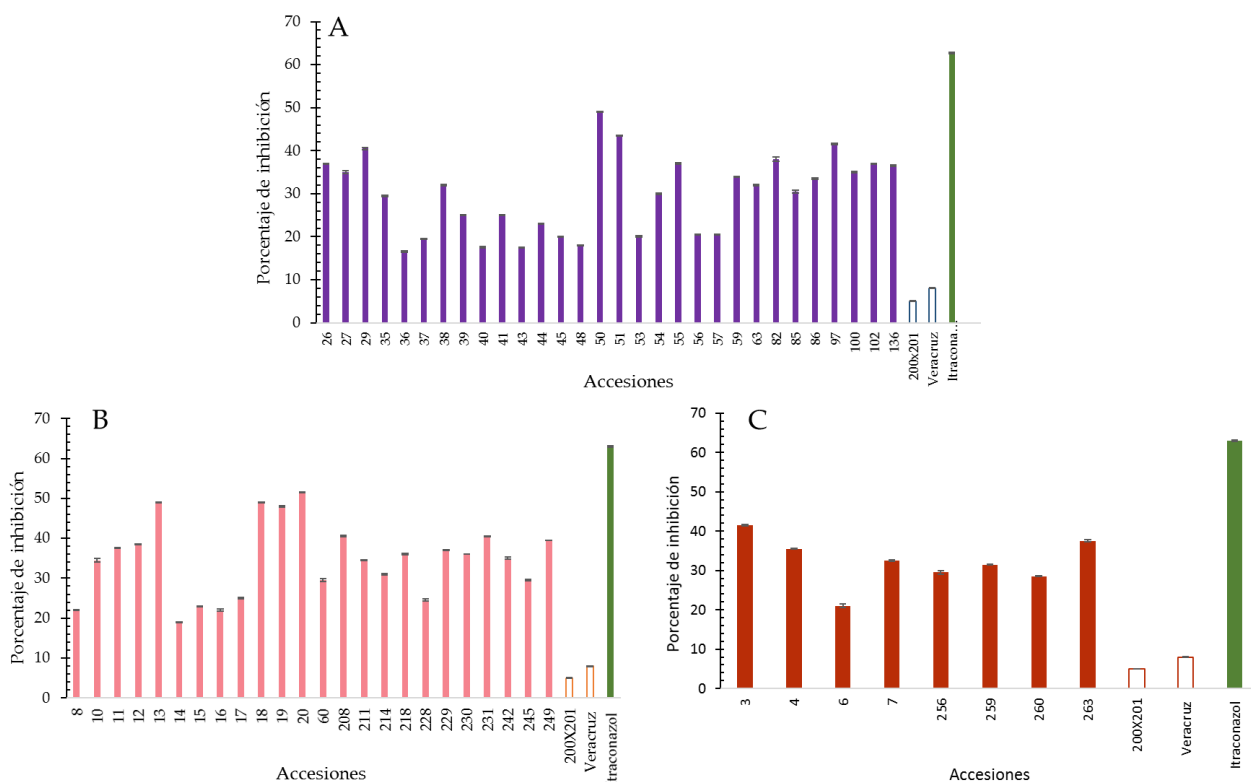


Figura 6. Porcentaje de inhibición de las accesiones de maíz con color de grano azul morado (A), rojo cereza (B) y rojo ladrillo (C) seleccionadas mediante la prueba de microdilución en placa.

Figure 6. Percentage inhibition of maize accessions with purple blue (A), cherry red (B) and brick red (C) kernel color selected by the microdilution plate test.

3.2.2 Accesiones de grano rojo cereza

El porcentaje de inhibición de las accesiones de grano de maíz color rojo cereza varió de 19 a 51.5 % (Fig. 6B), la accesión 20, de la raza Cónico fue la que mayor PI mostró (51.5 %), por lo que puede decirse que fue la de mayor AAF; el PI de esta accesión se ubicó 11.5 puntos porcentuales por debajo del antifúngico comercial (Itraconazol). La accesión 14, de la raza Elotes Cónicos fue la que presentó menor AAF, con un PI de 19 %.

El valor medio del PI para este color de grano fue de 34.69 %, con un coeficiente de variación de 26.62. Este valor promedio de PI fue mayor que el observado en las accesiones de grano color azul morado.

3.2.3 Accesiones de grano rojo ladrillo

Los resultados de PI entre las accesiones con esta coloración de grano variaron entre 21 y 41.5 %. La accesión 3 presentó el mayor PI y pertenece a la raza Olotón; el menor PI lo presentó la accesión 6 que proviene de la raza Dulce (Fig. 6C). El valor medio de PI entre las accesiones de grano RL fue 31.17 %, valor que resulta mayor que el promedio de las accesiones AZM, pero menor al observado en las accesiones con grano RC.

4. Conclusiones

El grano de las accesiones de maíz con coloraciones azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo posee actividad antifúngica asociada con el color del grano. De los tres colores de grano analizados, las accesiones que presentaron el mayor porcentaje de inhibición fueron las de grano color rojo cereza, seguidas por las de grano rojo ladrillo y por último las de grano azul morado. Aunque en la prueba de microdilución algunos de los extractos evaluados presentaron valores de absorbancia menores que el Itraconazol, lo que podría significar una elevada actividad antifúngica, en la prueba de inhibición ninguna de las accesiones igualó el porcentaje de inhibición mostrado por el Itraconazol. Son necesarios estudios sobre la composición fenólica de los extractos analizados para determinar los compuestos fenólicos involucrados en la actividad antifúngica del grano de maíz.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el apoyo parcial para realizar el presente estudio a través del proyecto de clave NE014.

Conflicto de intereses

Los autores reportan no tener conflicto de intereses para la publicación de estos resultados

5. Referencias

- Adom, K. K. & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 6182-6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Arnason, J. T., Gale, J., Conilh De Beyssac, B., Sen, A., Miller, S. S., Philogene, B. J. R., Lambert, J. D. H., Fulcher, R. G., Serratos, A. & Mihm, J. (1992). Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects, *Prostephanus truncatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch). *Journal of Stored Products Research* 28(2), 119-126. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(92\)90019-M](https://doi.org/10.1016/0022-474X(92)90019-M)
- Bastidas, O. (2013). Cell counting with Neubauer chamber, basic hemocytometer usage. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1-6
- Carbas, B., Simões, D., Soares, A., Freitas, A., Ferreira, B., Carvalho, A. R. F., Sanches-Silva, A., Pinto, T., Diogo, E., Andrade, E. & Brites, C. (2021). Occurrence of *Fusarium* spp. in maize grain harvested in Portugal and accumulation of related mycotoxins during storage. *Foods*, 10(2): 375. <https://doi.org/10.3390/foods10020375>
- Chadha, S. & Kale, S. P. (2015). Simple fluorescence-based high throughput cell viability assay for filamentous fungi. *Letters in applied microbiology* 61(3);, 238-244. <https://doi.org/10.1111/lam.12460>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009) Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality

- control limits for antifungal disk susceptibility testing of yeasts; *Informational supplement. CLSI document M44-S2*
- Das, A. K. & Singh, V. (2016). Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Food Chemistry* 201: 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.099>
- Ferruz, E., Loran, S., Herrera, M., Gimenez, I., Bervis, N., Barcena, C., Carramiñana, J. J., Juan, T., Herrera, A. & Ariño, A. (2016). Inhibition of *Fusarium* growth and mycotoxin production in culture medium and in maize kernels by natural phenolic acids. *Journal of food protection* 79(10): 1753-1758. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-563>
- Gromadzka, K., Błaszczuk, L., Chełkowski, J. & Waśkiewicz, A. (2019). Occurrence of mycotoxigenic *Fusarium* species and competitive fungi on preharvest maize ear rot in Poland. *Toxins* 11(4): 224. <https://doi.org/10.3390/toxins11040224>
- Han, Y., Vimolmangkang, S., Soria-Guerra, R. E. & Korban, S. S. (2012). Introduction of apple ANR genes into tobacco inhibits expression of both CHI and DFR genes in flowers, leading to loss of anthocyanin. *Journal of Experimental Botany* 63(7): 2437-2447. <https://doi.org/10.1093/jxb/err415>
- Hümmer, W. & Schreier, P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research* 52(12): 1381-1398. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700463>
- Ji, F., He, D., Olaniran, A. O., Mokoena, M. P., Xu, J. & Shi, J. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: A review. *Food Production, Processing and Nutrition* 1(6): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2>
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. & Bye, R. A. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF*, 116. https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/versiones_digitales/Origen_deMaiz.pdf
- Kumar, S., Abedin, M., Singh, A. K. & Das, S. (2020). Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In: Lone, R., Shuab, R., Kamili, A. (Eds). *Plant phenolics in sustainable agriculture* pp. 517-532. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22
- Li, J., Luan, Q., Han, J., Chen, C. & Ren, Z. (2022). CsMYB60 Confers Enhanced Resistance to *Fusarium solani* by Increasing Proanthocyanidin Biosynthesis in Cucumber. *Phytopathology*® 112(3): 588-594. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-21-0223-R>
- Libron, J. A. M. A., Cardona, D. E. M., Mateo, J. M. C., Beltran, A. K. M., Tuaño, A. P. P. & Laude, T. P. (2021). Nutritional properties and phenolic acid profile of selected Philippine pigmented maize with high antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 101: 103954. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103954>
- Magaña, J. M., Peniche, H. A., Tiessen, A. & Gurrola, C. M. (2020). Pigmented maize (*Zea mays* L.) contains anthocyanins with potential therapeutic action against oxidative stress-A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 70(2): 85-99. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113272>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard document M38-A. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa*
- Ochoa, Y. M., Cerna, E., Landeros, J., Hernández, S. & Delgado, J. C. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton (Buenos Aires)* 81(1): 69-73. <https://bit.ly/3WI2cOB>

- Pilu, R., Cassani, E., Sirizzotti, A., Petroni, K. & Tonelli, C. (2011). Effect of flavonoid pigments on the accumulation of fumonisin B1 in the maize kernel. *Journal of Applied Genetics* 52: 145–52. <https://doi.org/10.1007/s13353-010-0014-0>
- Prior, L. R, Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J. & Reed, J. (2010). Multi-Laboratory validation of a standard method for quantifying pranthocyanidins in cranberry powders. *J Sci Food Agric.* 90(9): 1473-1478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3966>
- Razgonova, M., Zinchenko, Y., Pikula, K., Tekutyeva, L., Son, O., Zakharenko, A., Kalenik, T. & Golokhvast, K. (2022). Spatial Distribution of Polyphenolic Compounds in Corn Grains (*Zea mays* L. var. Pioneer) Studied by Laser Confocal Microscopy and High-Resolution Mass Spectrometry. *Plants* 11(5): 630. <https://doi.org/10.3390/plants11050630>
- Rivas-Valencia, P., Virgen-Vargas, J., Rojas Martínez, I., Cano Salgado, A. & Ayala Escobar, V. (2011). Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6): 845-854. <https://doi.org/10.29312/remexca.v2i6.1565>
- Salinas, M. Y., Soto, H. M., Martínez, B. F., González, H. V., & Ortega, P. R. (1999). Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Rev. Fitotecnia Mexicana* 22(2), 161-174. <https://bit.ly/3oCcT8X>
- Salinas-Moreno, Y., García-Salinas, C., Ramírez-Díaz, J. L. & Alemán-de la Torre, I. (2017). Phenolic compounds in maize grains and its nixtamalized products. In: *Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango and Maria del Rosario Garcia-Mateos (Eds.) Phenolic compounds - Natural Sources, Importance and Applications.* pp. 215-232. IntechOpen <https://doi.org/10.5772/66893>
- Schöneberg, T., Kibler, K., Sulyok, M., Musa, T., Bucheli, T. D., Mascher, F., Bertossa, M., Voegelé, R. T. & Vogelgsang, S. (2018). Can plant phenolic compounds reduce *Fusarium* growth and mycotoxin production in cereals? *Food Additives & Contaminants: Part A*,35(12): 2455-2470. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1538570>
- Su, X., Zhao, J., Gao, W., Zu, Q., Chen, Q., Li, C., & Qu, Y. (2022). Gb_ANR-47 Enhances the Resistance of *Gossypium barbadense* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV) by Regulating the Content of Proanthocyanidins. *Plants* 11(15): 1902. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/15/1902#>
- Ullah, C., Unsicker, S.B., Reichelt, M., Gershenzon, J. & Hammerbacher, A. (2019). Accumulation of catechin and proanthocyanidins in black poplar stems after infection by *Plectosphaerella populi*: Hormonal regulation, biosynthesis and antifungal activity. *Front Plant Sci.*, 10: 1441. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01441>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>