

Micobiota asociada a lotes importados de semillas de moringa (*Moringa oleifera*)

Einar Martínez de la Parte, Taimy Cantillo Pérez y Dariel García Rodríguez

Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal. Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, La Habana, micologia@sanidadvegetal.cu

RESUMEN

La moringa (*Moringa oleifera* Lam.) es un árbol ampliamente cultivado en regiones tropicales y subtropicales que puede ser empleado como alimento humano y animal, con propiedades medicinales y antimicrobianas, y su aceite es considerado una fuente de biocombustible. Debido a sus potencialidades, en los últimos años el país ha importado lotes de semilla de moringa de diferentes orígenes con vistas a diseminar su cultivo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la micobiota asociada a semillas importadas de moringa mediante el empleo del método de blotter test y la taxonomía clásica para la identificación de las especies fúngicas asociadas a ellas. Fueron analizados 73 lotes de semilla provenientes de 12 países. De cada lote se analizaron 400 semillas mediante el método de blotter test. Se detectó una gran biodiversidad fúngica, con un total de 708 aislados pertenecientes a 47 especies de 26 géneros. De estos, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Chaetomium*, con ocho, seis y cuatro especies detectadas, respectivamente, fueron los géneros más representados, lo que constituye el 44,35 % de los aislados. Las especies más frecuentemente detectadas fueron *Phoma* sp. (69,4 %), *Rhizopus stolonifer* (63,9 %), *Aspergillus fumigatus* (58,3 %), *Fusarium solani* (55,6 %), *Aspergillus niger* (55,6 %), *Fusarium semitectum* (52,8%), *Phomopsis* sp. (50 %) y *Chaetomium globosum* (48,6 %). De las especies detectadas, solo *Bipolaris hawaiiensis*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium semitectum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Rhizopus stolonifer* han sido descritas como patógenos de la moringa.

Palabras claves: moringa, semilla, micobiota, *Fusarium*, *Aspergillus*

ABSTRACT

Drumstick tree or horse radish tree (*Moringa oleifera* Lam.) is a highly valued plant, widely cultivated in the tropics and subtropics with many uses as human and animal food, with medicinal and antimicrobial properties and its oil is considered a source of biofuels. For these reasons, Cuba has imported seed lots from different origins to spread this crop in the country. The objective of the present study was to determine mycobiota associated to drumstick imported seeds lots by blotter test methods and classic taxonomy for the identification of fungal species. 400 seeds from each 73 lot from 12 countries were analyzed by blotter test. A great fungal biodiversity with a total of 708 isolates belonging to 47 species of 26 genera was detected. *Fusarium*, *Aspergillus* and *Chaetomium*, with 8, 6 and 4 species identified, were the predominant genera constituting 44.35 % of all isolates. More frequent detected species were *Phoma* sp. (69.4 %), *Rhizopus stolonifer* (63.9 %), *Aspergillus fumigatus* (58.3 %), *Fusarium solani* (55.6 %), *Aspergillus niger* (55.6 %), *Fusarium semitectum* (52.8 %), *Phomopsis* sp. (50 %) and *Chaetomium globosum* (48.6 %). From detected species only *Bipolaris hawaiiensis*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium semitectum*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Rhizopus stolonifer* have been described as drumstick pathogens.

Key words: moringa, seed, mycobiota, *Fusarium*, *Aspergillus*

INTRODUCCIÓN

La moringa (*Moringa oleifera* Lam.), también conocida como *palo blanco* o *reseda*, es dentro de la familia Moringaceae (orden Brassicales) la especie más ampliamente cultivada en todo el mundo. Es un árbol originario del sur del Himalaya, el nordeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán [Pérez *et al.*, 2010].

Esta planta tiene varios usos. Casi todas sus partes pueden ser utilizadas como alimento humano. Parti-

cularmente las hojas contienen altos niveles de β -carotenos, proteínas, vitamina C, calcio y potasio [Anwar *et al.*, 2007], por lo que se considera que tiene un alto potencial para combatir la desnutrición. Debido a su valor nutricional y los elevados rendimientos de biomasa, también constituye un recurso fitogenético de importancia en los sistemas de producción ganadera [Pérez *et al.*, 2010]. Además, posee propiedades medicinales, por lo que sus flores, hojas, semillas y

raíces se han empleado en el tratamiento de varios padecimientos [Anwar *et al.*, 2007; Rahmatullah *et al.*, 2009; Talreja, 2010]. Por otra parte, sus extractos tienen probada actividad antimicrobiana [Enikuo-mehin y Oyedeji, 2010; Talreja, 2010; Rocha *et al.*, 2011; Ishnava *et al.*, 2012] y su aceite es una fuente de biocombustible [Rashid *et al.*, 2008].

Debido a sus potencialidades, en los últimos años Cuba ha importado lotes de semilla de moringa de diferentes orígenes con vistas a aumentar su cultivo en el país.

Las semillas constituyen un importante mecanismo de diseminación de patógenos al campo, una vez que pueden portar el inóculo de diferentes tipos de microorganismos dentro de los que se incluyen a los hongos [Neergarrd, 1988; Sumanth *et al.*, 2010]. El objetivo del presente trabajo fue determinar la micobiota asociada a semillas importadas de moringa mediante el empleo del método de *blotter test* y la taxonomía clásica para la identificación de las especies fúngicas asociadas a ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron analizados 73 lotes de semilla de moringa provenientes de 12 países (Australia, Brasil, Camerún, China, Colombia, Guatemala, India, Myanmar, Nicaragua, Tailandia, Paraguay y Venezuela). De cada lote se analizaron 400 semillas mediante el método de *blotter test* [ISTA, 1996]. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO 1%) por 1 min, colocadas en placas Petri de 15 cm con papel de filtro estéril humedecido con agua destilada e incubadas de 8-10 días con alternancia de luz-oscuridad (8 h de luz fluorescente y 16 h de oscuridad), a temperatura entre 22 y 24 °C.

Para la identificación de las especies de *Fusarium* se obtuvieron cultivos monoconidiales de los diferentes aislados, los cuales se inocularon en placas con agar-papa-dextrosa y agar-hojas de clavel (CLA; 20 de

agar en 1 L de agua destilada y fragmentos de hojas de clavel estériles), las cuales fueron incubadas a 25 °C en la oscuridad. Transcurridos cinco días de incubación los aislados fueron caracterizados morfo culturalmente y se identificaron según los criterios taxonómicos descritos por Leslie y Summerell (2006).

Se sembraron cultivos monoconidiales de los diferentes aislados de *Aspergillus* en placas con agar-Czapek-extracto de levadura (CYA; 1 g de K₂HPO₄, 10 mL de concentrado Czapek, 5 g de extracto de levadura, 30 g de sacarosa, 15 g de agar en 1 L de agua destilada), CYA suplementado con el 20 % de sacarosa (CY20S; 1 g de K₂HPO₄, 10 mL de concentrado Czapek, 5 g de extracto de levadura, 200 g de sacarosa, 15 g de agar en 1 L de agua destilada) y en agar-extracto de malta (AEM; 20 g de extracto de malta, 1 g de peptona, 20 g de glucosa, 20 g de agar en 1 L de agua destilada) e incubados por siete días en la oscuridad. Las placas con AEM y las de CY20S fueron incubadas a 25 °C, mientras que las de CYA se incubaron a 25 y 37 °C. Posteriormente los aislados se caracterizaron morfo culturalmente y se identificaron según los criterios taxonómicos descritos por Klich y Pitt (1988).

Los restantes hongos fueron identificados mediante caracterización morfométrica y según los criterios taxonómicos descritos por Ellis (1971), Sutton (1980), Watanabe (2002), Mena (2004), Burgess *et al.* (2006), Minter (2006 a; 2006 b) y Seifert *et al.* (2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó una gran biodiversidad fúngica asociada a semillas de moringa, con un total de 708 aislados fúngicos pertenecientes a 46 especies de 26 géneros. De estos, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Chaetomium* con ocho, seis y cuatro especies detectadas, respectivamente, fueron los géneros más representados, y constituyen el 44,35 % de los aislados (*Tabla, Fig.*).

Incidencia de especies fúngicas en semillas importadas de moringa

Especie	No. de aislados	Incidencia* (%)	Porcentaje del total
<i>Aspergillus</i> sp.	135	11,0	19,07
<i>Fusarium</i> sp.	111	6,8	15,68
<i>Chaetomium</i> sp.	68	12,5	9,60
<i>Phoma</i> sp.	50	6,5	7,06
<i>Rhizopus stolonifer</i>	46	23,0	6,50
<i>Phomopsis</i> sp.	36	10,0	5,08
<i>Alternaria alternata</i>	34	4,75	4,80

<i>Penicillium</i> sp.	32	19,5	4,52
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	31	7,3	4,38
Otros	165	—	23,31
Total	708		

* Valor máximo detectado.



Frecuencia de aparición de la micobiota asociada a semillas de moringa.

Phoma sp., *Rhizopus stolonifer* Ehr. Ex Fr., *Aspergillus fumigatus* Fres., *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Fusarium semitectum* Berkeley & Ravenel, *Phomopsis* sp. y *Chaetomium globosum* Kunze Fr. fueron las especies más frecuentemente detectadas (Fig.).

Los mayores porcentajes de semillas infectadas correspondieron respectivamente a *Rhizopus stolonifer* (23,0 %), *Penicillium* sp. (19,5 %), *Chaetomium* sp. (12,5 %), *Aspergillus* sp. (11 %) y *Phomopsis* sp. (10 %) (Tabla).

A pesar de que en los últimos años se han publicado numerosos trabajos con las propiedades y usos de la moringa, existen pocos estudios de los hongos fitopatógenos que afectan al cultivo, y no se encuentran en la literatura científica artículos relacionados con los hongos asociados a la semilla de moringa.

De las 46 especies fúngicas detectadas en el presente estudio solo cinco han sido descritas como patógenos de la moringa. *Fusarium semitectum* (sin. *F. pallidroseum*), con una frecuencia de aparición del 54,3 %, se ha informado como agente causal de cáncer o marchitamiento de ramas y pudrición de las vainas o frutos [Mandokhot et al., 1994]. También se han informado como agentes causales de pudriciones de frutos de moringa a *Bipolaris hawaiiensis* [Kshirsagar y D'Souza, 1989] y *Rhizopus stolonifer* [Rahman et al., 2001] detectados en el 15,7 % y 64,3 % de los lotes de semilla analizados, respectivamente.

Por otra parte, *M. oleifera* es hospedante de *Lasioidiplodia theobromae* (44,3 %) y *Cladosporium herbarum* (14,3 %), según Farr y Rossman (2012), mientras que *Nigrospora* sp. (10 %) se ha informado como hongo endofítico asociado a raíces de este cultivo [Zhao et al., 2012].

También *Colletotrichum* sp., *F. solani* y *Phomopsis* sp., presentes respectivamente en el 6,9 %, 55,6 % y 50 % de las muestras, han sido detectadas por el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal de Cuba en muestras de plantas de moringa en fase de vivero con síntomas de pudrición del tallo.

Del género *Chaetomium* se identificaron las especies *C. globosum*, *C. homophilatum*, Omvik, *C. indicum* Corda y *C. spirale* Zopf, con una frecuencia de aparición del 48,6 %, 8,3 %, 12,5 % y 23,6 %, respectivamente. Las especies de este género son por lo general saprofitos, contaminantes de semillas en numerosas especies

vegetales [Neergaard, 1988], que afectan negativamente la germinación y están asociados al desarrollo anormal de semillas [Ismail et al., 2012]. Por ejemplo, *C. indicum* ha sido registrado en Pakistán asociado a semillas de maní (*Arachis hypogaea*) y en la India a semillas deformadas y decoloradas de *Brassica juncea* [Minter, 2006 b]. Otra de las especies presentes en este estudio, *C. globosum* tiene un rango de hospedantes aún mayor que el de cualquier otra especie de su género [Minter, 2006 a]. Existen numerosos registros que indican su incidencia en diferentes especies de semillas y afectan su germinación [Watanabe, 2002; Sharfun-Nahar et al., 2005; Lezcano et al., 2006; Niaz y Dawar, 2009; Abdullah y Al-Mosawi, 2010].

Los hongos son los agentes causales más importantes del deterioro de las semillas durante su almacenamiento; causan disminución de su poder germinativo, enmohecimiento y pudrición [Krishnamurthy et al., 2008]. Dentro de los llamados hongos de almacén, *Aspergillus* sp. es uno de los géneros fúngicos que predominan en los estudios de análisis de la micobiota asociada a diferentes tipos de semilla [Krishnamurthy et al., 2008; Riba et al., 2008; Amadi y Adeniyi, 2009; Niaz y Dawar, 2009; Sumanth et al., 2010]. De las especies de *Aspergillus* identificadas, *A. fumigatus* fue la que presentó mayor frecuencia de aparición con el 58,3 %, seguida por *A. niger* van Tieghem (55,6 %), *A. ochraceus* Wilhelm (30,6 %), *Aspergillus flavus* Link (25 %), *A. terreus* Thom (16,7 %) y *A. candidus* Link (1,4 %). Todas estas especies son reconocidas productoras de toxinas [Riba et al., 2008; Amadi y Adeniyi, 2009; Niaz y Dawar, 2009], por lo que además de afectar la germinación de las semillas o causar su pudrición, pueden comprometer su consumo en fresco debido al riesgo que representan estos compuestos para la salud humana.

CONCLUSIONES

- Se detectó un total de 708 aislados fúngicos pertenecientes a 47 especies de 26 géneros asociados a semillas importadas de moringa.
- Las especies más frecuentemente detectadas fueron *Phoma* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Fusarium semitectum*, *Phomopsis* sp. y *Chaetomium globosum*.
- De las 48 especies fúngicas detectadas en los lotes de semilla analizados solo *Bipolaris hawaiiensis*,

Cladosporium herbarum, *Fusarium semitectum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Rhizopus stolonifer* han sido descritas como patógenos de la moringa.

REFERENCIAS

- Abdullah, S. K.; K. A. Al-Mosawi: «Fungi Associated with Seeds of Sunflower (*Helianthus annuus*) Cultivars Grown in Iraq», *Phytopathologia* 57: 11-20, Polonia, 2010.
- Amadi, J. E.; D. O. Adeniyi: «Mycotoxin Production by Fungi Isolated from Stored Grains», *African Journal of Biotechnology* 8 (7): 1219-1221, Kenya, 2009.
- Anwar, F.; S. Latif; M. Ashraf; A. H. Gilani: «*Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses», *Phytotherapy Research* 21: 17-25, EE.UU., 2007.
- Burgess, T. I.; S. Mohali; G. Pegg; W. de Beer; M. J. Wingfield: «Three New *Lasiodiplodia* spp. from the Tropics, Recognized Based on DNA Sequence Comparison and Morphology», *Mycologia* 98 (3): 423-435, EE.UU., 2006.
- Ellis, M. B.: *Dematiaceae Hyphomycetes* CMI, Kew, Surrey, Reino Unido, 1971.
- Enikuomehin, O. A.; E. O. Oyedele: «Fungitoxic Effect of Some Plant Extracts Against Tomato Fruit Rot Pathogens», *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43 (3): 233-240, Reino Unido, 2010.
- Farr, D. F.; A. Y. Rossman: «Fungal Databases», Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, <http://nt.ars-grin.gov/fungal-databases/index.cfm>. EE.UU., 2012. (consultado el 8 de marzo de 2012).
- Ishnava, K. B.; K. H. Chauhan; C. A. Bhatt: «Screening of Antifungal Activity of Various Plant Leaves Extracts from Indian Plants», *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45 (2): 152-160, Reino Unido, 2012.
- Ismail, M.; S. A. Anwar; M. I. Ul-Haque; A. Iqbal; N. Ahmad; M. A. Arain: «Seed-Borne Fungi Associated with Cauliflower Seeds and Their Role in Seed Germination», *Pak. J. Phytopathol.* 24 (1): 26-31, Pakistán, 2012.
- ISTA: «International Rules for Seed Testing», *Seed Science Technology* 24: 1-335, Suiza, 1996.
- Klich, M. A.; J. I. Pitt: *A Laboratory Guide to the Common Aspergillus Species and Their Teleomorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia, 1988.
- Krishnamurthy, Y. L.; J. Shashikala; B. Shankar Naik: «Antifungal Potential of Some Natural Products Against *Aspergillus flavus* in Soybean Seeds During Storage», *Journal of Stored Products Research*, 44: 305-309, Holanda, 2008.
- Kshirsagar, C. R.; T. F. D'Souza: «A New Disease of Drumstick», *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* 14 (2): 241-242, India, 1989.
- Leslie, J.; B. Summerell: *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing, Ames Iowa, EE.UU., 2006.
- Lezcano, J. C.; B. Martínez; O. Alonso: «Detección de *Chaetomium indicum* Corda asociado a semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú», *Revista Protección Vegetal*, 21 (3): 191-193, Cuba, 2006.
- Mandokhot, A. M.; P. A. Fugro; S. B. Gonkhalekar: «A New Disease of *Moringa oleifera* in India», *Indian Phytopathology* 47 (4): 443, India, 1994.
- Mena, J.: «Taxonomía del complejo *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Exserohilum* en Cuba», tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2004.
- Minter, D. W.: «*Chaetomium globosum*», IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, Sheet 1685, Reino Unido, 2006 a.
- Minter, D. W.: «*Chaetomium indicum*», IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, Sheet 1687, Reino Unido, 2006 b.
- Neergaard, P.: *Seed Pathology*. MacMillan Press LTD. vols. 1 y 2, Reino Unido. 1988. pp. 165, 462.
- Niaz, I.; S. Dawar: «Detection of Seed Borne Mycoflora in Maize (*Zea mays* L.)», *Pak. Journal of Botany* 41 (1): 443-451, Pakistán, 2009.
- Pérez, A.; T. Sánchez; N. Armengol; F. Reyes: «Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal», *Pastos y Forrajes* 33 (4): 1-16, Cuba, 2010.
- Rahman, Z.; Z. Alam; A. Nurul: «A Comparative Investigation on the Physio-Chemical Properties and Some Selected Enzymes Content in the Flesh of Healthy and *Rhizopus stolonifer* Infected Moringa Fruit», *Indian Phytopathology* 54 (3): 293-298, India, 2001.
- Rahmatullah, M.; A. Noman; S. Hossain; Md. Harun-Or-Rashid; T. Rahman; M. H. Chowdhury; J. Rowan: «A Survey of Medicinal Plants in Two Areas of Dinajpur district, Bangladesh Including Plants Which Can Be Used As Functional Foods», *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3 (4): 862-876, Jordania, 2009.
- Rashid, U.; F. Anwar; B. R. Moser; G. Knothe: «*Moringa oleifera* oil: A possible Source of Biodiesel», *Bioresource Technology* 99 (17) 8175-8179, Holanda, 2008.
- Riba, A.; S. Mokrane; F. Mathieu; A. Lebrihi; N. Sabaou: «Mycoflora and Ochratoxin A Producing Strains of *Aspergillus* in Algerian Wheat», *International Journal of Food Microbiology*, 122: 85-92, Holanda, 2008.
- Rocha, M. F. G.; F. L. Nascimento de Aguiar; R. S. Nogueira; R. de Aguiar; C. E. Cordeiro; D. de Souza; M. Castelo-Branco; M. Neto; J. P. Otaviano; J. Mafezoli; C. M. de Souza; F. G. Barbosa; J. J. Costa: «*Moringa oleifera* and *Vernonia* sp. Extracts Against *Candida albicans* and *Microsporum canis* Isolates from Dogs and Cats and Analysis of Toxicity to *Artemia* sp.», *Ciência Rural* 41 (10): 1807-1812, Brasil, 2011.
- Seifert, K. A.; G. Morgan-Jones; W. Gams; B. Kendrick: *The Genera of Hyphomycetes*, CBS Biodiversity Series 10. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Holanda, 2011.
- Sutton, B. C.: *The Coelomycetes* Surrey: CABI Publications, Reino Unido, 1980.
- Sharfun-Nahar, Mushtaq M., Hashmi M. H.: «Seed-Borne Mycoflora of Sunflower (*Helianthus annuus* L.)», *Pakistan Journal of Botany* 37: 451-458, Pakistán, 2005.
- Sumanth, G. T.; B. M. Waghmare; S. R. Shinde: «Incidence of Mycoflora from the Seeds of Indian Main Spices», *African Journal of Agricultural Research* 5 (22): 3122-3125, Nigeria, 2010.
- Talreja, T.: «Screening of Crude Extract of Flavonoids of *Moringa oleifera* Against Bacteria and Fungal Pathogens», *Journal of Phytology* 2: 31-5, Japón, 2010.
- Watanabe, T.: *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EE.UU., 2002.
- Zhao, J.; Y. Zhang; L. Wang; J. Wang; C. Zhang: «Bioactive Secondary Metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an Endophytic Fungus of the Medicinal Plant *Moringa oleifera* Lam», *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (5): 2107-2112, Holanda, 2012.