

EFFECTO DE DIFERENTES SUSTANCIAS EN EL DESARROLLO DE
ALGUNAS ESPECIES DE HONGOS DE GRANOS ALMACENADOS

por Verónica Ma. T. Nava-Rodríguez*
Guadalupe Vidal-Gaona**
Cristina Ma. J. Pérez-Reyes**
y Marisol Robledo y Monterrubio***

EFFECT OF DIFFERENT CHEMICALS ON THE DEVELOPMENT OF
SEVERAL MOULDS FROM STORED GRAINS

SUMMARY

The fungistatic and fungicid effect of different chemicals were proved on several moulds that invade stored grains. Three kinds of experiments were performed, sharing spore germination on agar slides and fungal growth on paper disc methods. The first experiment was related to the activity of boric acid, salicylic acid, eugenol (1,000, 5,000 and 10,000 p.p.m. respectively), and essential acids of *Licaria alata* (12.5, 25 and 50 mg/ml) on spore germination of *Aspergillus flavus*. In the second experiment, all of the previous chemical substances were increased to a concentration of 20,000 p.p.m. and tested on *Aspergillus parasiticus*, *A. candidus* and *Penicillium cyclopium*. In the third and last one, the effect of Captan 80 on *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus* and *A. parasiticus* was proved. The different fungal strains sensitivities toward the chemicals tested are discussed.

RESUMEN

Se probó el efecto de diferentes sustancias sobre especies de hongos que invaden granos almacenados. Se llevaron a cabo tres experimentos que comprenden los métodos de germinación de esporas en portaobjetos y crecimiento en sensidiscos. En el primer experimento se probó el efecto del ácido bórico, ácido salicílico y eugenol en concentraciones de 1,000, 5,000 y 10,000 p.p.m. y aceites esenciales de *Licaria alata* a 12.5, 25 y 50 mg/ml sobre la germinación de *Aspergillus flavus*; en el segundo experimento se aumentó la dosis a 20,000 p.p.m. de todas las sustancias y se probaron para *Aspergillus parasiticus*, *A. candidus* y *Penicillium cyclopium*. Por último se probó el efecto de Captan 80 en *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus* y *A. parasiticus*. Existen diferencias en la sensibilidad de estos hongos para las sustancias usadas.

* Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB), México, D.F.

** Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, México, D.F.

*** Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.

INTRODUCCION

Actualmente debido a la gran explosión demográfica, la necesidad de alimento es cada vez mayor, por tal motivo se han desarrollado tecnologías para obtener mejor calidad y mayor cantidad de los productos agrícolas, sin embargo, poco se ha hecho para lograr una buena conservación de los mismos, teniendo como resultado considerables pérdidas económicas.

La forma práctica de conservar granos y semillas libres del ataque de hongos, ha sido la de mantener condiciones de temperatura y humedad bajas en los lugares de almacenamiento; no obstante, en las regiones tropicales es difícil tener estas condiciones por lo que es necesario encontrar otras opciones para la buena conservación de los granos y semillas.

Moreno y Vidal-Gaona (1981) probaron el efecto de diferentes fungicidas sobre la viabilidad de semillas de maíz almacenadas en humedad relativa de 85% y temperatura de 26°C, por un período de 150 días y encontraron que los fungicidas utilizados preservaron el poder germinativo de la semilla tratada en comparación con la no tratada. De los productos probados, la mayoría son tóxicos para los animales, incluso el hombre, lo cual implica ciertas limitaciones para su uso, por lo que es importante conocer el efecto de nuevos productos en contra de hongos de almacén y que además reúnan el mayor número de características para ser considerados como fungicidas efectivos, siguiendo las recomendaciones de Sharvelle (1969).

Hasta la fecha, han sido probados para estos propósitos algunos conservadores de alimentos como: ácido propiónico (Kozakiewicz y Clarke, 1973, Kozakiewicz, 1976), ácido fórmico y ácido propiónico (Mulinge y Apinis, 1969) y conservex y ácido propiónico (Lappe, 1977). Otra posibilidad para controlar hongos de granos almacenados, sería la aplicación de sustancias obtenidas a partir de productos naturales, como es el caso de los aceites esenciales, cuyo efecto fungicida en contra de hongos de campo ha sido probada (Maruzella *et al.*, 1969, French *et al.*, 1978).

El presente trabajo tiene como propósito probar el efecto de diferentes sustancias en contra de algunas especies de hongos de granos almacenados.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la suspensión valorada de esporas.

Esta suspensión de esporas se realizó con la técnica de Sharvelle (1969), utilizando cultivos de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. candidus*, *A. ochraceus* y *Penicillium cyclopium*, desarrollados en cajas de Petri con czapeck-agar durante 10 días. La suspensión fue ajustada a 50,000 esporas por ml, añadiendo agua destilada estéril.

Sustancias químicas probadas.

Fueron utilizadas las siguientes sustancias químicas en diferentes concentraciones: ácido bórico, ácido salicílico y eugenol a 1,000, 5,000 y 10,000 p.p.m., ácido bórico, ácido acético, ácido fórmico y eugenol a 20,000 p.p.m., Captan 80 a 10, 20 y 40 p.p.m. y los aceites esenciales de *Licaria alata* a 12.5, 25 y 50 mg/ml.

Técnica de germinación de esporas en portaobjetos.

Se siguió el método propuesto por Sharvelle (1969), que consiste en poner una

gota de la suspensión valorada de esporas y dos gotas de la concentración deseada del compuesto a probar, con una pipeta estéril de 5 ml sobre cada una de las excavaciones del portaobjetos, utilizando un portaobjetos con tres excavaciones o repeticiones, colocadas dentro de una cámara húmeda, siguiendo la técnica de Nava (1981), la cual consiste en una caja de Petri de vidrio estéril, en cuyo fondo fue colocado un disco de papel filtro húmedo con agua destilada estéril; sobre el papel se colocó un triángulo de vidrio estéril en el que fue puesto el portaobjetos y la caja fue sellada perfectamente con papel parafilm para evitar el escape de los compuestos volátiles. Estas cámaras húmedas fueron incubadas a 26°C en un cuarto de temperatura controlada durante 24 horas. Posteriormente se contó el número de esporas germinadas y esporas no germinadas, en 6 campos de microscopio óptico con el objetivo de 40X.

Para favorecer la germinación de las esporas de los diferentes hongos utilizados, siguiendo a McCallan (1947), fue agregada a cada concentración de los compuestos probados 0.1% de papa-dextrosa-agar (PDA), fungiendo esta solución como testigo, asimismo en las diferentes concentraciones probadas de eugenol y aceites esenciales de *Licaria alata* fue utilizada una solución de acetona-agua (1:10 v/v) para obtener una mezcla homogénea y disolver estos compuestos grasos. En este caso el testigo contenía solamente la solución agua-acetona y 0.1% de PDA.

Técnica de sensidiscos.

Con cada una de las diferentes concentraciones de los productos químicos, se impregnaron 9 discos de papel filtro y se adicionaron dos gotas de la suspensión calibrada de esporas con pipetas de 5ml. posteriormente fueron transferidos asépticamente tres discos en cada caja de petri, conteniendo medio de czapeck agar con 20% de sacarosa. Fueron utilizadas tres repeticiones para cada una de las concentraciones de los diferentes productos químicos probados. Esto mismo fue realizado para el testigo al cual se adicionaron dos gotas de agua estéril. Después de 5-10 días se realizaron los registros con base en el crecimiento positivo, negativo o restringido del hongo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimento I

Germinación de esporas (tabla 1).

1. Acido bórico. Ninguna concentración fue totalmente inhibitoria. A 10,000 p.p.m. se obtuvo 3% de esporas germinadas a diferencia del grupo testigo con 40%.
2. Acido salicílico. Las tres concentraciones usadas (1,000 p.p.m., 5,000 p.p.m. y 10,000 p.p.m.) fueron totalmente inhibitorias, en comparación con el grupo testigo con 37%.
3. Eugenol. En las tres concentraciones se observó un 0% de esporas germinadas.
4. Aceites esenciales de *Licaria alata*. Se usaron 12.5 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml las cuales fueron totalmente inhibitorias.

De los resultados se observa que *A. flavus* presenta cierta tolerancia a las dosis probadas de ácido bórico, siendo esta relación inversamente proporcional con respecto a la germinación de esporas, a diferencia con el ácido salicílico, eugenol y aceites esenciales de *L. alata*, con los cuales fue altamente sensible. Esta tolerancia

TABLA 1

CRECIMIENTO EN SENSIDISCOS DE *Aspergillus flavus*, CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS SUSTANCIAS PROBADAS

P.P.M.	AC. BORICO			AC. SALICILICO			EUGENOL			mg/ml.	<i>Licaria alata</i>		
1,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12.5	+	+	+
5,000	+	+	+	+	+	+	*	*	*	25.0	+	+	+
10,000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	50.0	+	+	+
TESTIGO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	TEST.	+	+	+

+ = CRECIMIENTO SEMEJANTE AL TESTIGO

* = CRECIMIENTO RESTRINGIDO

al ácido bórico se puede atribuir a que probablemente no interfiera en las principales vías metabólicas.

En las pruebas de ácido salicílico, eugenol y aceites esenciales de *L. alata* todas las concentraciones fueron inhibitorias por lo que sería conveniente probar menores dosis hasta encontrar la dosis mínima inhibitoria.

Experimento II

Germinación de esporas (tablas 3 y 4).

La germinación de esporas de *A. candidus*, *A. parasiticus* y *P. cyclospium* fue totalmente inhibida por el ácido bórico, ácido acético, ácido fórmico y eugenol a 20,000 p.p.m. (tabla 3). Para el caso de los testigos (con PDA al 0.19% y acetona-agua 1/10) se puede ver el efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas de *A. candidus* con 89% de germinación; no así, para *P. cyclospium* con el cual resultó ser un estimulante para la germinación de sus esporas con 91.9% de germinación (tabla 4), este mismo fenómeno se observa en *P. italicum* con aceites de cítricos (French *et al.*, 1978).

Experimento III

Germinación de esporas.

En la tabla 6 se presentan los resultados del porcentaje de germinación de esporas de *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus* y *A. parasiticus*, bajo el efecto de Captan 80 a 10 p.p.m., 20 p.p.m. y 40 p.p.m. En *A. flavus* la germinación del testigo fue de 48.9%; a 10 p.p.m. se obtuvo una germinación de 62.9% y en la concentración de 20 p.p.m. se encontró una disminución en la germinación de 19%, finalmente a 40 p.p.m. hubo una completa inhibición.

En *A. candidus* en el testigo se encontró una germinación de 4%, en la concentración de 10 p.p.m. se obtuvo un 8% de la germinación. Las otras dos concentraciones 20 y 40 p.p.m. respectivamente, inhibieron por completo la germinación de las esporas. En *A. ochraceus* la germinación de esporas en el testigo fue de 32.9%; a 10 p.p.m. se obtuvo una germinación de 12%; en 20 p.p.m. la germinación fue de 28.9% y a 40 p.p.m. inhibió en mayor grado aunque no de manera total (3%). En *A. parasiticus* hubo una menor germinación a mayor concentración, presentándose una inhibición total de la germinación a 20 y 40 p.p.m.

Como se observa en estos resultados el efecto del Captan 80 varió con respecto a las especies probadas y a las concentraciones a las cuales se aplicó siendo *A. ochraceus* el más tolerante. La acción del Captan 80 en relación a la fisiología de los hongos está dada por la inestabilidad de los enlaces de los componentes de su molécula, por lo que éste puede reaccionar con los compuestos sulfidros del protoplasma de las células, provocándose así, la inhibición de enzimas importantes en los procesos metabólicos, tal es el caso de la coenzima A (Lukens y Horsfall, 1964).

Por otro lado, se ha mencionado la posibilidad de que al reaccionar el Captan 80 con los compuestos intracelulares, se formen productos que resulten tóxicos, además de cambiar la permeabilidad de la membrana, permitiendo así que sustancias esenciales sean expulsadas al exterior inhibiendo algunos procesos fisiológicos (Thomas y Hugh, 1962).

CreCIMIENTO en sensidiscos.

En los tres experimentos en todas las concentraciones y en las cuatro especies de

TABLA 2

PORCENTAJE DE GERMINACION DE ESPORAS DE *Aspergillus flavus* BAJO EL EFECTO DE LAS DIFERENTES SUSTANCIAS PROBADAS

P.P.M.	AC. BORICO	AC. SALICILICO	EUGENOL	mg/ml.	<i>Licaria alata</i>
1,000	34	0	0	12.5	0
5,000	21	0	0	25.0	0
10,000	3	0	0	50.0	0
TESTIGO	40	37	33	TEST.	33

TABLA 3

PORCENTAJE DE GERMINACION DE ESPORAS BAJO EL EFECTO DE DIFERENTES COMPUESTOS A 20,000 P.P.M.

ESPECIE	AC. BORICO	AC. ACETICO	AC. FORMICO	EUGENOL
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0	0	0	0
<i>Aspergillus candidus</i>	0	0	0	0
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	0	0	0

TABLA 4

PORCENTAJE DE GERMINACION DE ESPORAS EN LOS DOS GRUPOS TESTIGO

ESPECIE	TESTIGO PDA 0.1%	TESTIGO ACETONA-AGUA 1/10
<i>Aspergillus parasiticus</i>	66	70
<i>Aspergillus candidus</i>	8	4
<i>Penicillium cyclopium</i>	7	91

TABLA 5

CRECIMIENTO EN SENSIDISCOS DE HONGOS DE ALMACEN CON LAS DIFERENTES SUSTANCIAS PROBADAS A 20,000 P.P.M.

ESPECIES	TESTIGO	TEST. EUGENOL	EUGENOL	AC. ACETICO	AC. FORMICO	AC. BORICO
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus candidus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium cyclopium</i>	+	+	+	*	*	*

+ = CRECIMIENTO SEMEJANTE AL TESTIGO

* = CRECIMIENTO RESTRINGIDO

PORCENTAJE DE GERMINACION DE ESPORAS DE *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus* y *A. parasiticus* CON CAPTAN 80 EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

	<i>A. candidus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
TESTIGO	4	31	48	69
10 P.P.M.	8	12	61	18
20 P.P.M.	0	28	19	0
40 P.P.M.	0	3	0	0

TABLA 7

CRECIMIENTO EN SENSIDISCOS DE *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus* y *A. parasiticus*, TRATADOS CON CAPTAN 80 EN DIFERENTES CONCENTRACIONES

	<i>A. candidus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
TESTIGO	+	+	+	+
10 P.P.M.	+	+	+	+
20 P.P.M.	+	+	+	+
40 P.P.M.	+	+	+	+

hongos se obtuvo un crecimiento positivo (tablas 1, 5 y 7). A excepción de *Penicillium cyclopium* que con eugenol y ácido fórmico en el experimento II hubo crecimiento restringido (Tabla 5).
Este experimento resultó ser poco representativo de los efectos de las sustancias aún en concentraciones altas. Restos de michejo pudieron iniciar el crecimiento dado que se dejaron incubados durante 10 días, la concentración pudo haberse diluido hasta multiplicar sus efectos contra el hongo. Otra de las causas probablemente fue que durante la aplicación de los compuestos, estos se volatizaron y por lo tanto hubo una pérdida en la concentración de los mismos, dato que concuerda con el trabajo de Kozakiewicz y Clarke (1973).

LITERATURA CITADA

Christensen, C.M. y H.H. Kaufmann, 1969. *Grain Storage. The Role of Fungi in Quality Loss*. Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, 153 pp.
French, R.C., R.K. Long, G.M. Latterell, C.L. Graham, J.J. Smoot y P.E. Shaw, 1978. Effect of nonanal, citral and citrus oils on germination of conidia of *Penicillium digitatum* and *P. italicum*. *Phytopathology* 68: 877 - 882.
Kozakiewicz, Z. y J.H. Clarke, 1975. Techniques of determining toxicity of propionic acid to fungi from stored grains. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 61: 355 - 367.
Kozakiewicz, Z., 1976. Further experiments to determine the toxicity of propionic acid to fungi infesting stored grains. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 319 - 324.
Lappe, O.P., 1977. Acción de algunos fungicidas en la conservación de maíz y triticale. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. 112 p.
Lukens, J.R., S. Rich y J.G. Horsfall, 1965. Role of the R group in the fungitoxicity M-R-SCCL₃ compounds. *Phytopathology* 55: 658 - 662.
Maruzzella, C.J., D.A. Sandis, J.B. Scandis y G. Grabon, 1960. Action of odoriferous organic chemicals and essential oils on wood-destroying fungi. *Plant Diseases Report* 44: 789 - 792.
McCallan, A.E., 1947. Bioassay of agricultural fungicides. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 2: 23 - 33.
Moreno, E. y G. Vidal-Gaona, 1981. Preserving the viability of stored maize seed with fungicides. *Plant Dis.* 65: 260 - 261.
Mulling, S.K. y A.E. Aphinis, 1969. Occurrence of thermophilous fungi in stored moist barley grain. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 53: 361 - 370.
Nava, R.V., 1981. Mecanismos de defensa en estados juveniles de especies primarias de setva alta perennifolia contra el ataque de hongos. Resúmenes del VII Congreso Mexicano de Botánica, Morelia, Pág. 322.
Sharville, G.E., 1969. *Chemical Control of Plant Diseases*. Prestige Press, Texas.
Thomas, C.M. y D.S. Hugh, 1962. Effects of Captan on glucose metabolism and growth of *Saccharomyces pastorianus*. *Phytopathology* 52: 94 - 102.