



**“Estudios ecofisiológicos aplicados a la producción de un
curasemillas biofungicida
para hongos productores de fumonisinas en maíz”**

Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas

Mic. Melina V. Sartori

Dirección: Dra. Miriam G. Etcheverry

Co - dirección: Dra. Andrea V. Nesci

Río Cuarto, 20 de Marzo de 2013.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Ecología Microbiana
del Departamento de Microbiología e Inmunología,
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto

Directora:

Dra. Miriam G. Etcheverry _____

Co - directora:

Dra. Andrea V. Nesci _____

Aprobado por los miembros del jurado:

Dra. Mará Isabel Sanz Ferramola _____

Dra. Stella Maris Alzamora _____

Ing. Gustavo Mariano Dal Bello _____

Río Cuarto, 20 de marzo de 2013.

RESUMEN

El mercado del maíz está direccionado a mejorar la calidad de producción y el rendimiento de granos a cosecha. La eficiencia de la utilización del grano de maíz en la alimentación está estrechamente vinculada con la calidad sanitaria del mismo. *Fusarium verticillioides*, es un fitopatógeno que invade de forma sistémica la planta de maíz causándole importantes enfermedades; su presencia durante el crecimiento y desarrollo del cultivo, aumenta el riesgo de contaminación de los granos con las micotoxinas fumonisinas; causantes de leucoencefalomalacia equina y edema pulmonar porcino, y clasificadas como carcinogénicas del tipo 2B para el hombre. Es por ello de suma importancia el desarrollo de estrategias de control de *F. verticillioides* con el fin de prevenir la contaminación del cultivo. El control biológico se presenta como una alternativa al control químico, a fin de evitar sus consecuentes efectos adversos. En investigaciones previas se seleccionaron los agentes de biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* y *Microbacterium oleovorans*, eficaces en la reducción del fitopatógeno y el contenido de fumonisinas en granos a cosecha. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar dos bioformulados con estos agentes de control biológico, que fueran capaces de mantener el potencial biofungicida de los mismos, incrementar la tolerancia a las fluctuaciones ambientales y lograr una producción de alta eficacia y bajo costo. Se realizó la adaptación fisiológica de los ACB en condiciones de estrés osmótico y se demostró que ambos sintetizan los solutos compatibles glicina-betaína y ectoína, lo cual favorece el rendimiento durante el proceso de formulación y permite a las células incrementar la tolerancia al estrés ambiental de la rizósfera de maíz en el campo. Se seleccionó el medio de cultivo a base de melaza modificado osmóticamente con ClNa a actividad acuosa (a_w) 0,97. En dicho medio se obtuvo buena producción de biomasa y alta sobrevivencia. Se probaron los rendimientos de formulados líquidos y liofilizados. Para la bacterización de las semillas se seleccionó *in vitro* el adhesivo aceite de parafina al 2%, el cual permitió obtener un pelleteado uniforme, importante viabilidad de los ACB durante el almacenamiento y no afectó la germinación ni el crecimiento de las plántulas. En un primer ensayo a campo se realizó la bacterización de las semillas con los formulados liofilizados y agua como humectante y adhesivo. Si bien la inoculación de la simiente con los ACB no se tradujo en una disminución de la incidencia de *F. verticillioides* en los granos, se observó una reducción significativa del contenido de fumonisina B₁. Plantas tratadas con el

formulado a base de *M. oleovorans* mostraron una reducción de fumonisina B₁ mayor al 70%, y con el formulado de *B. amyloliquefaciens* mayor al 50%. Con el fin de determinar a nivel de campo la eficacia del adhesivo seleccionado *in vitro*, se realizó durante dos años consecutivos el mismo ensayo con semillas bacterizadas con los formulados liofilizados y aceite de parafina al 2%. Tales tratamientos no alteraron la incidencia del patógeno ni generaron una reducción significativa del contenido de toxina en los granos a cosecha. Por ello concluimos, que la óptima bacterización de las simientes de maíz con los bioformulados liofilizados, con la finalidad de generar una reducción significativa del contenido de toxinas en granos a cosecha, se debe realizar con agua, como adhesivo y humectante, previo a la siembra. Es importante destacar que los formulados biológicos elaborados son compatibles con los curasemillas convencionales, son ambientalmente seguros, inocuos, no alteran la actividad microbiana de las comunidades del suelo, no dejan residuos y no generan resistencia. No existen en el mercado nacional e internacional actual, productos biofungicidas con estas mismas características.

ABSTRACT

The maize market had been directed to improving the quality of production and grain yield at harvest. The efficiency of the use of maize grain in the diet is closely related to the sanitary quality of it. *Fusarium verticillioides* is a plant pathogen that invades the plant systemically causing important diseases. The presence of the fungus during the growing and development of the crop increases the risk of grain contamination with fumonisins. These mycotoxins are the cause of leukoencephalomalacia equine and porcine pulmonary edema, and have been classified as type 2B carcinogen for humans. It is therefore of great importance the development of *F. verticillioides* control strategies, in order to prevent the contamination of the crop. Biological control is presented as an alternative to chemical control, in order to avoid their consequent adverse effects. In previous research the biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans* were selected. Both agents were effective in reducing the pathogen and fumonisins in harvested grains. The aim of this study was to develop two formulations with these biological control agents. These formulations should be able to maintain the fungicide potential, increase the tolerance to environmental fluctuations and achieve high production efficiency and low cost. Physiological adaptation was carried out in osmotic stress conditions. This demonstrated that both bacteria synthesize the compatible solutes glycine-betaine and ectoine. This adaptation improves the performance during the formulation process and allows cells to increase tolerance to environmental stress in the rhizosphere of maize in the field. Growing medium of molasses osmotically modified with NaCl to 0.97 water activity was selected. In this medium was obtained good biomass production and high survival. Liquid and freeze-dried formulations yields were tested. Adhesive paraffin oil 2% was selected for bacterization of seeds *in vitro*. This adhesive allowed to obtain a uniform pelleting and high viability during storage. This substance did not affect germination and seedling growth. In a first field trial was conducted the seed bacterization with freeze-dried formulations and water as humectant and adhesive. Although the inoculation of seed with formulations did not produce a decrease in the incidence of *F. verticillioides* in grains, a significant reduction of fumonisin B₁ was observed. Plants treated with *M. oleovorans* formulation showed a reduction of fumonisin B₁ higher than 70%. *B.*

amyloliquefaciens formulation produced a toxin reduction higher than 50%. In order to determine the effectiveness of the treatments with the adhesive selected *in vitro*, for two consecutive years the same test was performed at field level. These treatments did not modify the incidence of pathogen and neither generated a significant reduction in the toxin content in harvested grain. Therefore was conclude that optimal bacterization of maize seeds with freeze-dried formulations, in order to generate a significant reduction in toxin content in harvested grain, must be performed with water as humectant and adhesive before planting. The biological formulations developed are compatible with conventional seed treatments, are environmentally safe, harmless, not alter the microbial activity of soil communities, leave no residue and not generate resistance. In national and international markets not exist biofungicides products with the same characteristics.

INDICE DE CONTENIDOS

• Resumen	
• Abstract	
• Introducción	
1. Maíz-----	1
1.1 Importancia del maíz para el sector agroalimentario-----	1
1.2 Características y usos del grano de maíz-----	3
1.3 Enfermedades-----	6
2. <i>Fusarium verticillioides</i> -----	8
3. Fumonisinias-----	10
4. Control a campo de <i>F. verticillioides</i> -----	14
5. Control biológico-----	17
5.1 Mercado de fitosanitarios internacional - argentino-----	19
5.2 Aplicabilidad de productos de biocontrol-----	20
5.3 Situación en Argentina-----	23
5.4 Investigaciones previas-----	25
• Hipótesis y objetivo -----	27
• Capítulo I: Adaptación fisiológica de los agentes de biocontrol -----	28
• Capítulo II: Proceso de producción del inóculo del agente de biocontrol-----	45
• Capítulo III: Incorporación del biofungicida a la semilla.	
Estudio de invernadero-----	56
• Capítulo IV: Ensayo a campo con semillas bacterizadas con formulado liofilizado y agua como adhesivo-----	70
• Capítulo V: Incidencia de <i>F. verticillioides</i> y contenido de fumonisinias en granos de maíz de plantas con inflorescencias femeninas cubiertas y no cubiertas -----	90
• Capítulo VI: Ensayo a campo con semillas bacterizadas con formulado liofilizado y aceite de parafina como adhesivo-----	99
• Conclusiones -----	110
• Anexo I -----	118
• Anexo II -----	120
• Bibliografía -----	125

INDICE DE FIGURAS

Introducción

1. Principales países exportadores de granos de maíz-----	2
2. Estructura del grano de maíz-----	4
3. Agroindustria del grano de maíz en Argentina-----	5
4. Ontogenia del grano de maíz-----	7
5. <i>F. verticillioides</i> -----	8
6. Ciclo de la enfermedad de <i>F. verticillioides</i> en el cultivo de maíz-----	9
7. Estructura química de las principales fumonisinas-----	11

Capítulo I

I.1. Viabilidad de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>M. oleovorans</i> en medios sólidos a diferentes a_w -----	34
I.2. Viabilidad de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>M. oleovorans</i> en medios líquidos a diferentes a_w -----	36
I.3. Supervivencia de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>M. oleovorans</i> luego del shock térmico--	37
I.4. Acumulación intracelular de betaína y ectoína en células de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>M. oleovorans</i> -----	39

Capítulo II

II.1. Proceso de liofilización. Rendimiento-----	51
--	----

Capítulo III

III.1. Supervivencia de los ACB <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>M. oleovorans</i> en semillas pelleteadas con formulado liofilizado-----	62
III.2. Supervivencia de los ACB <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>M. oleovorans</i> en semillas pelleteadas con formulado líquido-----	63
III.3. Semillas bacterizadas con formulados liofilizados de los ACB-----	64

Capítulo IV

IV.1. Precipitaciones acumuladas mensualmente desde el mes de diciembre del año 2009 al mes de mayo de 2010-----	79
IV.2. Recuento total por tratamientos de <i>Fusarium</i> endófito en plántulas de maíz-----	80
IV.3. Porcentaje de especies de <i>Fusarium</i> de endorrizósfera de plántulas de maíz de 20 días-----	80
IV.4. Índice S/R por tratamiento-----	81
IV.5. Incidencia de <i>F. verticillioides</i> en granos cosechados-----	82
IV.6. Efecto de los tratamientos sobre la actividad amonificante, nitrificante y celulolítica del suelo-----	84

Capítulo V

V.1. A) Fotografía de mazorcas cubierta con bolsa de papel kraft. B) Bolsa de Papel kraft sobre mazorca con termómetro incorporado-----	92
V.2. Precipitaciones acumuladas mensualmente y registro de temperatura del aire durante la campaña 2010-2011-----	93
V.3. Temperatura del aire y temperatura interior de las bolsas de papel sobre las mazorcas-----	94
V.4. Actividad acuosa de los granos de mazorcas cubiertas y no cubiertas, registrada desde la floración hasta la madurez fisiológica del cultivo-----	95
V.5. Incidencia de <i>F. verticillioides</i> en granos de maíz a cosecha-----	95
V.6. Valores promedio de FB ₁ y FB ₂ en tres bloques aleatorios-----	97

Capítulo VI

VI.1. Precipitaciones diarias desde los meses de diciembre a mayo, durante la campaña 2009-2010 y 2010-2011-----	101
VI.2. Incidencia de <i>Fusarium</i> en granos de maíz a cosecha durante la campaña 2009-2010 y 2010-2011-----	102
VI.3. Rendimiento de granos de maíz a cosecha. A) Campaña 2009-2010. B) Campaña 2010-2011-----	104

INDICE DE TABLAS

Introducción

1. Información disponible sobre procesos biológicos del ciclo de vida de *F. verticillioides*-----10
2. Reglamentación de la comisión de la Unión Europea 1126/2007-----13

Capítulo I

- I.1. Significancia del potencial osmótico, a_w , cepas bacterianas y las interacciones en base al efecto del potencial osmótico en el crecimiento bacterial en medios líquidos -----36
- I.2. Efecto de las interacciones ACB - *F. verticillioides* en la fase de latencia y la velocidad de crecimiento del patógeno-----40

Capítulo II

- II.1. Tipos de formulaciones-----46
- II.2. Parámetros de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* en función del medio de crecimiento y la actividad acuosa-----52
- II.3. Parámetros de crecimiento de *M. oleovorans* en función del medio de crecimiento y la actividad acuosa-----52
- II.4. Recuento de viables (log UFC/ml) de *B. amyloliquefaciens* antes y después del liofilizado en los medios NYDB y MSB-----53
- II.5. Recuento de viables (log UFC/ml) de *M. oleovorans* antes y después del liofilizado en los medios NYDB y MSB-----53

Capítulo III

- III.1. Sobrevivencia luego de diferentes períodos de almacenamiento en semillas de maíz pelleteadas con formulados liofilizados con diferentes adhesivos y diferente a_w -----60
- III.2. Efecto de los diferentes tratamientos con formulado liofilizado sobre el índice S/R-----65
- III.3. Efecto de los diferentes tratamientos con formulado líquido sobre el índice S/R-----65

Capítulo IV

IV.1. Diseño del ensayo a campo campaña de siembra 2009-2010-----	73
IV.2. Tabla de Mc Crady-----	77
IV.3. Efecto de los tratamientos a cosecha durante la campaña 2009/2010-----	82
IV.4. Contenido de FB ₁ -----	83
IV.5. Coeficientes de correlación de Pearson entre diferentes variables-----	84

Capítulo V

V.1. Diseño del ensayo a campo-----	92
V.2. Especies del género <i>Fusarium</i> identificadas por bloque-----	96

Capítulo VI

VI.1. Diseño del ensayo a campo campaña de siembra 2009-2010 y 2010-2011-----	100
VI.2. Especies del género <i>Fusarium</i> identificadas por bloque-----	105
VI.3. Contenido de FB ₁ . Campaña 2009-2010-----	105
VI.4. Contenido de FB ₁ . Campaña 2010-2011-----	105

INTRODUCCION

1. Maíz

1.1. Importancia del maíz para el sector agroalimentario

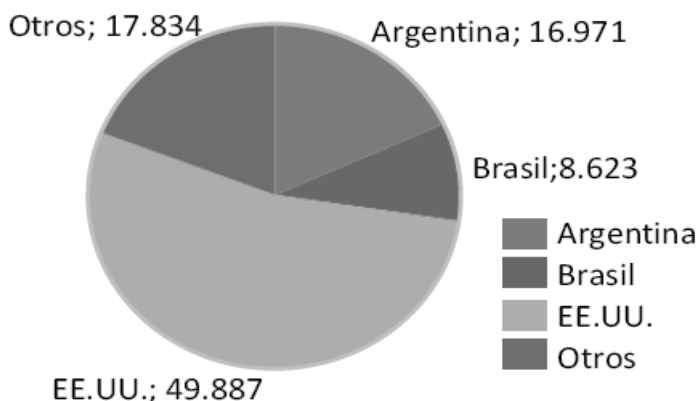
El sector agroalimentario ha jugado un papel fundamental en la economía Argentina por su tradicional aporte a la producción, empleo y exportaciones. Este sector es responsable de la generación de más del 50% de las exportaciones argentinas, lo cual le permite ser el sexto exportador mundial de alimentos. Los principales productos del sector agroindustrial exportados por la Argentina se encuentran en el complejo sojero, las tortas, el aceite y los porotos de soja representan las exportaciones de mayor valor. Si se observa la importancia de la Argentina en el mercado de cada producto, se encuentra que es el primer exportador de tortas y aceite de soja, yerba mate, jugo de uva, jugo de limón concentrado, aceite de maní y carne de caballo. Es el segundo exportador de sorgo, tortas de girasol, maíz, maní preparado, tortas de maní, aceite de cártamo, aceite de girasol, limones y limas, ajo y miel natural. Argentina es el tercer exportador de aceitunas en conserva, ciruelas secas, harina de trigo, soja y maní sin cáscara, y se destaca como exportador de alpiste, jugo de manzana concentrado, trigo, carne de conejo, frijoles secos, arroz descascarado, leche entera en polvo, aceite de oliva, cebada, tabaco bruto, pasas, lana limpia, vinos y carne de pollo, entre otros (ONCCA, 2011).

En Argentina el maíz (*Zea mays L.*), junto con la soja y el trigo, representan la base de la producción granífera nacional. Se encuentra entre los tres cultivos para grano más importantes en términos de rendimiento mundial, siguiendo al trigo y antecediendo al arroz (INTA, 2009). La producción mundial de maíz creció significativamente debido en parte al aumento de las tierras cultivadas con este cereal, y sobre todo, gracias a las mejoras genéticas, a la aplicación de técnicas más eficientes de cultivo y a la utilización de fertilizantes, así como al empleo de variedades nuevas con mayor capacidad de reproducción. Los países en desarrollo dedican más tierras al cultivo de maíz que los países desarrollados, pero estos obtienen un rendimiento aproximadamente cuatro veces mayor (FAO, 1993).

En la campaña 2009/2010 en Argentina se sembraron 1.800.000 ha y se obtuvo una producción de 21,5 millones de toneladas (MMt) (USDA, 2012), de las cuales 16,9 fueron exportadas. Los principales compradores fueron Irán, Colombia, Argelia, Malasia y Egipto (SENASA, 2010). El primer exportador fue Estados Unidos, que

exportó 49.8 MMt de las más de 334 que produjo en la campaña record de 2010. Argentina exportó 342 Kg del los 511 Kg/habitante/año producidos (67%) y Estados Unidos sólo 160 Kg de los 998 Kg/habitante/año (16%) (Fig. 1).

Países exportadores de granos de maíz (2009/2010) en miles de toneladas



Fuente: INTA Precop II, con datos del USDA

Fig. 1. Principales países exportadores de granos de maíz.

En la campaña 2010/2011 la producción mundial de maíz fue de 829,1 MMt de las cuales 23,6 fueron producidas por Argentina y 16,3 MMt exportadas (USDA, 2012). En la provincia de Córdoba, en dicha campaña, la producción fue de 8,6 MMt (sin contar forrajes y autoconsumo), dicha producción significa un 37,6% de la producción nacional, según el Ministerio de Agricultura de la Nación (BCCba, 2011). Estas cifras indican la importancia del maíz en la secuencia de cultivos en nuestro país y la necesidad de que se desarrolle con un alto nivel tecnológico (INTA, 2009).

En la campaña 2011/2012 la producción mundial creció a 870,45 MMt pero en Argentina, como consecuencia de la sequía acontecida en la zona maicera núcleo, la producción descendió a 21,5 MMt y las exportaciones a 13,5 MMt. Para la campaña 2012/2013, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, estima una producción mundial de 945,78 MMt de las cuales 25 serán producidas por nuestro país (USDA, 2012).

Desde que en el año 1996 fueron aprobados comercialmente los cultivos transgénicos en el mundo, el incremento de producción de dichos cultivos tecnológicos ha sido el mayor crecimiento en la historia de la agricultura moderna (James, 2000). De acuerdo al informe anual del servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA), la Argentina continúa siendo uno de los principales

productores de cultivos transgénicos, luego de EEUU y Brasil, con 23,7 millones de hectáreas sembradas en el año 2011, lo que representa un aumento del 3,5% con respecto al año anterior y un 14,8% del área mundial cultivada con transgénicos. El informe indica también, que en la campaña 2011/2012 se continuó registrando un aumento en la adopción de maíz genéticamente modificado (estimada en un 86% del maíz total) y algodón transgénico (casi el 99% del total), con un aumento en ambos casos de la superficie sembrada con los llamados eventos acumulados, esto es, la suma de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas (ISAAA, 2012).

1.2. Características y usos del grano de maíz

La planta del maíz es una gramínea anual de talla alta, con tallos gruesos y macizos en los que claramente se diferencian los nudos y entrenudos. Presenta vainas foliares superpuestas y floración monoica con inflorescencias masculinas y femeninas separadas en el eje caulinar. Posee raíces seminales de dos tipos, primarias o principales y adventicias, que constituyen la mayor parte del sistema radical en la planta adulta. La inflorescencia masculina presenta una panícula (vulgarmente denominada espigón o penacho) de coloración amarilla que posee una cantidad muy elevada de polen, en el orden de 20 a 25 millones de granos. La inflorescencia femenina posee menor contenido de granos de polen, alrededor de 800 o 1000, se forman en unas estructuras vegetativas que se disponen de forma lateral y crecen envueltas en hojas modificadas o brácteas; las fibras sedosas o barbas que brotan de la parte superior de la espiga son los estilos prolongados, unidos cada uno de ellos a un ovario individual (Liendo y Martín, 2004).

El grano o fruto del maíz es un cariopse. La pared del ovario o pericarpio permanece fundida con la cubierta de la semilla conformando la pared del fruto. El fruto maduro posee tres partes principales: la pared, el embrión diploide y el endosperma triploide. La parte más externa del endosperma en contacto con la pared del fruto es la capa de aleuronas. La estructura del endosperma de maíz es muy variable y le confiere al grano diferentes características. Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La pared del fruto está compuesta por fibra cruda, 87% aproximadamente, y subcomponentes mayoritarios como hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%). El endosperma, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%) y bajo de proteínas y grasas. Aporta, además, la mayor parte del nitrógeno que contiene el maíz. El germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas (33%) y un nivel elevado de proteínas y minerales (20%). Finalmente,

la capa de aleuronas posee un contenido relativamente elevado de proteínas (19%) y fibra cruda (González Alquinzones, 1995).

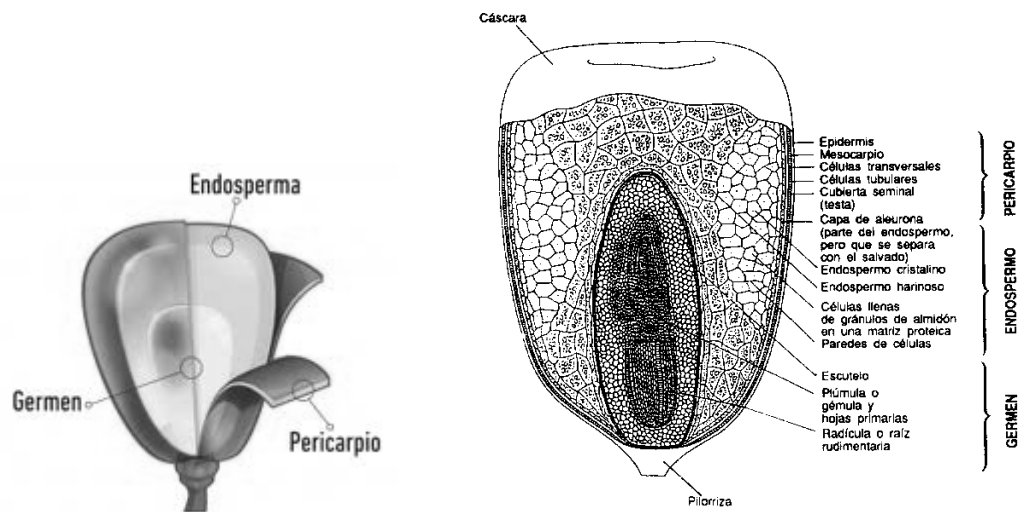


Fig. 2. Estructura del grano de maíz

El maíz es un cultivo en expansión en zonas templadas donde se utiliza no sólo para la producción de grano y derivados, sino también como cultivo forrajero para ensilado. En los países desarrollados más del 60% de la producción se emplea para elaborar piensos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes; de la misma manera en países en desarrollo, en los que el maíz es un alimento fundamental para la población humana, también se utiliza un alto porcentaje de la producción como ingrediente para la fabricación de piensos. En Argentina, del volumen total para el consumo interno, más del 80% se destina a la alimentación animal bajo las formas de balanceado, silaje de maíz, derivados de la molienda húmeda, molienda seca o directamente grano entero, partido y/o molido (MAIZAR, 2004). El mercado interno cubre la alimentación animal y la industrialización o transformación primaria del maíz. Dentro del primero se incluye la elaboración de alimentos balanceados y el consumo en chacra. La industria abarca molienda seca (producción de harinas y sémolas) y la molienda húmeda (germen, productos de almidón, gluten meal, gluten feed, glucosa y fructosa). La cadena de maíz argentino se encuentra en un proceso de cambio debido a que el consumo interno viene creciendo en forma acelerada. Los sectores avícola, lechero, porcino y ganadero así como las industrias de la molienda demandan cantidades importantes de maíz. En los últimos años la producción de biocombustibles (etanol) ha generado un incremento del consumo interno obteniendo un importante producto con valor agregado. Otros usos comprenden la fabricación de fibras de nailon, compuestos de fenol, formaldehídos y

plásticos biodegradables a partir del almidón y desechos de mazorcas, raíces y tallos (Patzek, 2004; ILSI, 2006).

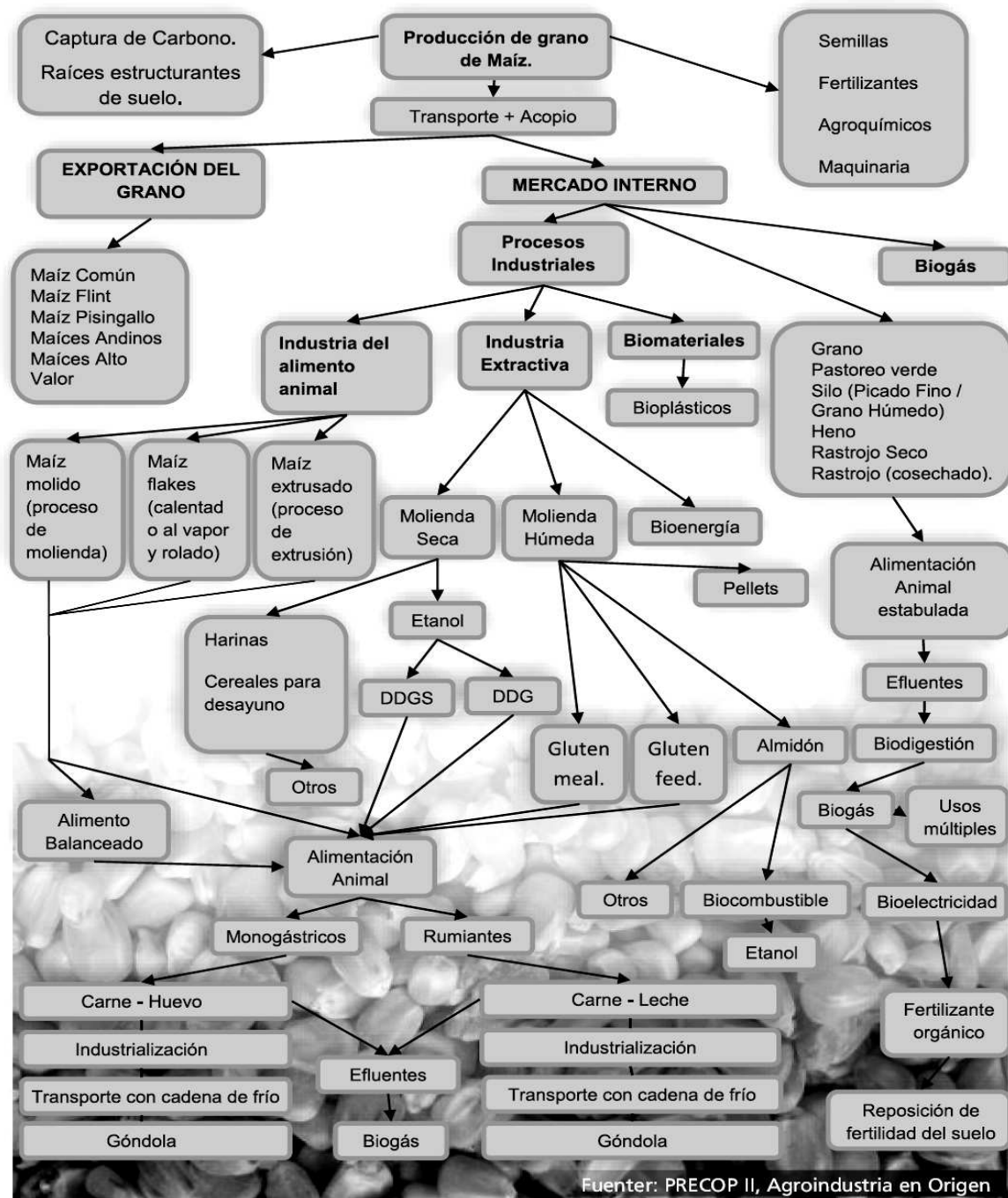


Fig. 3. Agroindustria del grano de maíz en Argentina.

Los avances tecnológicos en ingeniería química e industrial amplían en forma permanente el número y diversidad de los productos derivados del procesamiento industrial del maíz (fig. 3), con lo cual la transformación e industrialización que el productor argentino pueda darle a sus granos en forma asociativa en origen y la exportación de productos con valor agregado, le permitiría percibir una mayor renta y, a

nivel nacional, aumentar la obtención de divisas multiplicándolos varias veces, como también generar una gran cantidad de puestos de trabajo adicionales, y así dejar de exportar commodities para que otros países los utilicen (exportación de oportunidades) (INTA Precop II, 2011)

En el mercado de las especialidades argentino, a diferencia de lo que ocurre con los commodities, estos se realizan bajo contrato de producción, en donde el productor recibe un premio/rebajas por calidad. Se trata de productos diferenciados que son producidos bajo condiciones específicas. Dentro del maíz los mercados de especialidades más importantes son maíces colorados flint no OMG (organismos genéticamente modificados), el pisingallo (pop corn) y el maíz Mav (maíz alto valor) que presenta un 100% más de aceite y 20% más de proteína que un maíz común por lo cual es demandado por los productores de pavos, pollos y cerdos. Estos maíces representan el 10% del área sembrada en Argentina.

La industria de la molienda seca tiene una marcada preferencia en demandar maíces flint ya que la dureza del grano es el factor más importante a tener en cuenta al momento de seleccionar el material. Se destinan a la elaboración de copos, sémolas y harinas para consumo humano. Otro destino de estos materiales es el mercado de no OMG que se exporta a la UE.

Considerando el destino global de la cadena de comercialización del maíz, es directa la relación que se puede establecer al considerar la calidad del producto y las pérdidas económicas a producir, si no se protege adecuadamente el cultivo.

1.3. Enfermedades

La eficiencia de utilización del maíz en la alimentación está estrechamente vinculada a la calidad sanitaria de los granos cosechados. En nuestro país, muchos patógenos microbianos son endémicos de la zona maicera núcleo (norte de Buenos Aires, sur de Santa Fe y sur de Córdoba) y se presentan cada año con diferente grado de severidad, dependiendo en gran medida de las condiciones ambientales y la forma de manejo del cultivo (González y col., 2004).

Los patógenos de origen fúngico causan enfermedades en granos y espiga, provocando grandes pérdidas en los rendimientos a escala mundial (Mc Gee, 1998; White, 1999). La aparición de enfermedades en la espiga se ve favorecida, además, por el daño de insectos, pájaros y chalas abiertas (White, 1999). Entre las enfermedades que se presentan con más regularidad, se puede citar, en especial, la causada por hongos del

género *Fusarium*, los cuales atacan tanto la base del tallo como también la espiga. Entre las especies de *Fusarium* que atacan la espiga de maíz se encuentra *F. verticillioides*, un fitopatógeno capaz de producir importantes enfermedades descritas en agricultura como podredumbre de raíz y podredumbre basal de tallo y mazorca, la cual se inicia en condiciones ambientales favorables con la formación de micelios blancos, que van descendiendo desde la punta de la mazorca y dan una coloración rojiza a rosada a los granos infectados (Bacon y Hinton, 1996).

En el ciclo del cultivo del maíz, la escala fenológica comúnmente empleada es la de Ritchie y Hanway (1982) que basada en las fases ontogénicas, permite distinguir dos grandes fases: vegetativa y reproductiva. Las subdivisiones dentro de la fase vegetativa (V) corresponden al número de hojas totalmente expandidas. El índice VE se utiliza para identificar la emergencia del cultivo. Una vez producida la aparición de todas las hojas, el estado es definido por la aparición de la panoja (VT: panojamiento), mientras que las subdivisiones dentro de la fase reproductiva (R) comienza con la emergencia de los estigmas (R1), continúa con el cuaje (R2) o estado de ampolla) y el llenado de los granos (R3= grano lechoso, R4= grano pastoso y R5= grano duro o indentado) y finaliza con la madurez fisiológica (R6).

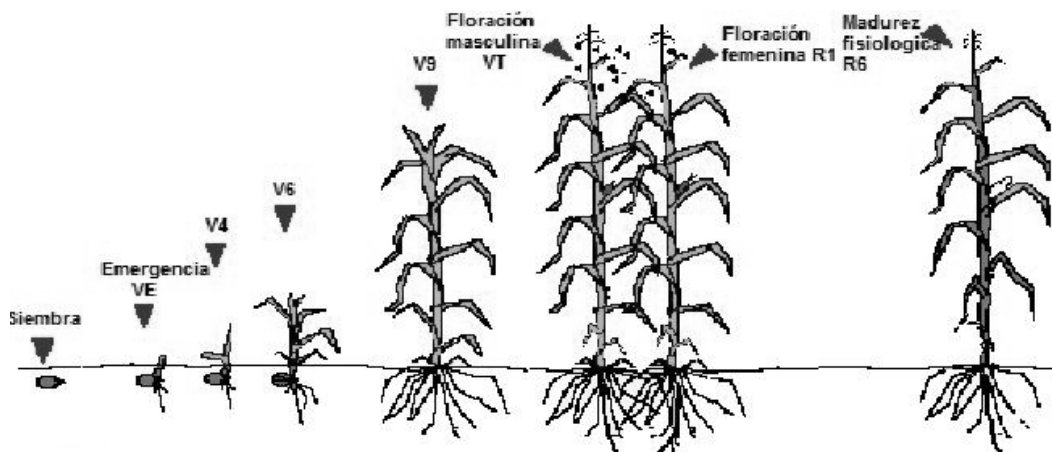


Fig. 4. Ontogenia del maíz (Cárcova y col., 2004)

Los requerimientos hídricos del maíz durante su ciclo son de alrededor de 550 - 575 mm, con consumos diarios durante el periodo de mayor exigencia de 5 - 6 mm y con una eficiencia en el uso del agua de 40 kg de materia seca aérea y de 18 a 27 kg de grano por milímetro de agua consumida (Pedrol y col., 2008). En la fase del crecimiento vegetativo se requiere más cantidad de agua, el período crítico es la fase de floración dado que de ella va a depender el cuajado y la cantidad de producción obtenida. Por

último, para el engrosamiento y maduración de la mazorca se requiere de poca humedad (SAGyP, 2001).

Entre *F. verticillioides* y la planta de maíz existe una relación endofítica (Bacon y Hinton, 1996), este fitopatógeno frecuentemente invade de forma sistémica a la planta durante todas las etapas del desarrollo, mediante la colonización de semillas y puede sobrevivir en el pedicelo, endosperma o embrión de la semilla, afectando el desarrollo después de la germinación. Algunas cepas de *F. verticillioides* producen infecciones asintomáticas de la semilla, la cual se transmite a la plántula afectando su emergencia (Yates y col., 1997). En las infecciones asintomáticas las hifas colonizan los espacios intercelulares, a diferencia de las infecciones sintomáticas que se encuentran tanto en los espacios inter como intracelulares (Yates y Jaworshi, 2000; Oren y col., 2003).

F. verticillioides induce enfermedades de pre y postcosecha que causan reducción de rendimientos y afectan la calidad de la semilla (Schulthess y col., 2002). En Argentina diversos estudios han determinado que *F. verticillioides* es el patógeno de mayor incidencia en maíz fresco (Sydenham y col., 1993; Chulze y col., 1996) y a cosecha (Martinez y col., 2010), al igual que la podredumbre que produce en la espiga, afecta seriamente el rendimiento del cultivo (Presello y col., 2006).

2. *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides (Saccardo) Nirenberg (teleomorfo: *Gibberella moniliformis* Wineland; sinónimo: *F. moniliforme*) es una especie perteneciente a la Sección *Liseola*. Su estado sexual es *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw.

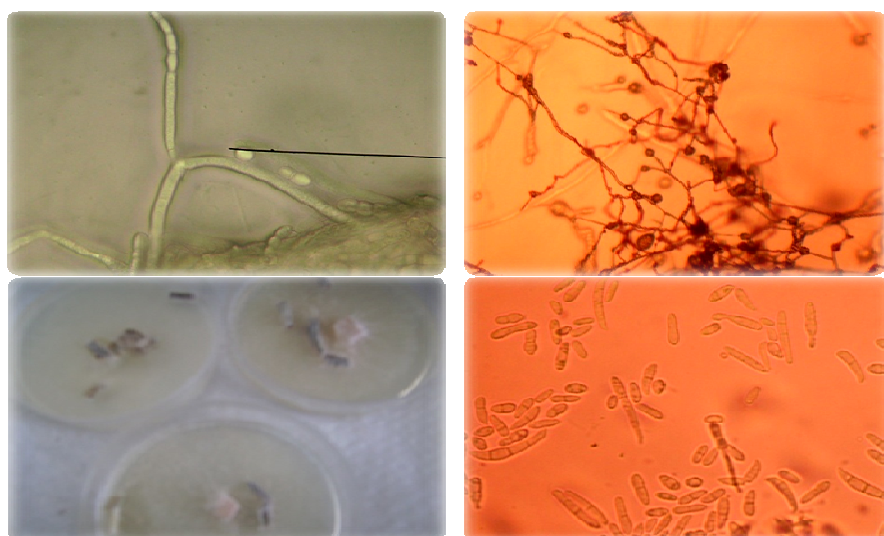


Fig. 5. *Fusarium verticillioides*. A) Monofialide. B) Cadenas largas.

C) Colonias en agar hojas de clavel. D) Microconidios ovalados y macroconidios con tres septos.

F. verticillioides se caracteriza por presentar abundantes microconidios dispuestos en el micelio aéreo en forma de largas cadenas y falsas cabezas. Generalmente tienen forma oval, con base aplanada y no poseen septos. Las células conidiógenas son monofiálides, habitualmente delgadas y largas. Los macroconidios se forman en esporodoquios de color naranja pálido en medio agar hojas de clavel (AHC), pueden resultar escasos o ausentes en algunas cepas, son alargados de paredes casi paralelas, suelen presentar de 3 a 5 septos y poseen una célula pie basal. No se encuentran clamidosporas, aunque ciertos engrosamientos hifales pueden ser confundidos con estas estructuras de resistencia. Macroscópicamente la colonia en AHC presenta un aspecto liso y algodonoso de color crema o rosa púrpura. Generalmente el reverso no es coloreado o es de color crema pálido (Nelson y col., 1983; Leslie y Summerell, 2006).

F. verticillioides puede invadir los granos de maíz por tres vías: i) crecimiento sistémico en raíz, tallo y hojas, a través de la transmisión vertical de semillas, ii) infección de las mazorcas a través de la transmisión aérea o splash de lluvia de microconidios o macroconidios provenientes de residuos de cosechas, iii) contaminación de los granos por insectos vectores (fig. 6).

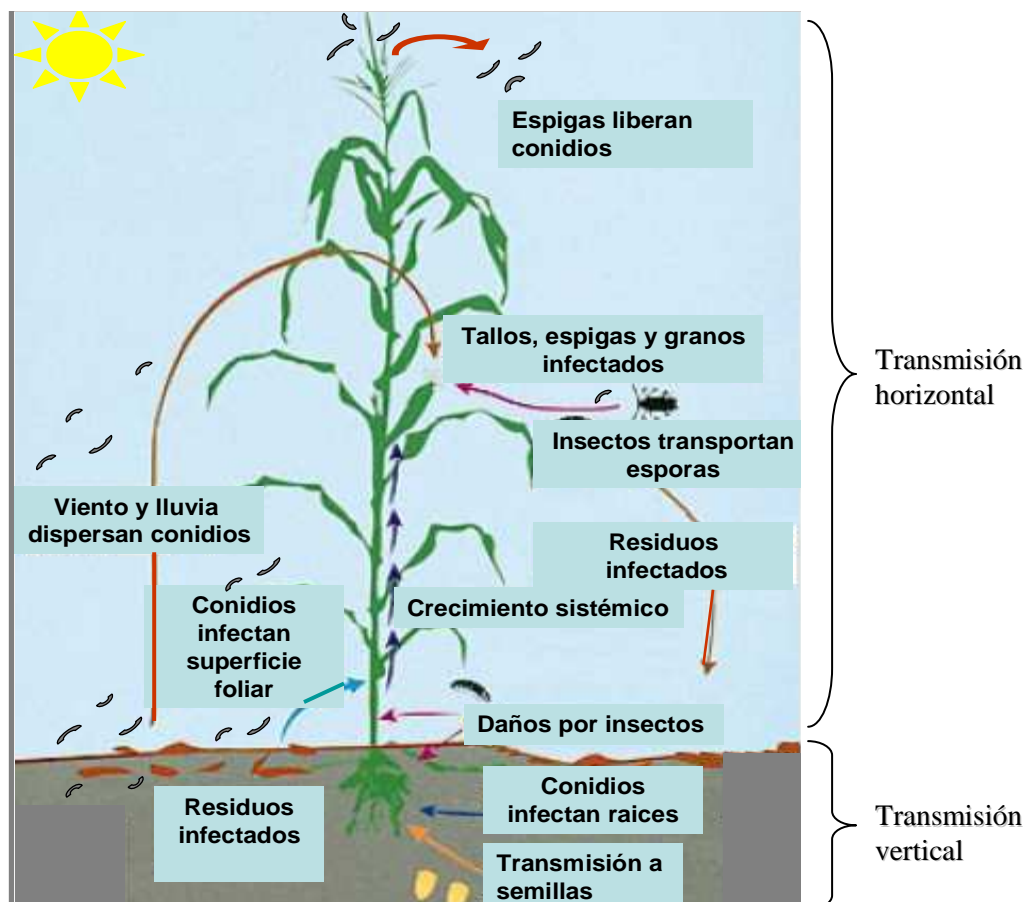


Fig. 6. Ciclo de la enfermedad de *F. verticillioides* en el cultivo de maíz (Munkvold y Desjardins, 1997; Battilani y col., 2003)

El inóculo puede dispersarse por viento, lluvia e insectos a distancias de 300 – 400 Km (Ooka y Kommedhal, 1977; Cotten y Munkvold, 1998; Miller, 2001).

El ciclo de vida del hongo es influenciado por diversos factores medio ambientales (Munkvold, 2003). Se conoce que los sucesivos procesos de germinación, crecimiento y síntesis de toxinas son controlados por la humedad relativa del aire, la temperatura y la actividad acuosa (a_w) del sustrato (Armolick y Dickson, 1956; Munkvold y Desjardins, 1997). Los parámetros mínimos, óptimos y máximos que controlan los principales procesos biológicos han sido determinados y ordenados en la Tabla 1 (Maiorano y col., 2009).

Tabla 1. Información disponible sobre los procesos biológicos del ciclo de vida de *F. verticillioides*.

Proceso Biológico	Temperatura (°C)	a_w	Lluvia	Viento	HR aire (%)	Referencia
Esporulación	+	min.: 0,85 Opt: 1	-	-	-	Cahagnier y col., 1995
Dispersión	-	-	+	+	-	Ooka y Jommedhal, 1977, Fitt y col., 1989. Fernando y col., 2000.
Germinación	Min: 5 Opt: 25 Max: 37	Min: 0,88 Opt~ 1	-	-	Min >87 Opt: 100	Armolick y Dickson, 1956. Marin y col., 1996 Torres y col., 2003
Crecimiento	Min: 4 Opt: 25 Max: 37	Min: 0,88 Opt~1	-	-	-	Marin y col., 1995, 1999b. Etcheverry y col., 2002 Samapundo y col., 2005
Síntesis de Fumonisinas	Min: 10 Opt: 25-30 Max:37	Min: 0,93 Opt~1	-	-	-	Liddel y Burguess, 1985. Lebars y col., 1994 Marin y col., 1999 a, b Etcheverry y col., 2002 Samapundo y col., 2005

Min: mínimo; Max: máximo; opt: óptimo; "+" el parámetro influye el proceso biológico; "-": el parámetro no influye el proceso biológico.

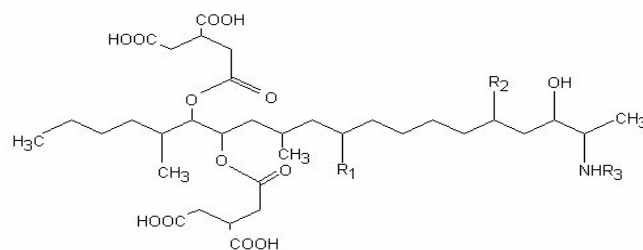
La presencia de este hongo en la espiga de maíz y sus granos aumenta el riesgo de contaminación con micotoxinas en los alimentos derivados. El nivel de micotoxinas en el grano depende en gran medida de la severidad de la podredumbre de la espiga (Reid y col., 1996; Desjardins y col., 1998).

3. Fumonisinas

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas que fueron caracterizadas en el año 1988, y que han demostrado estar presentes en maíz y sus derivados (Sanchis y col., 2000). Las fumonisinas presentan una elevada toxicidad para el hombre y animales, la cual comprende desde efectos carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos, hasta la

producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor (Sanchis y col., 2000). Los principales síndromes que producen las fumonisinas son: neurotóxicos, nefrotóxicos, edema pulmonar y cerebral, hepatotóxicos y lesiones cardíacas. Los órganos afectados son cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón. Las fumonisinas están relacionadas con enfermedades en los animales tales como la leucoencefalomalacia equina (LEM), el edema pulmonar porcino, y el cáncer esofágico en humanos (Marasas y col., 2000).

Estas micotoxinas inhiben la biosíntesis de los esfingolípidos e interfieren en el metabolismo de la esfingosina y esfinganina, lo cual perturba el metabolismo de los esfingolípidos, éstos son constituyentes del hígado y de las lipoproteínas (Marasas y col., 1995; Merrill y col., 2001; Lino y col., 2004). Los esfingolípidos tienen gran importancia en la regulación de las células y en el control de proteínas a nivel de membrana celular, visto que están presentes en ésta, ellos son los mediadores del crecimiento celular y la diferenciación y muerte de las células. En los mamíferos, la concentración de esfingosina es, por lo general, de 3 a 5 veces más elevada que la de esfinganina. Las fumonisinas al alterar la concentración y proporción entre esfinganina y esfingosina, en células eucarióticas, bloquean la biosíntesis de esfingolípidos complejos, base de formación de mensajeros secundarios, capaces de controlar diferentes procesos entre células, tales como activación y desactivación de proteínas específicas y la expresión genética (Lino y col., 2004). En cerdos, la inhibición parcial o total de esfingosina y de la enzima N-aciltransferasa, es la causa de problemas hepatotóxicos, y ese aumento en la concentración de esfinganina y/o esfingosina, aumenta la relación esfinganina / esfingosina. Dicha relación se utiliza como biomarcador de intoxicación por fumonisinas (Mallman y Dilkin, 2007).



Fumonisina	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₃ CO
A2	H	OH	CH ₃ CO

Fig. 7: Estructura química de las principales fumonisinas (Munkvold y Desjardins, 1997)

Se encuentran identificadas más de treinta análogos de fumonisinas, siendo las principales FB₁, FB₂, FB₃ y FB₄ (Rheeder y col., 2002).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), evaluó las toxinas producidas por *F. verticillioides*, indicando que la FB₁ es un carcinógeno tipo clase 2B (IARC, 2002; Fandohan y col., 2003). La fumonisina B₁ tiene la fórmula empírica C₃₄H₅₉NO₁₅ y es el diéster del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y el 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15 pentahidroieicosano (masa molecular relativa: 721). Las fumonisinas son solubles en agua, acetonitrilo-agua o metanol, estables en acetonitrilo-agua (1:1) e inestables en metanol (Marasas y col., 2000).

La Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas vinculada con la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO) estimó que en todo el mundo, cerca del 25 % de los alimentos están contaminados con micotoxinas (Lawlor y Lynch, 2001). En el año 2000, la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de su Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS), analizó miles de muestras de materias primas destinadas a alimentación humana y animal en más de 40 países en cinco continentes, y determinó una contaminación con fumonisina B₁ en más del 50% de las muestras analizadas (Marasas y col., 2000). Se han detectado fumonisinas en maíz en todo el mundo en concentraciones de varios mg/kg en alimentos para consumo humano a base maíz, como sémola, harina, polenta, cereales para desayuno, tortitas de maíz, cerveza, palomitas, etc (Shephard y col., 1996; GLM, 2007). Como resultado de la elaboración en seco del maíz, las fumonisinas se distribuyen en el salvado, el germen y en la harina. En la molienda húmeda (producción de almidón), se detectó fumonisina en el agua de remojo, el salvado y el germen, pero no en el almidón. Las fumonisinas son estables en el maíz y la polenta, resisten los métodos de elaboración de alimentos, pero se destruyen en soluciones alcalinas fuertes, tal como en el proceso de nixtamalización (EMAN, 2007).

En Argentina la contaminación del maíz con fumonisinas es un problema preocupante, dado que se ha detectado una alta frecuencia de muestras positivas con niveles de hasta 10.000 ppb en años conductivos. Un tipo de alimento consumido por niños, el hojaldre de maíz (producto de extrusión) conocido como chizitos, reveló altos niveles de fumonisinas, con un nivel máximo de 1.649 ppb y una media de 257 ppb (Federico y col., 2010).

Las fumonisinas están distribuidas a lo largo de la cadena alimentaria, por ello el comité científico de la alimentación humana estableció una ingesta diaria tolerable (IDT) de

2000 ppb peso corporal/día, para la suma de las fumonisinas B₁, B₂ y B₃, y reglamentó un contenido máximo de fumonisinas de 4000 ppb en maíz no elaborado y 1000 ppb en maíz y alimentos de consumo directo, como muestra la Tabla 2 (CE, 2003; 2007a).

Tabla 2. Reglamentación de La Comisión de la Unión Europea 1126/2007. Contenido máximo (ppb).

Producto	Fumonisinas B ₁ + B ₂ (ppb)
Maíz no elaborado	4000
Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo	1000
Cereales para el desayuno a base de maíz	800
Alimentos elaborados a base de maíz para lactantes y niños	200
Fracciones de molienda de maíz > 500 micras no destinadas al consumo humano directo	1400
Fracciones de molienda de maíz < 500 micras no destinadas al consumo humano directo	2000

Asimismo la administración de alimentos y medicamentos de USA (FDA), ha anunciado los niveles aconsejables de fumonisinas totales en productos a base de maíz, 2000-4000 ppb en alimentos para humanos y 5000-10000 ppb en alimentos para animales dependiendo de la especie y proporción de material contaminado en la dieta (FDA, 2001).

Diversos estudios estadísticos revelaron que los valores medios de ingesta de FB₁ a nivel internacional fueron en Europa 200 ppb; América Latina 1000 ppb; África 2400 ppb; Oriente Medio 1100 ppb; Extremo Oriente 700 ppb; Canadá 20 ppb y USA 80 ppb. En el Reino Unido (UK) y Suiza la ingesta media fue de 30 ppb y en Holanda fue de 60 y 1000 ppb, para el total de la población y para los consumidores regulares de maíz, respectivamente, a pesar de que hubo ingestas que llegaron a los 7100 ppb. En Argentina fue de 200 ppb y en África del Sur se estableció un rango de ingesta entre 1400 y 440000 ppb (CE, 2000; JECFA, 2001; WHO, 2002; Gimeno y Martins, 2006).

La biosíntesis de fumonisinas esta íntimamente relacionada a las condiciones ambientales tales como el sustrato, pH, a_w o temperatura (Hope y col., 2005). Muchos estudios indican que la interrelación con el estrés acuoso esta asociado a un elevado nivel de infección de *F. verticillioides* y una consecuente acumulación de metabolitos secundarios en granos (Miller, 2001), dado que se produce un impacto significativo de la actividad acuosa en los niveles de transcripción del gen *FUM1*. Según Munkvold (2003), periodos secos antes y durante el llenado de granos favorecen una mayor

severidad de enfermedad y una mayor acumulación de fumonisinas. Se ha determinado que la expresión génica de *FUM1* disminuye o se mantiene en bajo nivel, frente a las a_w 0,99 y 0,98; coincidiendo con una mayor tasa de crecimiento, mientras que a mayor valor y tiempo de exposición de estrés hídrico (a_w 0,95 y 0,93) aumenta la expresión del gen *FUM1*, por lo cual existe un cierto nivel de independencia entre la tasa de crecimiento y la expresión de *FUM1*, indicando que la biomasa del hongo no sería un indicador confiable de la contaminación con fumonisinas (Jurado y col., 2008). Dado que el estrés hídrico aumenta progresivamente durante la maduración del cultivo en condiciones naturales, podría ser un factor crítico que favorezca la acumulación de fumonisinas por *F. verticillioides*. Asimismo las condiciones ambientales pueden afectar la duración del período de estrés hídrico, lo que también influye en la acumulación total de fumonisinas (Jurado y col., 2008).

Dada la toxicidad de las fumonisinas, como también el hecho que las especies del género *Fusarium* infectan el grano antes de la cosecha, es importante el papel de la prevención en el campo durante el desarrollo del maíz, con prácticas agronómicas y de almacenamiento adecuadas (CE, 583/2006; Ariño Moneva y col., 2008). Además, cabe destacar que la contaminación del maíz por micotoxinas producidas por especies de *Fusarium* causa las mayores pérdidas económicas a todos los niveles de producción de alimentos destinados a consumo humano y animal, incluyendo la producción granífera, distribución, procesamiento, producción animal y la economía nacional en su conjunto (Charmley y col., 1995).

4. Control a campo de *F. verticillioides*

La capacidad endofítica de *F. verticillioides* hace que su control a campo sea muy complejo. Habitualmente se realiza el tratamiento de las semillas con compuestos como Plantpro-45, un agente químico con un componente activo basado en yodo (Yates y col., 2003), y la aplicación de compuestos activos del grupo de los bencimidazoles, recomendables para lotes de semillas con elevados porcentajes de *Fusarium*, o también, la utilización de semillas ya tratadas comercialmente con una dosis de 30 g i.a cada 100 kg con mezclas de carbendazim, tiabendazol, metalaxil-M o fluodioxonil (Carmona, 2011). Los principales fungicidas utilizados en maíz durante el año 2011 y disponibles en el mercado nacional son tebuconazole + cyproconazole (Amistar Xtra Syngenta) preventivo para roya y tizones; azoxistrobina + difenoconazole (Amistar top Syngenta) preventivo para roya negra y phoma; trifloxistrobin + tebuconazole (Nativo Twin pack

Bayer) fungicida sistémico preventivo de roya, helmintosporiosis común; fluodioxonil + metalaxil M (Maxim XL Rizobacter) fungicida terapéutico sistémico y de contacto; fluodioxonil + metalaxil M + tiabendazole + azoxistrobina (Maxim Quattro Syngenta) fungicida terapéutico sistémico. La aplicación masiva de estos fungicidas químicos sintéticos ha provocado procesos de contaminación medioambiental (suelo, agua, aire) que se traducen, entre otros efectos nocivos, en una incidencia creciente de enfermedades en la población humana global, además de una baja eficiencia en el proceso de control de patógenos de naturaleza endofítica (Kieferr y Mahurin, 1997; London y col., 2002; Wesseling y col., 2002; Calvert y col., 2004).

En nuestro país, la política gubernamental y provincial en materia de bioseguridad se basa generalmente en lineamientos propuestos por organismos internacionales tales como la FAO, la OMS, etc., los cuales, a su vez, fundamentan sus reglamentaciones en los ejemplos impartidos por los países más avanzados en la materia. Entre nuestras instituciones gubernamentales involucradas en la aprobación, la fiscalización y la investigación del impacto sanitario de agroquímicos se hallan la Coordinación General de Agroquímicos y Biológicos y la Coordinación de Fertilizantes, Plaguicidas Formulados y Contaminantes Químicos del SENASA, siendo esta última entidad la que supervisa la verificación de la idoneidad de los laboratorios inscriptos en la red oficial del SENASA, verifica la normatización de metodologías analíticas y controla los protocolos analíticos y sus resultados. Respecto del impacto sanitario actúa el Programa Nacional de Riesgos Químicos del Ministerio de Salud y su Plan Nacional de Gestión de Sustancias Químicas, con la meta de disminuir los riesgos para la salud humana asociados a la exposición a las sustancias químicas en todas las etapas de sus ciclos de vida y determinar factores de vulnerabilidad en la población expuesta a plaguicidas. Sus lineamientos de evaluación y manejo de riesgos de los plaguicidas en uso agrario surgen de los impartidos por la OMS y la OPS. La última palabra en cuanto a la Valoración Biológica la tiene la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA (Kaczewer, 2006).

Se han propuesto diversas estrategias y alternativas al control químico, con la finalidad de disminuir la infección del maíz con el patógeno fúngico, como por ejemplo la producción de semillas en campos bajo rotación de cultivos, dado que como monocultivo (maíz sobre maíz) favorece la infección y multiplicación del hongo, además es fundamental realizar la cosecha de las semillas híbridas lo más pronto posible, con el fin de evitar contaminaciones e infecciones en espiga por retrasos

(Carmona, 2011). Se recomienda también la utilización de variedades de maíz modificadas por ingeniería genética con la capacidad de expresar sustancias antifúngicas (Munkvold y Desjardins, 1997) o con resistencia incrementada a vectores de inóculo, ejemplo maíz Bt (Gatch y col., 2002). Diversos estudios en diferentes partes del mundo, muestran bajos niveles de fumonisinas en híbridos Bt (Munkvold y col., 1999; Pietri y Piva, 2000; Papst y col., 2005). En estudios realizados por Folcher y col. (2010) en el suroeste de Francia, al comparar los niveles de fumonisinas en maíz Bt y maíz no-Bt, demostraron una disminución del 90% de fumonisinas en el maíz Bt, y de acuerdo a las regulaciones de la Comunidad Europea (CE, 2007), el 93% de los granos Bt eran aptos para la comercialización y consumo, mientras que del maíz no-Bt solo el 45 % cumplía con las regulaciones. En Argentina, Barros y col. (2005) analizaron 1.700 muestras de maíz Bt, de diferentes zonas agro-climáticas, recolectadas durante los años 1999-2005, determinando una media de fumonisinas totales de 1.712 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La contaminación en las diferentes zonas varía año a año, con valores medios que oscilan entre los 343 y 4.814 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Pacin y col., 2007). En general, estos valores están por debajo de los límites de la Unión Europea (CE, 2007).

En nuestro país, hasta la fecha, están aprobados 22 eventos agronómicos genéticamente modificados, de los cuales 16 son variedades transgénicas de maíz, tres de las cuales fueron autorizadas en el año 2011. De acuerdo con el Servicio Internacional para Adquisición de Aplicaciones Biotecnológicas Agrícolas (ISAAA, 2012), Argentina es el tercer país que más transgénicos cultiva en el mundo, con 22,9 millones de hectáreas cultivadas en 2010, detrás de Estados Unidos (66,8 millones de hectáreas) y Brasil (25,4 millones de hectáreas). Cabe destacar que los cinco principales países en desarrollo que están produciendo cultivos transgénicos (Brasil, Argentina, India, China y Paraguay) sembraron 63 millones de hectáreas en 2010, el equivalente al 43% del total global. En suma, 19 de los 29 países que han adoptado los cultivos transgénicos son naciones en desarrollo, que crecieron a una tasa del 17% o 10,2 millones de hectáreas más que en 2009, en comparación con una tasa de crecimiento de sólo el 5% o 3,8 millones de hectáreas en los países industrializados. Justamente estos valores coinciden con países europeos en los que se ha prohibido el cultivo de maíz transgénico MON810 (Francia, Alemania, Austria, Hungría, Grecia, Luxemburgo y Bulgaria). Cabe destacar además, que en dichos países, donde el maíz no es genéticamente modificado, existen serios problemas con los niveles de toxinas en granos, con lo cual el control de *F. verticillioides* debe realizarse principalmente con agroquímicos.

5. Control biológico

Debido al interés generado en áreas de salud y protección medioambiental en relación al uso de pesticidas sintéticos en la agricultura, se ha planteado la necesidad de implementar estrategias alternativas para lograr la protección vegetal. El control biológico definido como el “uso de organismos vivos para disminuir o suprimir la densidad poblacional o el impacto de un determinado organismo peste, haciéndolo menos abundante o dañino” (Eilenberg y col., 2001), constituye un método alternativo viable para lograr el control de fitopatógenos (Cook, 1993), evitando así el uso de plaguicidas químicos y sus efectos adversos tales como contaminación de cursos de agua, el ingreso a la cadena alimenticia, la estimulación del desarrollo de resistencia, el deterioro de la salud humana y animal (Butt, 2000).

En el control biológico los microorganismos utilizados para el control de enfermedades, con capacidad de inhibir el crecimiento, la infección o reproducción de otro microorganismo patógeno (Cook, 1993; Baker, 1987), son denominados antagonistas naturales o biocontroladores. Dichos antagonistas desarrollan un rol importante en la regulación de las poblaciones vegetales en sus ambientes nativos. Con el término antagonista natural se incluye a parásitos, patógenos, depredadores y/o competidores que causan mortalidad o daño en una población peste específica. La ausencia de tales antagonistas suele ser la principal causa de invasiones de especies no nativas (Crawley, 1997).

Existen numerosas estrategias de control biológico dirigidas a reducir patógenos resistentes y nemátodos parásitos de las plantas (Alabouvette y col., 1985; Cook, 1993; Kerry, 1990; Kloepper y col., 1992; Nelson y col., 1994; Sikora, 1992). En el ecosistema suelo ocurren numerosas interrelaciones entre la comunidad microbiana, la planta huésped, los patógenos microbianos y nemátodos. Los suelos con alto contenido de materia orgánica se caracterizan por ser supresivos al desarrollo y la actividad de diversos patógenos y nemátodos (Baker y Dunn, 1990), dicha supresividad se fundamenta en la existencia de un amplio espectro de microorganismos que forman parte de un sistema complejo de interacciones que conforman la rizósfera dónde la competencia por las fuentes alimenticias y nichos entre predador – presa, ayudan a limitar la población de microorganismos con potencial de plaga (Baker y Paulitz, 1996). Asimismo la rizósfera provee un complejo y dinámico microambiente, donde bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas con un considerable potencial para la detoxificación de compuestos orgánicos nocivos. También la

comunidad específica presente en la rizósfera agrupa microorganismos que promueven la sanidad en un cultivo, con lo cual las interrelaciones entre los tejidos de la raíz y la comunidad microbiana del suelo, es significativamente más intensiva que en la parte superior de la planta. La introducción de antagonistas, en el complejo medio ambiente de la rizósfera, está fuertemente influenciada por factores bióticos y abióticos que dificultan la introducción, el efectivo establecimiento y el control a largo plazo, como también impiden determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta o heridas (Vilich y Sikora, 1998). En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas como antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo, lisis enzimática), interacciones indirectas e inducción de resistencia (Cook y Baker, 1983).

Los agentes nativos de la rizósfera pueden ser empleados como agentes de control biológico (ACB) debido a su capacidad de colonizar las raíces de las plantas y permanecer en el nicho ecológico. Estos agentes han sido empleados en enfermedades producidas por hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Botrytis* entre otros (Emmert y Handelsman, 1999; Cavaglieri y col., 2004; Compant y col., 2005). En cultivos como el maíz, el tratamiento de las semillas con ACB, se ha considerado como el método más adecuado para el control de los patógenos a nivel de la espermosfera o de la rizósfera (Harman, 1992; Hebbar y col., 1992; Lewis, 1991).

Consumidores internacionales más exigentes respecto de la calidad y la sanidad de sus alimentos están direccionando al mercado explorador de granos cada vez más “ecológicos”, promoviendo a la utilización de fertilizantes, fungicidas, herbicidas y promotores de crecimiento en su variable biológica, como bioinsecticidas, biofungicidas y bioherbicidas, en reemplazo de su versión química. Los biofungicidas son un tipo de biopesticidas utilizados para frenar y controlar hongos patógenos de plantas mediante la introducción / inoculación de células microbianas en la planta. También incluye la ingeniería de genes en el genoma vegetal, resultando en la producción de compuestos que conducen al control de hongos patógenos o la generación de una respuesta de hipersensibilidad a través de genes de resistencia o manipulación de genes implicados en la resistencia sistémica adquirida (Kalia y Mudhar, 2011). Lahdenpera (2003)

informó sobre la utilización de *Streptomyces griseoviridis* K61, un formulado en polvo a base de esporas secas y micelios de actinomicetes del suelo (nombre comercial Mycostop), como un potente biofungicida con capacidad de detener el damping off del coliflor causada por *Alternaria*. Con lo cual las estrategias de manejo agroecológico, no sólo ayudan a un reciclaje óptimo de nutrientes y materia orgánica, flujos cerrados de energía, conservación de agua y suelo, sino que también ayudan en el equilibrio de las poblaciones de enemigos naturales de plagas (Vandermeer, 1995).

5.1. Mercado de fitosanitarios internacional - argentino

La industria de fitosanitarios está en proceso de reconversión, tratando de fomentar el uso de productos de baja toxicidad y mínimo impacto ambiental. En este marco hay compañías que han comenzado a comercializar plaguicidas orgánicos o de origen natural. Entre ellas se pueden citar Bayer, Syngenta, Dow Agrosciences, Agro Connexión, Basf. El concepto de manejo integrado desde el punto de vista de este sector es “hacer uso de todos los medios disponibles para producir más y mejor”. Bayer Crop Science lanzó al mercado un fungicida amigable con el medio ambiente y lo recomienda para combatir oídio y *Botrytis*, también poseen 3 nuevos insecticidas y un acaricida. Por su parte Syngenta, busca hoy un equilibrio entre minimizar al máximo el uso de productos fitosanitarios y usar aquellos productos que afecten menos al medio ambiente. Syngenta ha desarrollado productos más inocuos para el medio ambiente y la salud humana. Entre varios productos insecticidas, también comercializan tres marcas con base en un fungicida de origen natural denominado azoxystrobin: Quadris que combate el oídio en vides; Priori para el control de enfermedades foliares en cereales (trigo) y Amistar que se usa en hortalizas para el control de *Alternaria*. También tienen a Switch que se utiliza en flor y precosecha para el control de *Botrytis*. Dow AgroSciences adquirió a la empresa Rhom & Haas y adquirió diversos productos entre ellos la mayoría insecticidas, pero reconocen que poseen una limitada producción de fitosanitarios orgánicos. Agro Connexión fue creada con la inquietud de ofrecer una línea de productos fitosanitarios más ecológica, entre ellos Phyton, un fungicida bactericida compuesto de sulfato de cobre, de amplio espectro, que controla la mayoría de los problemas que hay en frutales y también se puede usar en cultivos orgánicos. En el caso de uvas también está recomendado su uso para el control de la podredumbre ácida y *Botrytis*. Asimismo se puede usar en otros frutales y en ocho cultivos extensivos como arroz y maíz. También comercializan un insecticida de origen botánico, un

extracto del árbol de la India que tiene la cualidad de controlar insectos, el producto es el NET-X. La compañía BASF lanzó al mercado el nematicida QL Agri 35 que tiene la característica de ser un excelente nematicida de muy baja toxicidad y que a nivel mundial está registrado como aditivo alimentario. Poseen un insecticida de feromonas de confusión sexual RAK para el control de la polilla de la manzana y del carozo. También comercializan un fungicida de la familia de las estrobilinas, que manteniendo todas las características de la molécula inicial- de baja toxicidad y alta eficiencia- es estable y puede ser usado en el medio agrícola. Basf lo recomienda para vides y pomáceas, para el control de hongos oídio, *Botrytis* y *Venturia*. Dada su alta eficiencia, se requieren muy bajas dosis por hectárea (100 gramos de ingrediente activo por hectárea).

En el mercado nacional frecuentemente se lanzan nuevos productos, en el año 2011 se presentó un insecticida biológico denominado Carpovirus plus, el cual tiene como agente activo un virus específico capaz de controlar *Cydia pomonella*, un insecto comúnmente llamado gusano de la pera y la manzana; dicho insecticida ha sido desarrollado por el INTA, registrado en SENASA y actualmente esta siendo producido y comercializado por una empresa especializada. En el Alto Valle de Río Negro se ha comenzado a sustituir el uso de plaguicidas de tipo químicos por dicho insecticida biológico (INTA, 2011).

A nivel mundial existen productos disponibles comercialmente para el control de *F. verticillioides*. Se comercializan los productos Intercept (Soil Technologies Corp., USA) y Blue Circle (CTT Corp., USA), ambos con el biocontrolador *Pseudomonas cepacia*, capaz de controlar al patógeno en maíz y vegetales; se destaca también el producto T-22G/T-22HB (BioWorks Inc., USA) con el biocontrolador *Trichoderma harzianum* T-22 capaz de controlar diferentes patógenos en un amplio rango de cultivos, entre ellos *Fusarium spp* en maíz. Los tres productos citados, han sido registrados, producidos y comercializados en USA (Fravel y col., 1999).

5.2. Aplicabilidad de productos de biocontrol

La producción de biofungicidas para evitar la contaminación fúngica pre cosecha en cereales es escasa en nuestro país y además existen varias limitaciones que reducen su uso a nivel comercial. Una limitante importante es la eficacia de los productos biológicos, diferente de los pesticidas o antimicrobianos químicos, los cuales disminuyen rápidamente la densidad de plaga o la severidad de la enfermedad, la

eficacia de los productos biológicos a campo está condicionada por distintos factores ambientales difíciles de controlar como temperatura, humedad, acidez, exposición a luz ultravioleta, etc. Además de la baja supervivencia de las células con capacidad antagonista en el medio ambiente natural, en la mayoría de los productos se produce una elevada pérdida de viabilidad durante los procedimientos de preparación, formulación y/o conservación, los cuales suponen una eliminación de agua ya sea por congelación, deshidratación o liofilización. Es importante por lo tanto, a fin de lograr el éxito comercial de un agente biofungicida, que en las diferentes etapas de preparación del formulado, se logre asegurar la sobrevivencia y eficacia del agente de biocontrol bajo diferentes fluctuaciones medioambientales, como también la sobrevivencia en la etapa de almacenamiento (Hallsworth y Magan, 1994a; 1994b; Kohl y Fokkena, 1998). Otra limitación importante de los productos biológicos, es el reducido espectro de acción que poseen contra diferentes plagas o patógenos, a diferencia de los plaguicidas o antimicrobianos químicos; además es necesario recordar que el éxito de un agente biocontrolador está asociado a la prevención, por lo que debe ser aplicado antes que el patógeno colonice de forma sistémica el cultivo (Powell, 1992).

Otro punto que afecta la comercialización y aplicación de los productos de biocontrol es la falta de métodos rigurosos de evaluación, que permitan anticipar de manera racional las complejas interacciones que ocurren en el campo entre la planta, la plaga o agente patógeno, el ACB, el suelo y el ambiente. También el uso de ACB en el control de plagas o enfermedades requiere de un manejo y aplicación más complejos que los requeridos para el uso de pesticidas o antimicrobianos químicos, lo que conduce a una mayor variabilidad y un mayor tiempo de respuesta para observar los resultados a campo, siendo esto un problema para la comercialización y uso extensivo (Van Elsas y Heijnen, 1990).

A pesar de las limitaciones que aún presentan los productos de control biológico en su uso y comercialización, son muchos los beneficios y ventajas que pueden otorgar, como se destaca, por ejemplo, que provocan poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluidos el ser humano, además no existen problemas de intoxicaciones y la resistencia de plagas al control biológico es muy rara. Si bien el control biológico con frecuencia es a largo plazo, es permanente, por lo que la aplicación de fungicidas disminuye en forma sustancial, reduciendo así la contaminación con productos químicos. Además la relación costo - beneficio es favorable. Las ventajas aludidas sostienen a los productos de control biológico como

una alternativa más prometedora para tratar cultivos, con el fin de obtener granos libres de enfermedades y metabolitos tóxicos fúngicos o químicos; por lo cual el control biológico se convierte en un componente vital de los sistemas sustentables, constituyendo un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable; es por lo tanto, de suma importancia, desarrollar productos con buen nivel tecnológico y práctico, capaces de superar las limitaciones anteriormente mencionadas (Fravel y col., 1999; Moenne-Loccoz y col., 1999).

El desarrollo de nuevos productos de origen biológico a nivel comercial implica tener en cuenta diferentes aspectos a fin de obtener un producto adecuado: definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva de inóculo que permita una buena relación costo-rendimiento en la producción; establecer ensayos de producción a pequeña escala; asegurar la estabilidad del producto y determinar las condiciones de almacenamiento (Whitesides y col., 1994). Se debería utilizar la maquinaria *standard* de cualquier explotación agrícola para su aplicación, y el producto debería ser efectivo a dosis parecidas a las utilizadas para los agroquímicos. Se requiere alguna forma de protección a nivel legal para este tipo de productos. Los organismos genéticamente modificados pueden ser patentados, pero la mayoría de los ACB utilizados son los tipos “salvajes”, tal y como se encuentran en la naturaleza. Es necesario realizar bioensayos a nivel de laboratorio, invernadero y campo que confirmen la efectividad del producto una vez formulado (Stirling, 1991; Walter y Paau, 1993; Lumsden y col., 1995; Boyetchko y col., 1998).

La normativa europea exige para el registro de productos fitosanitarios (Directiva 91/414/CE, modificada por la Directiva 2001/36/EC para biopesticidas) la presentación de una completísima documentación referente a la materia activa y al producto en cuestión. Esto obliga a cada empresa interesada en el registro de un producto a la elaboración de numerosos ensayos de ecotoxicidad, estudios metabólicos, toxicológicos, de patogenicidad, infectividad, eficacia, residuos, etc, estudios que resultan económicamente muy costosos. En USA rige la ley de registro de plaguicidas (PRIA: Pesticide Registration Improvement Act) de 2003, la cual proporciona las normativas vigentes que regulan la aprobación de nuevos productos.

En Argentina, para introducir un bioformulado al mercado de los fitosanitarios el vendedor debe ajustarse al marco legal aplicable al manejo integral de pesticidas en el país, regulado por la Ley General del Medio Ambiente (Ley N° 25.675) del Sistema Federal de fiscalización de agroquímicos y biológicos, la cual tiene por objetivo lograr

un control eficaz tanto de los productos como de los equipos aplicadores, instrumentando un sistema que permita controlar, fiscalizar y supervisar aspectos básicos del producto (Resolución SENASA 500/2003; 1230/2004). Por otro lado, la resolución del SENASA N° 350/1999 y sus modificatorias complementarias, aprueba el manual de procedimientos, criterios y alcances para el registro de productos fitosanitarios en la República Argentina.

5.3. Situación en Argentina

El mercado de biológicos en Argentina (incluyendo inoculantes de nitrógeno y fósforo, promotores de crecimiento, bioinsecticidas, biofungicidas y bioherbicidas) entre los años 2008 y 2009 facturó poco más de 50 millones de dólares (alrededor de 170 millones de pesos); en el año 2010 el mercado tuvo un importante crecimiento generando negocios por 70 millones de dólares (más de 220 millones de pesos) de facturación, y según estimaciones privadas esa cifra crecerá entre 300 y 350 millones de dólares para el año 2020. Del total de facturación, el 70% de la producción la concentran tres empresas, dos de capital local y una internacional (CEPAL, 2011).

Asociado con la actividad primaria y su reciente expansión, la producción de inoculantes, revela cierto dinamismo y una alta densidad de empresas pequeñas y medianas de capital nacional. Se trata de una actividad donde excepto las empresas líderes catalogadas como medianas, desarrollada por pymes radicadas en el cordón maicero / sojero de Argentina, y a excepción de las empresas multinacionales, los microorganismos son provistos por institutos públicos que operan a modo de referentes técnicos del sector. Los rasgos típicos de las empresas medianas / grandes de capital local son el poseer canales de comercialización propios, presencia en los mercados relacionados, trayectorias tecnológicas previas en productos similares, regulaciones favorables en los mercados aledaños donde las empresas tienen un claro posicionamiento y pertenencia a grupos económicos de proyección internacional (CEPAL, 2011).

En la Argentina existen 120 empresas que se dedican a la producción de biotecnología en una amplia variedad de actividades que pueden ser agrupadas en ocho campos principales de aplicación. De las 120 empresas identificadas, las mayores concentraciones empresarias se dan en las producciones de inoculantes, fertilización asistida y salud humana (entre 20 y 29 empresas), mientras que micropropagación y salud animal tienen las menores densidades empresarias. Existen, como es de esperar,

algunas “áreas vacías” como la producción de biotecnologías aplicadas a temas ambientales (lixiviación y similares) (CEPAL, 2011).

En su conjunto, el centenar de empresas de biotecnología facturó entre los años 2008 y 2009 un promedio de 3,142 millones de pesos (equivalente a poco menos de 1000 millones de dólares), con lo cual la biotecnología, aún repartida entre diversas actividades, tiene una importante relevancia. El 90% de la actividad bajo análisis es netamente agrícola y corresponde a la producción de semillas y sanidad animal, mientras que los inoculantes significan poco más del 5 % del total. Por otro lado, el empleo generado por las empresas de inoculantes es de 779 puestos de trabajo, en relación a un empleo total por el sector de 8642 (CEPAL, 2011).

El sector de productos agroquímicos incluye una amplia gama de productos insecticidas, herbicidas, fungicidas, reguladores de crecimiento y terapicos para semillas. Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CaSAFe) el mercado total de fertilizantes y agroquímicos obtuvo 2750 millones de dólares en el año 2009, con lo cual la participación de biológicos en el mercado es aún pequeña (50 millones de dólares) (CaSAFe, 2010). Los agroquímicos tienen aplicación agrícola para la protección de cultivos y semillas contra las diferentes plagas. La cantidad física comercializada ha tenido un notable aumento desde la aplicación de la siembra directa, en especial el glifosato, que se aplica en la siembra directa de la soja y en los barbechos químicos. Es necesario agregar que existe una cuestión de difícil comprobación, pero de enorme importancia para la salud de la población y la inocuidad de los alimentos, el comercio ilícito de plaguicidas prohibidos o su desvío para otros usos que los permitidos en su registro. En un documento del Programa Nacional de Riesgos químicos, del Ministerio de Salud, se identifican a los siguientes principios activos como objetos de comercio ilegal en la Argentina: pentaclorofenol, paratión, DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), HCH (hexaclor ciclohexano) y Alar (Daminozide, fitoregulador) en los montes frutales, en especial en peras y manzanas.

Si bien en el mercado argentino están disponibles diversos productos para el control de organismos fitopatógenos y existe una amplia gama de proyectos en fase de investigación, no existe ningún producto biológico comercial, con acción biofungicida, capaz de controlar *F. verticillioides* en el cultivo de maíz precosecha y asegurar granos a cosecha con bajos niveles de fumonisinas.

5.4. Investigaciones previas

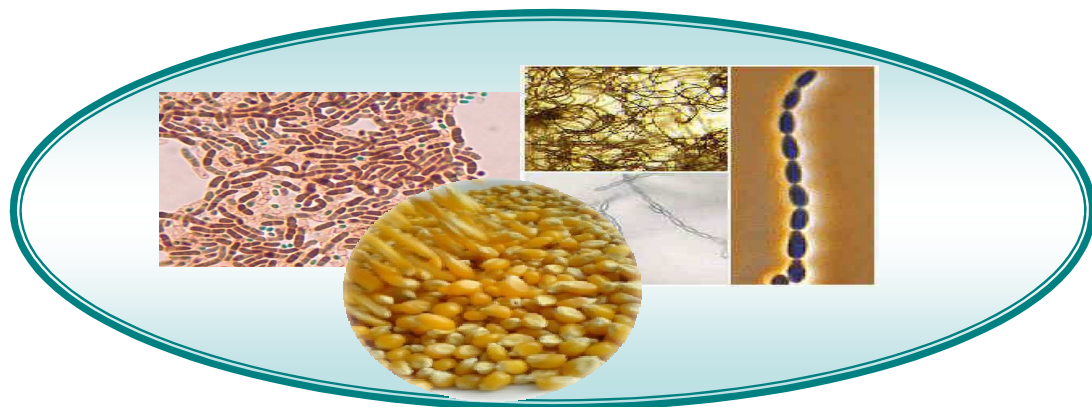
Las investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo se iniciaron con el objetivo de buscar una estrategia de biocontrol efectiva, estudiando el ecosistema de raíz durante los primeros días de desarrollo de la plántula de maíz, con la finalidad de conocer la población rizosférica y endorrizosférica de bacterias y hongos pertenecientes a la sección *Liseola*. Se clasificaron los aislados pertenecientes a *Fusarium* y se determinaron los niveles de fumonisinas sintetizadas por los mismos. Posteriormente se seleccionaron a partir del agroecosistema de maíz posibles agentes de biocontrol. Se demostró la competencia rizosférica de las especies de los géneros *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, aisladas de endorrizosfera de maíz. Posteriormente se realizaron ensayos de competencia utilizando mezclas antagonistas sobre cepas de *F. verticillioides* y se probaron diferentes niveles de inóculo. Se establecieron procedimientos de selección para potenciales agentes de biocontrol rizobacterianos (Cavaglieri y col., 2004a; 2005a). Las técnicas seleccionadas fueron el índice de superposición de nichos, prueba que aporta datos sobre la similaridad ecológica entre ACB y patógeno; índice de dominancia la cual da una idea de la dominancia espacial entre ACB y patógeno; antibiosis y la síntesis de sustancias deletéreas para impedir la colonización del patógeno. Además se estudiaron los impactos sobre parámetros de crecimiento (fase de latencia, velocidad de crecimiento) y sobre la acumulación de fumonisinas. También se realizaron estudios de correlación de técnicas (Cavaglieri y col., 2004b). Por otro lado se realizaron ensayos preliminares de los efectos de la competencia bacteriana sobre la colonización rizosférica de especies de *Fusarium* de la sección *Liseola in situ* (en macetas) (Cavaglieri y col., 2004a; 2005b). Se continuó con los estudios de potencialidades de la protección mediante la bacterización, utilizando diversos aislados bacterianos, géneros, mezclas, niveles de inóculo, analizando los efectos sobre la colonización rizosférica de cepas productoras de fumonisinas durante los primeros días de desarrollo de la planta en macetas en cámaras de cultivo (Cavaglieri y col., 2005a; 2005b; 2005c). Posteriormente se llevaron los ensayos a escala de invernadero y se realizó una prueba piloto a nivel de campo experimental. Se compararon los parámetros de crecimiento de la plántula de maíz cuando se usan los métodos convencionales y cuando se usa el ACB solo. Se probaron los diferentes ACB, su viabilidad, niveles de inóculos, forma de aplicación y se determinaron los niveles de impacto. Se analizaron los niveles de protección durante los primeros días del desarrollo de la planta de maíz sobre la colonización rizosférica y

posteriormente los resultados a cosecha sobre la colonización de *Fusarium* sección *Liseola* en el grano y el contenido de fumonisinas del mismo (Pereira y col., 2007, 2009, 2010).

En posteriores ensayos a campo se seleccionaron dos ACB, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Microbacterium oleovorans* los cuales inoculados en semillas de maíz redujeron el recuento de *F. verticillioides* y también disminuyeron significativamente el contenido de fumonisinas FB₁ y FB₂ (Pereira y col., 2007). En dicho estudio además se comprobó que con la adición de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* se preserva la riqueza y diversidad microbiana normal en el suelo, y también que ambos ACB proporcionan una protección integral del maíz (Pereira y col., 2007). La bacterización de semillas de maíz con *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en una concentración de 10⁹ ufc/ml, fue efectiva para reducir la colonización del fitopatógeno *F. verticillioides* en el nivel presente en el medioambiente (Pereira y col., 2009; 2010; 2011).

Con la finalidad de cubrir las necesidades de mayor eficiencia en la producción y sanidad de granos de maíz a cosecha, hemos direccionado nuestras investigaciones a fin de desarrollar dos formulados biológicos con actividad biofungicida.

Creemos que es posible ofrecer un producto fungicida de bajo costo, más económico que los agroquímicos presentes en el mercado, con el adicional de ser ambientalmente seguro, de fácil aplicación, que no origine residuos tóxicos y no genere resistencia como los productos químicos, y de la misma manera, logre minimizar la contaminación con fumonisinas, en maíz pre-cosecha.



Hipótesis De Trabajo

“Un inóculo con acción biofungicida puede ser manipulado fisiológicamente en el laboratorio, para aumentar su tolerancia a las fluctuaciones ambientales y puede ser producido con alta eficiencia y bajo costo, para ejercer el efecto protector deseado durante la etapa de campo”

Objetivo General

“Desarrollar un formulado biofungicida para minimizar la contaminación del maíz con fumonisinas, en etapa pre-cosecha”

Capítulo I

Adaptación Fisiológica De Los Agentes De Biocontrol

1. Introducción

Muchos ACB frecuentemente tienen un rango muy limitado para establecerse y controlar con éxito plagas o enfermedades en el campo, debido a las condiciones de humedad relativa y temperatura (Hallswort y Magan, 1994a). El potencial agua en el suelo habitualmente sufre fluctuaciones en el tiempo, disminuyendo poco a poco con la desecación (filtración, evaporación, evapo-transpiración), o aumentando rápidamente, por riego o lluvia. La humectación de un suelo seco puede causar un rápido incremento en el potencial agua superficial del suelo (Evans y col., 1975) y por ello puede generar el estrés ambiental más grave que sufren muchos organismos en este ecosistema (Smith, 1979). Para mejorar la respuesta al estrés y estimular los mecanismos de supervivencia, su eficacia y su idoneidad para las condiciones prácticas; es posible a través de métodos fisiológicos mejorar la tolerancia al estrés ambiental, lo cual es fundamental para permitir el desarrollo eficaz de los ACB microbianos (Deacon, 1991; Teixidó y col., 2005).

La exposición de las células a una alta osmolaridad externa, produce pérdida de agua del interior de la misma, al disminuir el contenido de agua interno se produce una disminución de la presión de turgencia y del volumen citoplasmático. Como consecuencia de la disminución del volumen citoplasmático, la concentración de metabolitos intracelulares se incrementa, y esto causa una reducción de la actividad agua intracelular. Para adaptarse al estrés osmótico, los microorganismos acumulan solutos compatibles, aminoácidos y azúcares que ayudan a equilibrar la presión osmótica (Csonka, 1989). Frente a la baja actividad de agua, los solutos compatibles pueden contrarrestar el flujo de salida de agua de la célula, aumentando el volumen citoplasmático y el contenido de agua libre en medios con alta osmolaridad. Su acumulación, por lo tanto, permite la proliferación celular continua en condiciones desfavorables (Record y col., 1998). Los solutos compatibles también ayudan a estabilizar proteínas y componentes celulares frente al fuerte efecto desnaturalizador de la alta osmolaridad (Kempf y Bremen, 1998).

El espectro de solutos compatibles utilizados por los microorganismos comprende un limitado número de compuestos como azúcares (ej. trealosa), polioles (ej. glicerol y

glucosil-glicerol), aminoácidos libres (ej. prolina y glutamato), derivados de los mismos (ej. prolina, betaína y ectoína), aminas cuaternarias y sus análogos sulfonados (ej. glicina-betaína, carnitina y dimethylsulfoniopropinato), ésteres sulfato (ej. colina-O-sulfato), di-aminoácidos N-acetilados y pequeños péptidos (ej. N- δ -acetilornithine y N-acetil-glutaminil-glutamine amida) (Kempf y Bremen, 1998). Los representantes más importantes son el aminoácido prolina, el compuesto tri-metil-amonio glicina-betaína y tetra-hidro-pirimidina ectoína (Kuhlmann y Bremen, 2002). Un variado espectro de solutos compatibles suele ser utilizado por los microorganismos con un propósito osmoregulador, la composición del pool de solutos puede variar según la fase de crecimiento y el medio de crecimiento del microorganismo (Galinski y Truper, 1994). Además una función adicional de los solutos compatibles, en general, es que ayudan a estabilizar proteínas y componentes celulares, atenuando los efectos nocivos del calor, congelación, secado, alta salinidad, radicales de oxígeno, urea, radiación y otros agentes desnaturizantes que pueden afectar la integridad de las proteínas, ácidos nucleicos, biomembranas e incluso células enteras (da Costa y col., 1998; Kempf y Bremen, 1998; Lentzen y Schwarz, 2006). Como se ha demostrado por ejemplo, que la ectoína estabiliza notablemente la capacidad catalítica de varias enzimas, como la fitasa, a alta temperatura (Zhang y col., 2006); por lo tanto se puede deducir que un ACB sometido en el laboratorio a condiciones de estrés acuoso, puede incrementar la síntesis de solutos compatibles y por ende su capacidad de sobrevivencia en condiciones de deshidratación. Se ha demostrado que células de *Pantoea agglomerans* CPA-2 cultivadas en medios líquidos con baja a_w (modificada con ClNa) fueron más tolerantes al estrés osmótico, con lo cual la manipulación fisiológica intracelular del contenido de polioles y azúcares, puede proporcionar una herramienta para el desarrollo de ACB con mejor aptitud ecológica frente a las condiciones del medio ambiente en el que se encuentren (Teixidó y col., 1998 a; Abadías y col., 2001; Teixidó y col., 2006).

También se ha demostrado que cuando las bacterias son expuestas a la falta de carbono o al estrés oxidativo, se vuelven más tolerantes a muchas condiciones perjudiciales del medio ambiente como bajo pH, desecación, salinidad, temperatura, etc. Hay pruebas de que las células sometidas a estrés generan moléculas de señales que inducen la respuesta de estrés en los genes de otras células. Por lo tanto es posible a través de métodos fisiológicos mejorar la tolerancia de los ACB al estrés medioambiental, desarrollando productos de biocontrol más efectivos y consistentes (Deacon, 1991).

2. Objetivo

Mejorar la calidad del inóculo para su sobrevivencia durante el almacenamiento en anaqueles y para una mayor eficiencia durante su permanencia en el ecosistema rizosférico.

2.1 Objetivos específicos

- 2.1.1. Determinar la sobrevivencia al estrés osmótico de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, al modificar la actividad acuosa del medio de crecimiento (a_w 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96), con soluto iónico (ClNa) y solutos no iónicos (glicerol y glucosa), en medio líquido y sólido.
- 2.1.2. Determinar la sobrevivencia al estrés mátrico de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, al modificar el potencial mátrico de los medios de crecimiento (a_w 0,99; 0,98; 0,97; 0,96) con el soluto no iónico polietilenglicol 600 (PEG 600), en medio sólido.
- 2.1.3. Determinar la sobrevivencia al shock térmico de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en diferentes medios con actividad acuosa modificada.
- 2.1.4. Determinar la acumulación intracelular de solutos compatibles, glicina-betaína y ectoína.
- 2.1.5. Determinar la influencia de la adaptación fisiológica de los ACB en la actividad de biocontrol sobre *F. verticillioides*.

3. Metodología

3.1 Cepas microbianas

-*Bacillus amyloliquefaciens*: N° de acceso GenBank EU164542.

-*Microbacterium oleovorans*: N° de acceso GenBank EU164543.

Ambas cepas fueron aisladas del ecosistema rizosférico de la plántula de maíz, se encuentran en la colección de cultivos del Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, y han sido depositadas en el Banco Nacional de Microorganismos dependiente del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires, con el número de registro BNM-0531 y BNM-0532, respectivamente.

3.2. Adaptación fisiológica

3.2.1 Estrés osmótico en medio sólido:

Con la finalidad de determinar el perfil xerotolerante, *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* fueron cultivados en 200 ml de caldo tripticasa soya (CTS) durante 24 h a 30°C y 140 rpm. A partir de 1 ml de cultivo se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-9} , las diluciones 10^{-7} a 10^{-10} se sembraron en placas con el medio sólido agar tripticasa soya (ATS) modificado osmóticamente con el soluto iónico ClNa, y con solutos no iónicos, glicerol y glucosa, en los niveles de actividad acuosa (a_w) 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 (Dallyl y Fox, 1980). La a_w se midió con el equipo Aqua Lab (serie 4TE). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h, en bolsas de polietileno, y luego se determinó el número de células viables (UFC/ml) de cada bacteria en cada tratamiento. La experiencia se realizó por triplicado, dos veces.

3.2.2 Estrés osmótico en medio líquido:

Se inocularon 10^4 UFC/ml de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en erlenmeyers con 150 ml de CTS modificado osmóticamente con el soluto iónico ClNa, y los solutos no iónicos, glicerol y glucosa, a los niveles de a_w 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 (Dallyl y Fox, 1980). Los cultivos líquidos se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 30°C y 140 rpm. Después de la incubación se realizaron diluciones seriadas a partir de 1 ml y 0,1 ml de cada dilución de 10^{-5} a 10^{-10} se sembraron en medio ATS. Luego de 24 h de incubación a 30°C, se determinaron las UFC/ml en cada tratamiento. La experiencia se realizó por triplicado.

3.2.3. Estrés mátrico en medio sólido

B. amyloliquefaciens y *M. oleovorans* fueron inoculados en erlenmeyers con 200 ml de CTS e incubados durante 24 h a 30°C y 140 rpm. A partir de 1 ml de cultivo se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-9} , las diluciones 10^{-7} a 10^{-10} se sembraron en placas con el medio sólido ATS modificado mátricamente con el soluto no iónico polietilenglicol 600 (PEG 600), en los niveles de a_w 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 (Dallyl y Fox, 1980). Las placas se colocaron en bolsas de polietileno, se incubaron a 30°C durante 24 h y se determinó las UFC/ml de cada bacteria a cada potencial mátrico. Se realizó la experiencia por triplicado.

3.2.4. Supervivencia y adaptación fisiológica al shock térmico

B. amyloliquefaciens y *M. oleovorans* fueron cultivados en los diferentes medios líquidos modificados osmóticamente con soluto iónico y no iónico, a las actividades acuosas 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96, durante 24 h a 30°C y 140 rpm. Luego del tiempo de incubación se realizó un recuento de las UFC/ml. Por centrifugación a 7000 g durante 10 min a 10°C se cosecharon las células, el pellet obtenido fue resuspendido en 2 ml de buffer fosfato (PBS) y colocado en un baño termostatzado a 45°C por 30 min. Luego de dicho tiempo se realizaron diluciones seriadas en CTS y se sembraron en ATS. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C, y luego se realizó un nuevo recuento de UFC/ml.

3.3. Acumulación endógena de glicina-betaína y ectoína

B. amyloliquefaciens y *M. oleovorans* fueron incubados en CTS modificado osmóticamente con soluto iónico (ClNa) y solutos no iónicos (glicerol y glucosa), a los niveles de a_w 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 durante 24 h a 30°C y 140 rpm. Luego los cultivos fueron centrifugados a 7000 g, a 10°C durante 10 min. El pellet se resuspendió en 2 ml de leche descremada estéril y se transfirieron a ampollas de vidrio estériles. Las ampollas se colocaron en un liofilizador, con una presión <0,05 mbar y -45°C durante 24 h. La extracción de los solutos compatibles endógenos se realizó siguiendo el método descrito por Kunte y col. (1993). Veinte mg de células liofilizadas de cada tratamiento se añadieron a 570 μ l de la mezcla de extracción metanol/cloroformo/agua (10:5:4). Se agitó vigorosamente durante 5 min, e inmediatamente se adicionó a la mezcla igual volumen de cloroformo y agua (170 μ l) y se agitó durante 10 min. La separación de fases se realizó por centrifugación a 9720 g durante 10 min. La capa hidrófila superior, que contenía los solutos compatibles, se recuperó y se diluyó antes del análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Una alícuota de 0,75 ml de acetonitrilo (ACN) se adicionó a cada muestra para obtener la misma relación de ACN / agua (80:20) que la fase móvil. Las muestras se centrifugaron a 9720 g durante 10 min y se filtraron a través de un filtro Whatman estéril de 0,22 μ m, con el fin de eliminar las impurezas antes del análisis por HPLC. Se inyectaron 50 μ l de muestra en el cromatógrafo, las que se analizaron utilizando una columna RP8-NH2 (125 x 4 mm

con relleno de 3 μm Gromsil amino 100 RP-8; Grom Ana-lítico, Rottenburg-Hailfingen, Alemania). El caudal de la fase móvil fue de 1,5 ml/min a temperatura ambiente. Los solutos glicina-betaína y ectoína fueron detectados con el detector Agilent G1362A, con índice de refracción de Agilent (IR), y un inyector automático conectado al paquete de software de Agilent Milenio para el análisis de datos. Las áreas de los picos se integraron y compararon con las curvas de calibración construidas con los estándares de cada componente analizado (50 a 800 $\mu\text{mol/g}$). Los resultados se expresaron como μmol de soluto compatible/g (peso seco de células bacterianas). Todos los resultados fueron obtenidos de la media de tres muestras de cultivo bacteriano liofilizado por tratamiento.

3.4 Influencia de la adaptación fisiológica de los agentes antagonistas en el crecimiento de *F. verticillioides*

Se determinó la actividad inhibidora de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* sobre la fase de latencia y la tasa de crecimiento de *F. verticillioides*. El medio de crecimiento para la interacción biológica y para los controles bacterianos se modificó a diferentes a_w . Se mantuvo un control para cada tratamiento sin modificar la a_w del medio. El medio base utilizado fue agar harina de maíz (MMEA) el cual contiene 3% de harina de maíz y 1,5% de agar. La a_w del medio se ajustó a 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 mediante la adición de ClNa, de acuerdo con Dallyn y Fox (1980). Una suspensión bacteriana de cada tratamiento de 10^8 células/ml fue vertida en una placa de Petri con 20 ml de MMEA y mezclado según la técnica de placa vertida. Una vez solidificados los medios, las placas se inocularon en el centro con una suspensión de 10 μl de 10^4 esporas/ml. Las esporas fueron obtenidas de un cultivo de 7 días de incubación en el medio de esporulación Capellini-Peterson (Capellini y Peterson, 1965). Los tratamientos se incubaron a 25°C durante 12 días en bolsas de polietileno (Nesci y col., 2005). El radio de la colonia fúngica se midió diariamente. Para cada colonia, dos radios medidos en ángulos rectos entre sí, se promediaron para encontrar el radio medio. La tasa de crecimiento radial (mm/d) fue posteriormente calculada por regresión lineal de la fase exponencial de crecimiento. El momento en que la línea interceptó al eje x se utilizó para calcular la fase de latencia para cada tratamiento.

4. Resultados

4.1. Adaptación fisiológica

4.1.1. Estrés osmótico y mátrico en medio sólido

Los cambios en el crecimiento celular de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en relación a los tratamientos osmóticos y mátricos se observan en la fig.I.1.

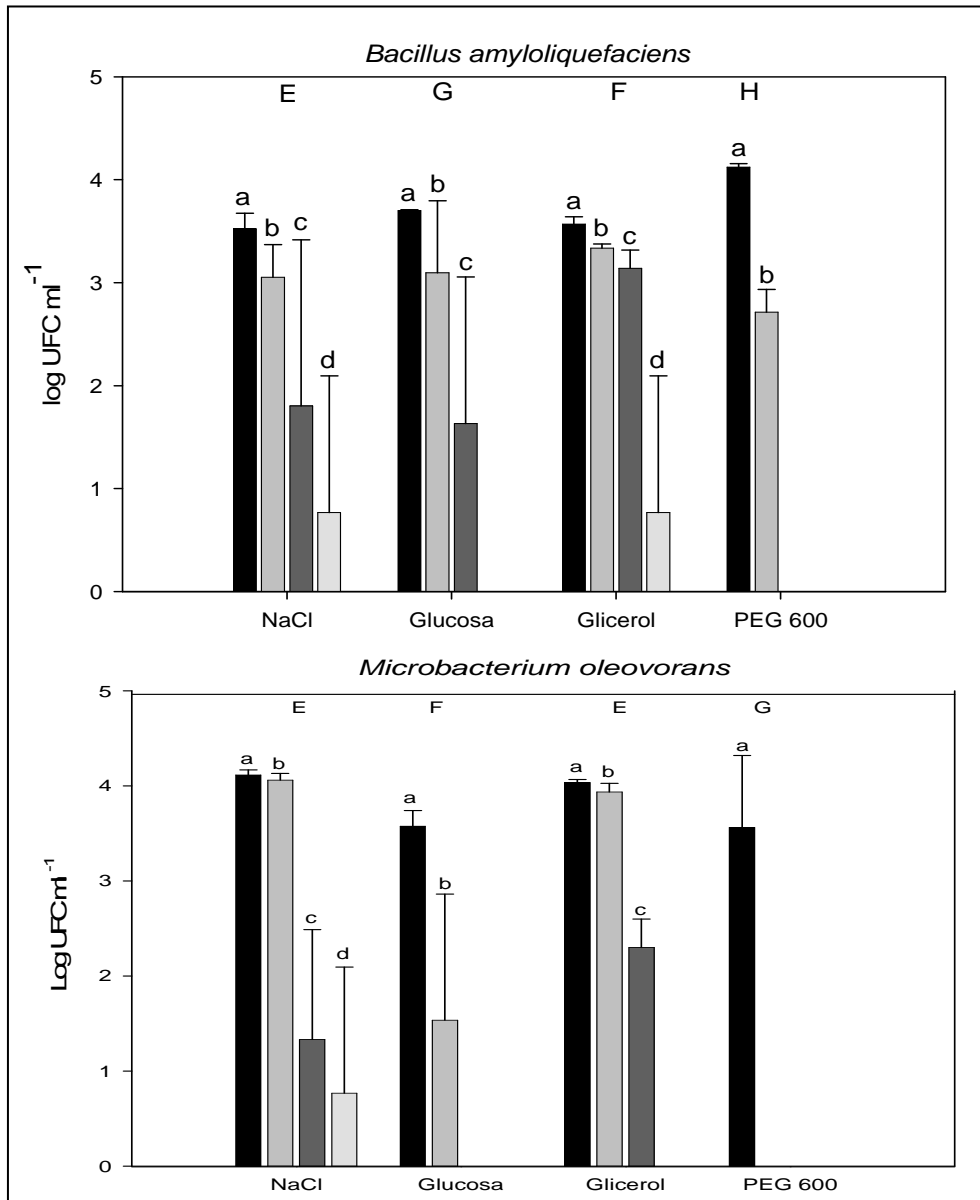


Fig. I.1. Viabilidad de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en medios sólidos a diferentes a_w generadas por solutos osmóticos y mátricos (a_w 0,99 ■, a_w 0,98 ■, a_w 0,97 ■ y a_w 0,96 □). En las diferentes a_w con un mismo soluto, igual letra minúscula indica que no existen diferencias significativas, y diferentes solutos con igual letra mayúscula, indica que no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Duncan ($P < 0,05$).

El recuento de células viables de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* con diferentes niveles de a_w con cada soluto, mostró diferencias estadísticamente significativas. El recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) disminuyó en todos los tratamientos a medida que el nivel de a_w decreció. En los tratamientos con *B. amyloliquefaciens*, se observaron diferencias significativas entre todos los medios de crecimiento bajo estrés osmótico (iónico y no iónico) y mátrico. El tratamiento con PEG fue el más estresante a bajas a_w , el mayor crecimiento (4,12 UFC/log) se observó a la a_w 0,99 y no se observó crecimiento con la a_w 0,97 y 0,96. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *M. oleovorans* en el medio modificado con ClNa (presión osmótica) y PEG 600 (presión mátrica), encontrando un recuento de 4,11 log en el medio modificado con ClNa a la a_w 0,99 y 3,86 log en medio modificado con PEG 600 a la misma a_w . Se observaron importantes diferencias en el crecimiento de *M. oleovorans* entre los medios modificados con ClNa y medios modificados con glucosa (estrés osmótico iónico y no iónico), y entre medios modificados con glucosa y con glicerol (estrés osmótico no iónico). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos modificados con ClNa (iónico) y glicerol (no iónico). En medio modificado con ClNa a a_w 0,99 el crecimiento fue de 4,11 log y con glicerol de 4,03. El tratamiento con PEG fue el más estresante para *M. oleovorans*, al igual que para *B. amyloliquefaciens*.

4.1.2 Estrés osmótico en medio líquido

La viabilidad de las células de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* a las 24 h de incubación, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las a_w de los tratamientos (fig. I.2).

A las 48 y 72 h de incubación se observó crecimiento bacteriano en fase estacionaria en todos los tratamientos (datos no presentados). Los análisis estadísticos de potencial osmótico, a_w , cepas bacterianas y las interacciones con los datos obtenidos a las 24 horas de incubación se muestran en la tabla I.1. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el potencial osmótico, a_w , cepas bacterianas y la interacción entre potencial osmótico y cepas bacterianas. El principal efecto fue producido por el potencial osmótico ($F= 213,28$; $p > 0,0001$). No se observaron diferencias significativas en el recuento de UFC entre las a_w 0,99; 0,98 y 0,97. El recuento de UFC de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* disminuyó a la menor a_w .

Tabla I.1. Significancia del potencial osmótico (Ψ_s), a_w , cepas bacterianas (B), y las interacciones en base al efecto del potencial osmótico en el crecimiento bacteriano en medios líquidos durante 24h de incubación.

Factor	GL	CM	F ^a	Pr > F
Ψ_s	2	149.39	213.28	0.0001
a_w	3	17.16	24.51	0.0001
B	1	71.55	102.16	0.0001
$a_w \times \Psi_s$	6	2.47	3.53	0.0030
$\Psi_s \times B$	2	71.64	102.28	0.0001
$a_w \times B$	3	2.28	3.26	0.0241
$a_w \times B \times \Psi_s$	6	1.43	2.05	0.0763
Error	-	115	80.55	-

GL: grados de libertad. CM: cuadrados medios, F: F-Snedecor. Significativo a $P < 0,0001$.

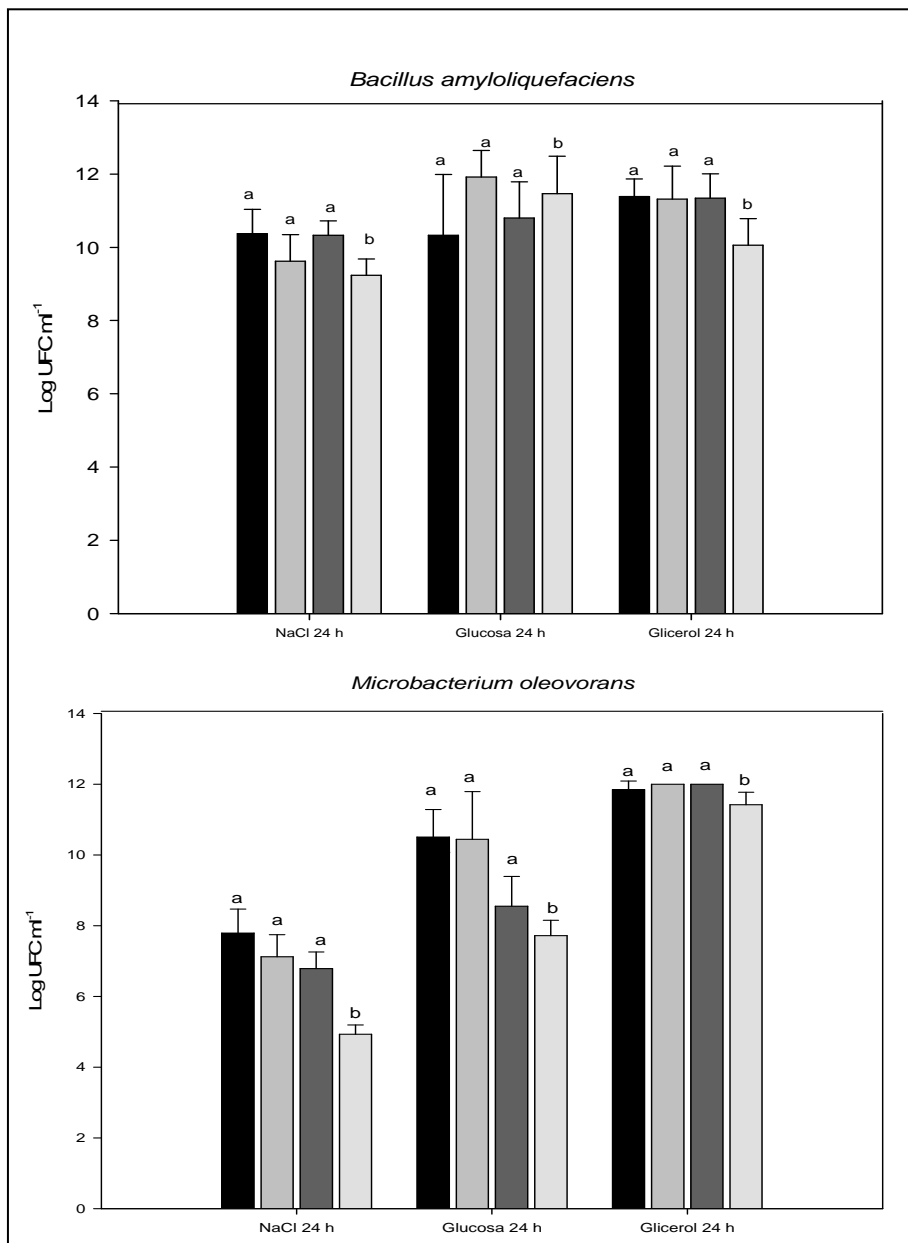


Fig. I.2. Viabilidad de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en medios líquidos a diferentes a_w generadas por solutos osmóticos (0.99 a_w ■, 0.98 a_w ▒, 0.97 a_w ▓ y 0.96 a_w □). En las diferentes a_w con un mismo soluto, igual letra minúscula indica que no existen diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($P < 0,05$).

4.1.3 Supervivencia y adaptación fisiológica al shock térmico

Células de *B. amyloliquefaciens* crecidas en medios modificados con CINa y glucosa mostraron diferencias significativas antes y después del tratamiento de shock térmico (fig. I.3.).

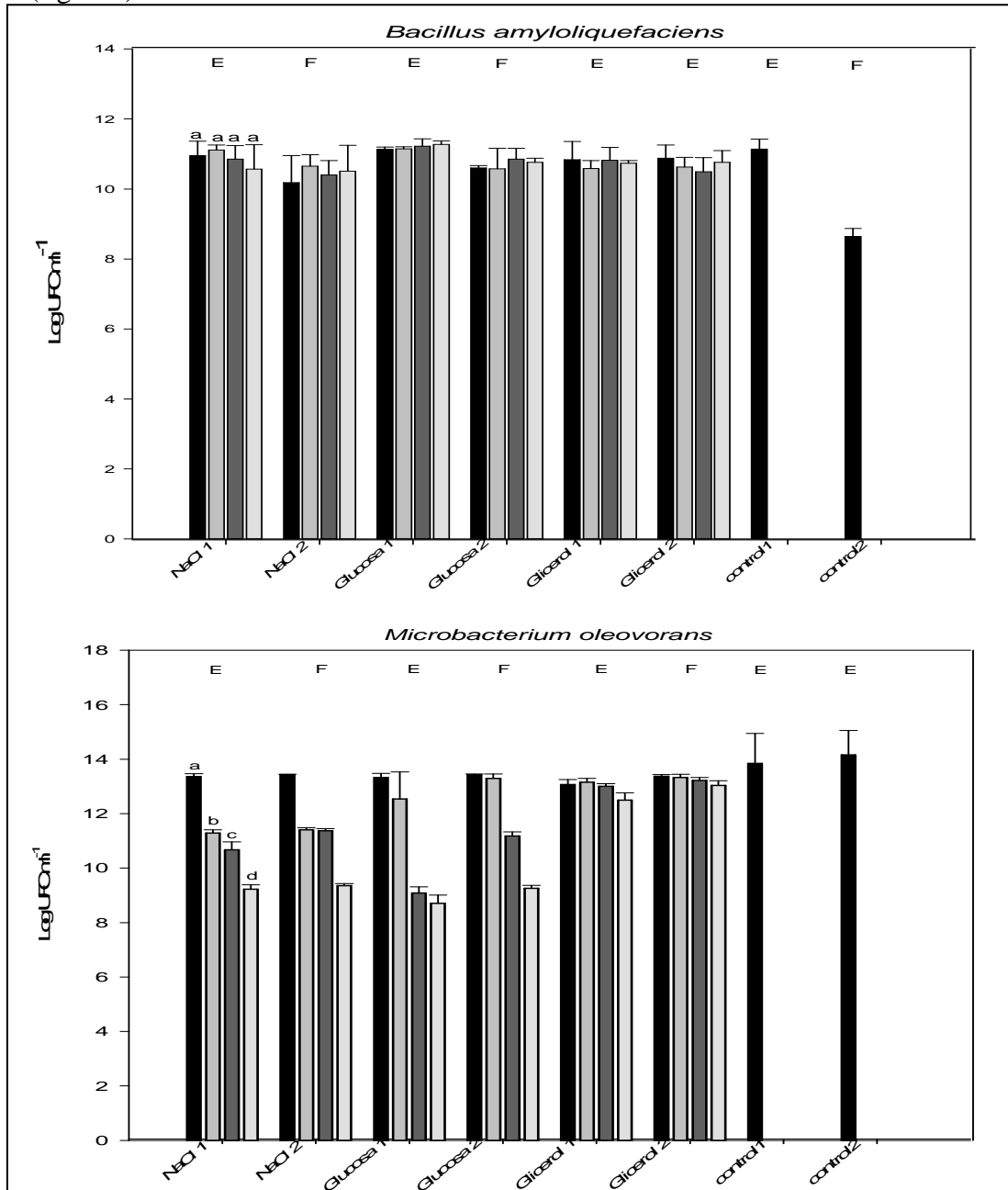


Fig. I. 3. Supervivencia luego del shock térmico a 45°C durante 30 min de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* crecidas en medios con a_w modificada osmóticamente (0,99 a_w ■ ; 0,98 a_w ■ ; 0,97 a_w ■ y 0,96 a_w □). En diferentes a_w con un mismo soluto, igual letra minúscula indica que no existen diferencias significativas, y datos con igual letra mayúscula, indica que no son significativamente diferentes antes y después del shock térmico, de acuerdo al test de Duncan ($P < 0,05$).

Se observaron diferencias no significativas en el recuento de viables antes y después del shock térmico en medios modificados osmóticamente con glicerol, manifestando mejor

tolerancia hacia la baja a_w y mejor supervivencia después del shock, siendo el recuento de 1.05×10^{11} UFC/ml antes del shock y $1,25 \times 10^{11}$ UFC/ml después de shock térmico con la a_w 0,99. En todos los medios osmóticamente modificados, la actividad acuosa no tuvo influencia en la viabilidad de *B. amyloliquefaciens* después del shock térmico. No se observaron diferencias significativas entre las cuatro a_w ensayadas en cada tratamiento. La mayor diferencia de viabilidad, estadísticamente significativa, se obtuvo en el tratamiento control con 11,2 log antes y 8,69 log después del shock térmico.

Se observaron diferencias significativas en la supervivencia de células de *M. oleovorans* en los medios modificados con glucosa, ClNa y glicerol en las cuatro a_w analizadas. El efecto de la a_w en el recuento de UFC fue mínimo en los medio modificados con glicerol. Los valores fueron 13,1 log a la a_w 0,99 y 12,55 log a la a_w 0,96 antes del shock térmico. El crecimiento en los tres medios de cultivo modificados iónicamente mostraron diferencias significativas en la supervivencia de *M. oleovorans* antes y después del shock térmico, la excepción fue el tratamiento control (medio sin modificar). *M. oleovorans* mostró más resistencia al shock térmico en el tratamiento control que *B. amyloliquefaciens*.

4.2. Acumulación de glicina-betaína y ectoína

La acumulación endógena de glicina-betaína y ectoína en células de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* crecidas bajo estrés iónico se muestran en la fig. I.4. Todas las células crecidas bajo estrés osmótico iónico, con la a_w 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96; mostraron acumulación de ambos solutos compatibles. La mayor acumulación de glicina-betaína en células de *B. amyloliquefaciens* fue a la a_w 0,98 con 511,37 $\mu\text{mol/g}$; para el tratamiento con la a_w 0,97 la acumulación de glicina-betaína fue significativamente menor con 232 $\mu\text{mol/g}$. Mientras que para el ACB *M. oleovorans* la mayor acumulación de glicina-betaína fue 758 $\mu\text{mol/g}$ a la a_w 0,96, valor significativamente mayor a los otros tratamientos (a_w 0,99; 0,98 y 0,97). La menor concentración de glicina-betaína se observó en el tratamiento de a_w 0,99 con 249 $\mu\text{mol/g}$.

La acumulación de ectoína en células de *B. amyloliquefaciens* fue de 1070 $\mu\text{mol/g}$ a la a_w 0,99, significativamente mayor en comparación con los otros niveles de a_w (0,98; 0,97 y 0,96). La menor acumulación de ectoína se observó a 0,98 a_w . En contraste, células de *M. oleovorans* acumularon concentraciones muy altas de ectoína (1268

$\mu\text{mol/g}$) en el tratamiento con la a_w 0,98, diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros niveles de a_w ensayados. La menor concentración de ectoína (811 $\mu\text{mol/g}$) se observó a 0,96 a_w .

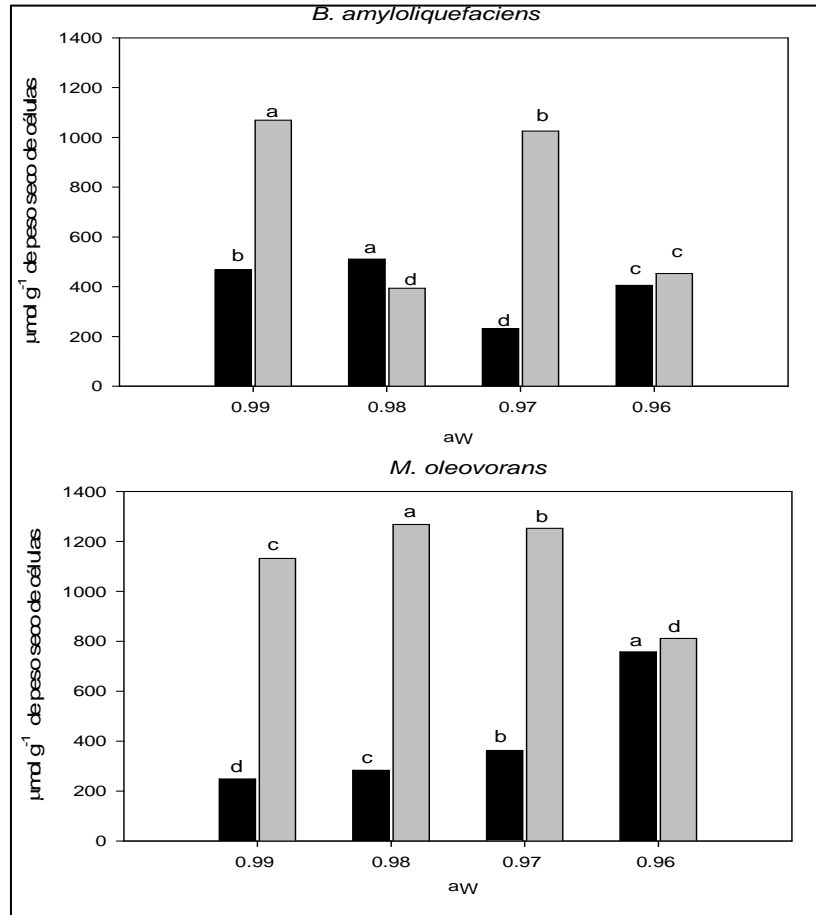


Fig. I.4. Acumulación intracelular de betaína (■) y ectoína (■) en células de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* crecidas durante 24 horas a 30°C en CTS modificado con CNa a 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 a_w . Datos con la misma letra para diferentes a_w indica diferencias no significativas para cada soluto compatible, de acuerdo al test de Duncan ($P < 0,05$).

4.3. Efecto de los agentes antagonistas adaptados fisiológicamente en el crecimiento de *F. verticillioides*

La fase de latencia y la tasa de crecimiento de *F. verticillioides* crecido en medios con diferentes a_w se muestran en la tabla I.2. Los agentes antagónicos produjeron un aumento significativo en la fase de latencia y una disminución en la tasa de crecimiento de *F. verticillioides* ($P < 0,001$). Se observó para todos los tratamientos, que la fase de latencia de los controles de *F. verticillioides* aumentó a medida que la a_w del medio decreció. Los dos agentes antagónicos causaron un aumento en la fase de latencia de *F.*

verticillioides. La fase de latencia de *F. verticillioides* se incrementó significativamente por la interacción con células de *B. amyloliquefaciens*, fisiológicamente adaptadas a las a_w 0,97 y 0,96, con valores que oscilaron entre 7,26 h y 8,56 h respectivamente. *M. oleovorans* también incrementó significativamente la fase de latencia, destacándose en la interacción con las células adaptadas a las a_w 0,98 y 0,96 con valores que oscilaron entre 7,42 h y 8,47, respectivamente. Además, el efecto en la fase de latencia de *B. amyloliquefaciens* fisiológicamente adaptado, fue mayor en los tratamientos con bajas a_w .

Tabla I.2. Efecto de las interacciones ACB - *F. verticillioides* en la fase de latencia y la velocidad de crecimiento del patógeno.

Actividad acuosa	Tratamiento	Fase de latencia (h)	Velocidad de crecimiento (mm h ⁻¹)
0.99	Fv - C	1.87 cC	0.59 aA
	Ba - W	4.39 a	0.40 c
	Ba - PA	3.06 b	0.50 b
	Mo - W	2.59 B	0.56 B
	Mo - PA	2.90 A	0.53 C
0.98	Fv - C	3.03 cC	0.54 aA
	Ba - W	4.24 a	0.53 a
	Ba - PA	4.11 b	0.30 b
	Mo - W	4.11 B	0.37 B
	Mo - PA	7.42 A	0.27 C
0.97	Fv - C	3.94 cB	0.55 aA
	Ba - W	4.09 b	0.19 c
	Ba - PA	7.26 a	0.45 b
	Mo - W	4.30 A	0.49 B
	Mo - PA	3.84 C	0.44 C
0.96	Fv - C	4.75 bB	0.38 aA
	Ba - W	5.20 b	0.25 b
	Ba - PA	8.56 a	0.16 c
	Mo - W	4.64 C	0.39 A
	Mo - PA	8.47 A	0.17 B

Fv-C: *F. verticillioides* control sin agentes antagonistas bajo diferentes a_w , Ba-W: *B. amyloliquefaciens* sin adaptación fisiológica; Ba-PA: *B. amyloliquefaciens* fisiológicamente adaptado; Mo-W: *M. oleovorans* sin adaptación fisiológica; Mo-PA: *M. oleovorans* fisiológicamente adaptado. Los datos con la misma letra minúscula indican que no existen diferencias significativas en tratamientos de *B. amyloliquefaciens*, datos con la misma letra mayúscula indica que tratamientos con *M. oleovorans* no son significativamente diferentes de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan ($P < 0,05$).

Se observó que cambios en los valores de a_w en el tratamiento control, redujeron más del 35% el crecimiento de *F. verticillioides* entre las a_w 0,99 y 0,96; y en presencia de los ACB el crecimiento de *F. verticillioides* fue más inhibido en niveles de bajas a_w . Células de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* sin adaptación fisiológica produjeron la mayor reducción en la tasa de crecimiento de *F. verticillioides* con las a_w 0,97 y 0,98, con valores de 0,19 y 0,37 mm/h, respectivamente. Células de *B. amyloliquefaciens*

adaptadas fisiológicamente, redujeron más del 55% el crecimiento del patógeno a la a_w 0,96 con respecto al control, mientras que *M. oleovorans* redujo más del 50% el crecimiento del patógeno a 0,98 y 0,96 a_w .

5. Discusión

Diversos estudios sugieren que es posible mejorar la tolerancia del microorganismo al estrés, y por lo tanto mejorar su comportamiento bajo condiciones ambientales no controladas y / o durante el proceso de formulación, sin afectar su potencial de control biológico (Harman y col., 1991; Teixidó y col., 1998, 2005, 2006; Abadías y col., 2001). En este estudio se demostró que es posible mejorar la tolerancia de células de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* al estrés *in vitro*, lo cual podría permitir un mejor rendimiento en los procesos de formulación, como también soportar mejor el estrés hídrico de la rizósfera de maíz.

La fuerza osmótica del medio ambiente es un importante parámetro físico que influye en la capacidad de los microorganismos de proliferar y competir con éxito en un determinado hábitat. La disponibilidad de agua es expresada como el potencial agua total (Ψ_t), una medida del contenido de agua disponible para el crecimiento microbiano, el cual se determina *in vitro* a través de la medida del crecimiento, bajo diferentes potenciales osmóticos y mátricos, modificando el medio con solutos iónicos y no iónicos, estos datos permiten determinar un potencial óptimo, mínimo y máximo (Magan, 2007). Si bien la sobrevivencia de las bacterias en presencia de solutos es determinada por el potencial osmótico, en el suelo dicha sobrevivencia es determinada principalmente por el potencial mátrico.

El éxito de la colonización de la rizósfera y esfermosfera por los ACB inoculados en las semillas, es fuertemente influenciado por las condiciones del hábitat en particular. Las fluctuaciones del potencial agua del suelo es uno de los factores más importantes que influye en la actividad microbiana de la rizósfera, dado que las bacterias crecen principalmente en películas de agua sobre la superficie de las partículas de suelo, consecuentemente, son fuertemente afectadas por el potencial mátrico. El potencial hídrico del suelo habitualmente fluctúa con el tiempo, disminuyendo gradualmente con el secado y aumentando rápidamente por riego o lluvias, por esta razón los ACB deben ser tolerantes a la alta concentración de solutos (Magan, 2001).

Para mejorar la respuesta al estrés y desencadenar mecanismos que estimulen su eficacia y su idoneidad en condiciones prácticas, los métodos de adaptación fisiológica son esenciales para aumentar el rendimiento de los ACB (Deacon, 1991; Teixidó y col., 2005), y además, es importante el aumento significativo de viabilidad en medios estresados, para el rendimiento de los ACB durante la producción en masa. En este estudio, el potencial mátrico fue más estresante que el potencial osmótico (iónico y no iónico) para células de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, además se observó que el tiempo de incubación desempeña un papel significativo en el recuento de células en medios con baja a_w , dado que en tratamientos con glicerol, a las 48 h de incubación se obtuvieron altos niveles de producción.

Cañamás y col. (2008a) han demostrado que la exposición de células a un medio ambiente con bajo nivel de estrés, puede inducir estrategias de adaptación endógenas, que pueden facilitar la resistencia frente a la exposición a elevados niveles del mismo estrés, por ejemplo, la temperatura. En este estudio, los resultados obtenidos demostraron que la tolerancia osmótica está relacionada con la termo-tolerancia, dado que células de *B. amyloliquefaciens* crecidas en un medio osmótico iónico, mostraron una mejor supervivencia frente al estrés por calor, lo cual mejora la capacidad de los microorganismos de resistir condiciones perjudiciales que pueden producirse en el medio ambiente (Ang y col., 1991). Además la termo-tolerancia de los ACB, es también una ventaja en el proceso de formulación. Nuestros resultados coinciden con los de Teixidó y col. (2005), quienes demostraron que células de *Pantoea agglomerans* crecidas en medios con baja a_w , modificada iónicamente con ClNa, mejoraron la tolerancia al estrés osmótico y además, adquirieron protección cruzada contra el estrés por calor en comparación con células crecidas en medio basal sin modificar. Las células de *B. amyloliquefaciens* crecidas en medio líquido modificado con glicerol, mostraron tener mejor tolerancia a la baja a_w y una mejor supervivencia al estrés térmico con temperaturas de 45°C. En contraste *M. oleovorans* mostró diferencias significativas en la viabilidad antes y después del shock térmico, en todos los medios osmóticamente modificados. Prácticamente no se observaron diferencias entre los tratamientos con ClNa y glucosa. *M. oleovorans* incubado 48 h en el medio modificado con glicerol produjo un aumento en la viabilidad, una mejor tolerancia a la baja a_w y redujo el efecto del shock térmico.

El crecimiento de bacterias en un medio ambiente de alta osmolaridad, desencadena flujos rápidos de agua celular, causando la deshidratación del citoplasma. Con el fin de

evitar la pérdida de agua, mantener la turgencia, el correcto funcionamiento y crecimiento celular, los microorganismos sintetizan y acumulan osmolitos orgánicos, llamados solutos compatibles, los que ajustan el Ψ interno a un nivel inferior que el del entorno inmediato (Kempf y Bremer, 1998). De esta manera bacterias como *Bacillus subtilis*, para sobrevivir y crecer en hábitats osmóticamente cambiantes, han desarrollado una serie de reacciones celulares integradas de adaptación, como parte de una respuesta al estrés general del medio (Hecker y Völker, 1998; Price, 2000) o como respuesta específica al estrés osmótico (Bremer y Kraemer, 2000; Kempf y Bremer, 1998). En base a nuestros resultados, hemos demostrado que de la misma manera, células de *B. amyloliquefaciens* y de *M. oleovorans* tienen la capacidad de sintetizar glicina-betaína y principalmente ectoína, bajo condiciones de alta osmolaridad; coincidiendo también con el ACB *Bacillus pasteurii* que sintetiza ectoína como respuesta específica al efecto osmótico, y tanto osmolitos iónicos, como no iónicos, desencadenan la producción de ectoína (Kuhlmann y Bremer, 2002; Göller y col., 1998).

Los solutos compatibles se definen operacionalmente como osmolitos que pueden ser acumulados por la célula en concentraciones excesivamente altas (hasta varios moles por litro) sin perturbar las funciones celulares vitales y el correcto plegamiento de las proteínas (Brown, 1976). El nivel de acumulación de solutos compatibles es establecido por la osmolaridad del medio ambiente (Poolman y Glaasker, 1998), así las células frente a un shock hipo-osmótico, pueden restablecer el equilibrio osmótico mediante la liberación de osmolitos a través de sistemas específicos de flujo de salida (Morbach y Krämer, 2002), permitiendo una rápida adaptación a un entorno osmóticamente fluctuante.

Los solutos compatibles funcionan como estabilizadores de proteínas y componentes celulares frente a los efectos desnaturalizadores de la fuerza iónica (Kempf y Bremer, 1998). En estudios realizados por Louis y col. (1994), se demostró que la ectoína y la hydroxyectoina tienen la capacidad de estabilizar células de *Escherichia coli* en procesos de deshidratación y liofilización. En otros estudios realizados por Teixidó y col. (2005) también se demostró la mejora en la tolerancia osmótica y térmica del medio ambiente, en células del ACB *P. agglomerans* CPA-2 gracias a la acumulación de los solutos compatibles glicina-betaína y ectoína. Nuestros resultados mostraron que *M. oleovorans* acumuló el mayor contenido de ectoína cuando la a_w se redujo a 0,96. La acumulación de glicina-betaína y ectoína en células de *B. amyloliquefaciens* y *M.*

oleovorans mejoraría la tolerancia a las modificaciones de potenciales agua y la desecación en el proceso de liofilización y producción de formulado.

En estudios previos Etcheverry y col. (2009) demostraron en ensayos *in vitro* a diferentes a_w , como los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* influyen en la tasa de crecimiento y provocan un incremento en la fase de latencia de *F. verticillioides*. En nuestro estudio se obtuvo un resultado similar, pudiendo inferir que la adaptación fisiológica no afecta el potencial de control biológico, al contrario, el efecto de reducción en la tasa de crecimiento de *F. verticillioides* fue mayor con células previamente adaptadas a bajas a_w .

Capítulo II

Proceso De Producción Del Inóculo Del Agente De Biocontrol

1. Introducción

El uso de microorganismos con capacidad fungistática o fungicida para el control de enfermedades causadas por hongos en plantas, es una de las alternativas más prometedoras al uso de fungicidas químicos (Butt, 2000) y en cultivos como el maíz, el tratamiento de semillas con agentes de control biológico (ACB) se recomienda como el método más adecuado para el control de patógenos a nivel de la rizósfera (Lewis, 1991; Harman 1992; Hebbar y col., 1992). Es necesario un adecuado proceso de formulación de productos de biocontrol, con la finalidad de optimizar la eficacia, estabilidad, seguridad y facilidad de aplicación del mismo (Rhodes, 1993).

- Proceso de producción del inóculo:

Los formulados padecen inconvenientes y problemas que han determinado que el desarrollo de un formulado implique un enfoque multidisciplinario incluyendo la patología y la ecología microbiana de la planta, a fin de aclarar las interacciones entre el biofungicida, la plaga y el medio ambiente (Deacon, 1991; Whipps, 1997; Butt y Copping, 2000). Los principales problemas que afrontan los formulados radican en que las células microbianas deben mantenerse estables durante largos períodos a lo largo de la cadena de distribución, expuestas a las fluctuaciones de temperatura ambiental, o bien, en el caso de productos que requieren refrigeración, implican sistemas de distribución altamente especializados y costosos. También existen problemas debido a una limitada vida útil del producto, que genera falta de eficacia y bajo establecimiento de los ACB, y por lo tanto, baja actividad antagonista (Van Elsas y Heijnen, 1990; Powell, 1992). Otro inconveniente que deben enfrentar los formulados es la exposición a la hostilidad y fluctuaciones ambientales, en particular la actividad acuosa (a_w) y la luz ultravioleta durante y después de la aplicación, produciendo una rápida reducción de la densidad de población. Algunos de los problemas se alivian con un buen proceso de formulación, pero otros siguen siendo una barrera importante para la comercialización (Fravel y col., 1999); por ello además, desde el punto de vista industrial, un microorganismo antagonista exitoso debería tener las características de ser genéticamente estable, exhibir una gran y consistente eficacia contra un rango de patógenos, ser capaz de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, producir una

fácil y rápida fermentación en medios de bajo costo, ser capaz de sobrevivir y permanecer estable en el producto formulado, ser compatible con los tratamientos químicos y físicos, y ser seguro para humanos y organismos no blancos (Hofstein y col., 1994; Whitesides y col., 1994).

La formulación puede afectar en muchos aspectos el éxito del producto de biocontrol, algunos de los beneficios evidentes incluyen una mayor eficacia, mayor vida útil, mayor facilidad de manejo, aumentar la seguridad (reducción de la permeabilidad en la piel o por inhalación), cobertura adecuada de la zona, compatibilidad con el equipo agrícola y las prácticas, y menores costos de producción (Fravel y col., 1999). El desarrollo de formulados que contengan alta densidad de microorganismos y alta proporción de sobrevivencia durante el almacenamiento en anaquel, constituye un punto importante para el desarrollo de productos de biocontrol efectivos (Vidhyasekaran y Muthamilan, 1995; Moenne-Loccoz y col., 1999). Minuto y col. (1995) demostraron que el desarrollo de un formulado y un sistema de aplicación adecuado puede aumentar el rendimiento de antagonistas en el control del marchitamiento por *Fusarium spp.*

- Tipos de formulaciones:

Existen varios tipos de formulaciones, el que una sustancia activa dada se presente de una forma u otra dependerá básicamente de sus propiedades físico-químicas (solubilidad, tamaño de partícula, densidad, fluidez), de la maquinaria que dispone el aplicador, del tipo de ACB a formular, y de factores económicos. En la tabla II.1. se detallan algunos tipos de formulaciones más utilizadas en el desarrollo de productos fitosanitarios (Kloepper y Schroth, 1981; Vidhyasekaran, 1997; Burges y Jones, 1998).

Tabla II 1. Tipos de formulaciones.

Tipos de Formulaciones	Ventajas	Desventajas	Descripción
Polvo	No necesita dilución, ni mezclado antes de usar	Riesgo de inhalación o adhesión a la piel	Sustancia activa más un portador inerte. Apropriada para aplicaciones directamente al suelo.
Granulados	Dosificación más fácil, reducción de la cantidad de producto adherido a los envases, equipo de aplicación simple y menos riesgo para los aplicadores.	Liberación lenta del principio activo y puede necesitar humedad para empezar a actuar.	Sustancia activa con un soporte mineral y un agente humectante que le de cohesión. Útil para aplicaciones directamente al suelo.

Polvos humectables	Fácil almacenamiento, transporte y manejo, menos peligro de absorción por la piel y los ojos en el momento de aplicación.	Requiere agitación buena y constante. Abrasivo a muchas bombas y boquillas provocando desgaste de los equipos de aplicación. Riesgo potencial por inhalación.	Sustancia activa con un soporte mineral y sustancias que contribuyan a su suspendibilidad, dispersabilidad y estabilidad. Puede ser utilizada para aspersiones foliares.
Polvos floables secos o gránulos dispersables	Fácil manejo y aplicación. Raramente obstruye las boquillas.	Agitación constante y puede dejar residuos.	Granulado del ingrediente activo junto a otros componentes similares al polvo mojable. Puede ser utilizada para aspersiones foliares.
Materiales microencapsulados	Productos más seguros para operarios de campo; la liberación gradual de la parte activa aumenta la eficacia; el producto sufre menor volatilización y menos olores.	Agitación constante en tanque. Tecnología cara	Partícula sólida o líquida del ingrediente activo cubierta por un material sintético. Apropia si se necesita proteger al principio activo del medio circundante y controlar el tiempo de liberación del mismo.
Concentrado emulsionable	Emulsiones que tienen una actividad biológica mucho más elevada que una suspensión de partículas sólidas de la misma sustancia activa y pueden manipularse con facilidad.	Por la presencia de los disolventes orgánicos que son caros e inflamables, requieren instalaciones especiales de fabricación y almacenamiento y suelen presentar cierta toxicidad por inhalación o por contacto con la piel.	Sustancia activa más un disolvente orgánico. Se obtiene una acción rápida del principio activo.
Floables o Suspensiones Concentradas	Las suspensiones concentradas son de fácil manipulación y aplicación por ser formulaciones líquidas.	Tienen las mismas dificultades que los EC cuando hay derrames o salpicaduras. Tienen poder abrasivo sobre boquillas y bombas.	Ingrediente activo con emulsificantes y dispersantes. Se obtiene una acción rápida del principio activo.

Como se ha descrito, los formulados de biomasa microbiana pueden ser secos o líquidos. Los productos secos incluyen polvos humectables, polvos y granulados; mientras que los formulados líquidos consisten en suspensiones de biomasa en agua, aceites, o combinaciones de ambos (emulsiones). Los formulados secos normalmente comprenden secado por liofilización, lecho fluido o pulverización. En general los formulados secos tienen las ventajas de tener un largo período de almacenamiento con menor riesgo de contaminación, y además permiten mayor temperatura de almacenamiento y, consecuentemente, agilizan su distribución (Li y Tian, 2006). Aparte de las consideraciones biológicas en la selección de una fermentación líquida o sólida, la selección de los medios de cultivo y otras manipulaciones del sistema, como el costo

de materiales, el tiempo de fermentación y el trabajo en cuestión, debe ser considerado también. Para reducir los costos, en muchos formulados se han utilizado diferentes productos de desechos industriales, como melaza, cáscaras de maní, maíz, harina de pescado, diversas fuentes de quitina y extractos de levadura. Debe tenerse en cuenta que si bien son productos económicos y reducen los costos, pueden aumentar la variabilidad del producto obtenido, y es conocido que el medio de producción afecta no solo el tipo de inóculo, sino también la eficacia del mismo (Fravel y col., 1999), por lo tanto una selección apropiada del medio de cultivo es un punto esencial para optimizar la viabilidad celular (Abadías y col., 2001).

Otro punto importante a tener en cuenta en un formulado comercial, es que debe ser estable (viable y eficaz) durante un período de almacenamiento de al menos doce meses. Dicha estabilidad se puede lograr con la adaptación fisiológica de los ACB, como ya hemos visto en el capítulo I, y también a través del agregado de protectores y una variedad de compuestos aditivos, en el proceso de formulación. Los aditivos se añaden al formulado con un propósito específico, como mejorar la eficacia, la vida útil, la tolerancia al medio ambiente, o la facilidad de manipulación; el ingrediente activo puede incorporarse al producto biológico durante la producción, formulación y aún más tarde, durante el almacenamiento (Burges, 1998). Se utilizan aditivos como adhesivos, diluyentes, supresores, dispersantes, emulsionantes, gelatinizantes, humectantes, blanqueadores, separadores, estabilizantes, protectores solares, sinergistas, espesantes, nutrientes, aglutinantes, o protectores, dependiendo de su función en el formulado (Burges y Jones, 1998), además el tipo de formulado depende del uso previsto.

Muchos ACB se han suministrado en transportadores como arcillas, turba, alginato, vermiculita o lignina (Kloepper y Schroth, 1981; Fravel y col., 1985; Bashan, 1986; Magan y Whipps, 1988; Vidhyasekaran, 1997), pero es importante tener en cuenta que la producción comercial de formulados requiere de bajo costo de manufactura, la obtención de productos con alta densidad celular y la optimización de las condiciones nutricionales (Lumsden y Lewis, 1989).

En algunos estudios con ACB de postcosecha se han producido formulados liofilizados, que se han destacado por mantener la viabilidad microbiana; se conoce que la supervivencia de la célula bacteriana durante el proceso de liofilizado depende de muchos factores, tales como las condiciones de crecimiento, las sustancias presentes en el medio, la concentración inicial de células, la temperatura de congelación y las condiciones de rehidratación (Zhao y Zhang, 2005). La liofilización es el método de

conservación de bacterias, levaduras y hongos más conveniente y satisfactorio (Berny y Hennebert, 1991). Sin embargo, si se analiza detalladamente el método de liofilizado, supone una suma de dos factores de estrés, congelación y deshidratación, los cuales podrían reducir significativamente la viabilidad microbiana (Crowe y col., 1990). Es por ello que es necesario agregar aditivos de protección, con el fin de proteger bioquímicamente las células vivas contra el daño durante la congelación y/o secado (Berny y Hennebert, 1991), y además obtener un residuo seco, con una estructura física de calidad como material de soporte y como un receptor durante la rehidratación. De esta manera, se han desarrollado numerosos formulados liofilizados de diversos ACB, capaces de mantener alta viabilidad y eficacia en el control de los antagonistas.

2. Objetivo

Buscar la mejor técnica de producción de inóculo en medio de bajo costo y alto rendimiento.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Determinar la eficiencia y obtención de inóculo en diferentes medios de cultivo modificados osmóticamente, a fin de elegir el medio de producción.

2.1.2 Determinar la viabilidad de los ACB luego del proceso de liofilización en los diferentes medios de cultivo con alta osmolaridad.

3. Metodología

3.1 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

B. amyloliquefaciens y *M. oleovorans* fueron inoculados en 200 ml de diferentes medios

1. Caldo nutritivo (CN) (8 g/L) + dextrosa (10 g/L) + extracto de levadura (5 g/L) (NYDB).
2. Melaza (20 g/L) + polvo de soja (10 g/L) (MSB) (Costa y col., 2001).
3. Sacarosa (10 g/L) + extracto de levadura (5 g/L) (SYB) (Costa y col., 2001).
4. Lactosa (12,7 g/L) + harina de mandioca (16,7 g/L) + peptona de soja (8 g/L) + sulfato de amonio (1,8 g/L) (LTPAB) (Rao y col., 2007).

La a_w de los medios fue modificada con ClNa y glicerol a 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 (Dallyl y Fox, 1980). Cada tratamiento fue inoculado al 1% con cultivos de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en fase exponencial de crecimiento, en caldo tripticosa soja (CTS). Los erlenmeyers fueron incubados en agitación (140 rpm) a 30°C,

luego en cada tratamiento se determinó el crecimiento a través de un espectrofotómetro a 620 nm y la viabilidad celular se estimó a través de siembra en superficie. Para ello se realizaron diluciones de los diferentes tratamientos en CTS y 0,1 ml de cada dilución se sembró en placas de agar tripticosa soya (ATS). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h, y se determinó el número de viables que se expresó como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). La experiencia se realizó por triplicado y en dos ensayos independientes. Al analizar los datos obtenidos, se calculó por regresión lineal de la fase exponencial de crecimiento, el parámetro de crecimiento de g (tiempo de generación) y la constante K (constante de tasa de crecimiento).

3.2 Producción del inóculo

Los medios NYDB y MSB fueron seleccionados para la producción de biomasa. La a_w de los mismos fue modificada a 0,99; 0,98; 0,97 y 0,96 mediante la adición de ClNa según Dallyl y Fox (1980).

Para realizar el cultivo, se utilizaron erlenmeyers de 1000 ml conteniendo 200 ml de medio a diferente a_w , inoculados al 1% (v/v) con *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*. Los erlenmeyers inoculados fueron incubados en un agitador a 140 rpm y 30°C durante 24 h. Luego de dicho tiempo se realizaron diluciones seriadas en CN y 100 μ l fueron sembrados en superficie en placas de ATS con la finalidad de determinar la viabilidad de los ACB antes del proceso de liofilizado. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h, y luego se determinó el número inicial de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Para proteger las células bacterianas durante el proceso de liofilizado, previo a la congelación, se agregó a todos los tratamientos una solución de sacarosa al 10% (Abadías y col., 2001). Los erlenmeyers conteniendo los inóculos fueron congelados directamente a -20°C durante 4 h, y luego a -80°C durante 24 h. Los erlenmeyers congelados fueron conectados a un liofilizador funcionando con una presión <0,05 mbar y -45°C durante 72 h (fig. II.1). Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.3 Determinación de la viabilidad luego del proceso de liofilizado

Se tomaron 0,5 g de cada muestra liofilizada las cuales fueron hidratadas con 9 ml de CN. Se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, y se homogenizaron con un agitador vórtex. A partir del inóculo líquido se realizaron diluciones seriadas y 100 μ l

de cada una se sembraron en superficie en placas de ATS. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h, y luego se determinaron las UFC/ml de cada tratamiento.



Fig. II.1. Proceso de liofilización. Rendimiento.

4. Resultados

4.1 Parámetros de crecimiento bacteriano en función del medio de cultivo y la actividad acuosa.

Los parámetros de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* se muestran en las tablas II.2. y II.3. La constante de crecimiento (k) y el tiempo de generación (g) de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$ test ANOVA) entre los diferentes medios de cultivo y la a_w de los distintos tratamientos.

Los valores de k disminuyeron a medida que la a_w decreció en todos los medios de cultivo, el menor valor de UFC se registró a las a_w 0,97 y 0,96.

La baja disponibilidad de agua limitó el crecimiento de ambos ACB, a la a_w 0,96 se redujo más del 60% de la velocidad de crecimiento para *B. amyloliquefaciens* y más del 90% para *M. oleovorans* en comparación con lo obtenido a la mayor a_w . Ambas bacterias mostraron la mayor reducción de k a la a_w 0,96 en el medio MSB.

Tabla II.2. Parámetros de crecimiento de *B. amyloliquefaciens* en función del medio de crecimiento y la actividad acuosa.

Medio de cultivo	a_w 0.99	a_w 0.98	a_w 0.97	a_w 0.96
NYDB <i>b</i>	<i>g</i> : 0.25 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.32 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.35 h <i>b</i>	<i>g</i> : 0.48 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 2.76 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 2.15 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 1.97 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 1.43 h ⁻¹ <i>d</i>
MSB <i>b</i>	<i>g</i> : 0.20 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.26 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.35 h <i>b</i>	<i>g</i> : 0.54 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 3.45 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 2.65 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 1.97 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 1.27 h ⁻¹ <i>d</i>
SYB <i>c</i>	<i>g</i> : 0.60 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.52 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.67 h <i>b</i>	<i>g</i> : 1.52 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 1.15 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 1.32 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 1.03 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 0.45 h ⁻¹ <i>d</i>
LTPAB <i>a</i>	<i>g</i> : 0.38 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.37 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.39 h <i>b</i>	<i>g</i> : 0.49 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 1.82 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 1.84 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 1.76 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 1.40 h ⁻¹ <i>d</i>

Datos con igual letra indican diferencias no significativas según el test de Duncan ($P < 0,05$).

g: tiempo de generación, *K*: constante de crecimiento

La mayor velocidad de crecimiento tanto para *B. amyloliquefaciens* como para *M. oleovorans* se observó en el medio MSB a la a_w 0,99 ($k = 3,45$ y $1,97$ h⁻¹ respectivamente), además ambas bacterias alcanzaron el menor tiempo de duplicación en iguales condiciones ($g = 0,25$ y $0,35$ h, respectivamente).

En el medio de cultivo NYDB *B. amyloliquefaciens* mostró un importante crecimiento ($k = 2,76$ h⁻¹) con un bajo tiempo de generación ($g = 0,25$ h). De manera similar, *M. oleovorans* mostró una constante $k = 1,30$ h⁻¹ y un tiempo de generación $g = 0,53$ h.

Tabla II.3. Parámetros de crecimiento de *M. oleovorans* en función del medio de crecimiento y la actividad acuosa.

Medios de cultivo	a_w 0.99	a_w 0.98	a_w 0.97	a_w 0.96
NYDB <i>a</i>	<i>g</i> : 0.53 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.54 h <i>c</i>	<i>g</i> : 1.14 h <i>b</i>	<i>g</i> : 1.26 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 1.30 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 1.27 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 0.60 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 0.55 h ⁻¹ <i>d</i>
MSB <i>a</i>	<i>g</i> : 0.35 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.73 h <i>c</i>	<i>g</i> : 1.07 h <i>b</i>	<i>g</i> : 5.55 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 1.97 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 0.94 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 0.64 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 0.12 h ⁻¹ <i>d</i>
SYB <i>c</i>	<i>g</i> : 0.57 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.88 h <i>c</i>	<i>g</i> : 2.31 h <i>b</i>	<i>g</i> : 2.44 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 1.21 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 0.78 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 0.29 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 0.28 h ⁻¹ <i>d</i>
LTPAB <i>b</i>	<i>g</i> : 0.50 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.60 h <i>c</i>	<i>g</i> : 0.93 h <i>b</i>	<i>g</i> : 0.98 h <i>a</i>
	<i>k</i> : 1.38 h ⁻¹ <i>a</i>	<i>k</i> : 1.15 h ⁻¹ <i>b</i>	<i>k</i> : 0.74 h ⁻¹ <i>c</i>	<i>k</i> : 0.70 h ⁻¹ <i>d</i>

Datos con igual letra indican diferencias no significativas según el test de Duncan ($P < 0,05$).

g: tiempo de generación, *K*: constante de crecimiento

Ambos ACB, *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, mostraron una reducción de la velocidad de crecimiento del 60% al 40% y del 38% al 30% en los medios SYB y LTPAB, respectivamente, a la a_w 0,99 en comparación con el medio MSB. La biomasa obtenida en los medios de cultivo SYB y LTPAB a la a_w 0,97 y 0,96, fue insuficiente para llevar a cabo el proceso de liofilización.

De acuerdo a los parámetros de crecimiento registrados, para la obtención de biomasa y posterior secado por liofilización, se descartaron los medios de cultivo SYB y LTPAB.

4.2. Sobrevivencia al proceso de liofilización

B. amyloliquefaciens y *M. oleovorans* fueron cultivados en los medios MSB y NYDB. Se seleccionó CINA como soluto para modificar la a_w de los medios de cultivo, dado que el glicerol no permitió la deshidratación de los cultivos durante el proceso de liofilización. Por otro lado, la adición de 10% de sacarosa a los medios de cultivo, incrementó la viabilidad celular y, por lo tanto, se agregó a todos los tratamientos.

El recuento de viables de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* antes y después del proceso de liofilización se muestra en las tablas II.4 y II.5.

Tabla II.4. Recuento de viables (log UFC/ml) de *B. amyloliquefaciens* antes y después del liofilizado en los medios NYDB y MSB.

a_w	NYDB		MSB	
	Antes liofilizado	Después liofilizado	Antes liofilizado	Después liofilizado
0.99	F.E.	7.92 ± 0.46	F.E.	6.77 ± 0.74
0.98	F.E.	4.30 ± 0.99	F.E.	7.54 ± 1.31
0.97	11.82 ± 0.18	3.38 ± 0.12	F.E.	5.08 ± 0.87
0.96	11.27 ± 0.62	3.34 ± 0.49	F.E.	4.23 ± 0.00

F.E.: fase estacionaria. Datos: media ± DS

Tabla II.5. Recuento de viables (log UFC/ml) de *M. oleovorans* antes y después del liofilizado en los medios NYDB y MSB.

a_w	NYDB		MSB	
	Antes liofilizado	Después liofilizado	Antes liofilizado	Después liofilizado
0.99	F.E.	8.59 ± 1.84	F.E.	8.81 ± 0.91
0.98	F.E.	10.85 ± 0.63	F.E.	8.82 ± 0.09
0.97	F.E.	9.75 ± 2.41	F.E.	7.69 ± 0.55
0.96	7.42 ± 0.09	-	F.E.	7.24 ± 0.10

F.E.: fase estacionaria. Datos: media ± DS. (-): sin recuento de viables.

Se observaron importantes diferencias en los recuentos viables antes y después de la liofilización. *B. amyloliquefaciens* mostró una mejor tolerancia al liofilizado cuando se cultivó en el medio MSB a las a_w 0,98; 0,97 y 0,96; mientras que *M. oleovorans* mostró mejor supervivencia después de la liofilización cuando se cultivó en el medio NYDB a las a_w 0,99; 0,98 y 0,97. No se observó supervivencia en el medio NYDB a la a_w 0,96. La mayor viabilidad de *B. amyloliquefaciens* luego del proceso de liofilizado se observó a la a_w 0,99 en el medio NYDB, con 7,92 log UFC/ml, mientras que en el medio MSB la mayor viabilidad fue a la a_w 0,98 con 7,54 log UFC/ml.

M. oleovorans mostró la mayor viabilidad celular luego de la liofilización a la a_w 0,98 en ambos medios de cultivo, con recuentos de 10,85 log UFC/ml en el medio NYDB y 8,82 log UFC/ml en el medio MSB.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el medio de cultivo MSB, a base de melaza (20 g/l) y polvo de soja (10 g/l), permitió producir inóculos con importante cantidad de biomasa y rápido crecimiento celular. La melaza utilizada en el medio contiene aproximadamente el 50% de sacarosa (Imrie, 1969) y, de acuerdo con Costa y col. (2001) esa alta concentración de sacarosa puede explicar la significativa producción de biomasa. El bajo costo de la melaza es un punto importante a destacar, dado que es una ventaja económica en el proceso de formulación de los ACB, y ha sido ampliamente utilizada en la producción de los mismos (Reed y Nagodawithana, 1991). El segundo componente, el polvo de soja, contiene más del 40% de proteínas, el 56-60% de carbohidratos y el 2% de grasa (Wickramanayake, 1987) y, por lo tanto, es una buena fuente de nitrógeno y carbono (Navaratnam y col., 1996). Además, las grasas insaturadas pueden mejorar la producción y secreción de enzimas microbianas, como también aumentar la fluidez de la membrana (Nicholas y col., 1985; Mishra, 1989).

Los formulados liofilizados otorgan numerosas ventajas que favorecen su aplicación en la formulación de productos de biocontrol, tal como otorgar mayor protección contra la contaminación o infestación durante el proceso de almacenamiento, mantener mayor viabilidad celular y facilitar la distribución del producto (Smith y Onions, 1983). Existen numerosos formulados comerciales liofilizados como el producto de Bio-save 10 y 11, un producto liofilizado de *Pseudomonas syringae*. El formulado liofilizado del ACB *Pantoea agglomerans* ha demostrado un 100% de viabilidad al ser rehidratado en un medio con el 10% de leche descremada (Costa y col., 2000). Por otro lado, existen

numerosos estudios que analizan la posibilidad de desarrollar formulados liofilizados, como los realizados por Abadías y col., (2001), quienes observaron una alta viabilidad de las células de *Candida sake* en un formulado liofilizado, pero su eficacia como biocontrolador fue menor y la viabilidad disminuyó después de 2 meses; o estudios sobre los conidios del hongo de biocontrol *Epicoccum nigrum*, los que mantuvieron el 100% de viabilidad luego de la liofilización utilizando leche descremada como aditivo de protección (Larena y col., 2003).

Como hemos visto en el Capítulo I, la supervivencia de los ACB bajo las condiciones de campo se pueden mejorar mediante el uso de estrategias fisiológicas (Cañamás y col., 2008). Los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* demostraron ser más tolerantes al estrés osmótico iónico y no iónico que al estrés mátrico (Sartori y col., 2010), y además ambos ACB acumularon glicina-betaína y ectoína en respuesta a condiciones de alta osmolaridad, lo cual podría incrementar el potencial de control biológico de *F. verticillioides* (Sartori y col., 2012a) además, tal como lo demostró Louis y col. (1994) es necesario destacar que dichos solutos compatibles estabilizan las células durante el proceso de secado, por aire o liofilizado.

B. amyloliquefaciens demostró mejor tolerancia a la baja a_w y mejor supervivencia al estrés por calor, cuando se cultivó en medios líquidos modificados con glicerol (Sartori y col., 2010). En este estudio, la a_w de los medios de cultivo se modificó con ClNa y glicerol, con el objetivo de obtener células osmóticamente adaptadas y una mayor viabilidad luego del secado por liofilizado, pero justamente, en el proceso de liofilización no se obtuvieron buenos resultados en medios en los que la a_w se modificó con glicerol, debido al alto punto de evaporación y alta higroscopicidad del mismo, y por lo tanto el producto obtenido resultó ser muy viscoso. Por ello se eligió al soluto osmótico ClNa para modificar la a_w de los medios de cultivo.

El formulado obtenido de *B. amyloliquefaciens* mostró la mayor viabilidad después del proceso de liofilización en el medio MSB a la a_w 0,98; mientras que *M. oleovorans* mostró buena viabilidad en el medio de MSB en todas las a_w ensayadas; con lo cual podemos concluir que el medio de cultivo a base de melaza y polvo de soja, permitió la mayor producción de biomasa de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, y mantener alta viabilidad y buen rendimiento luego del proceso de liofilización. Estos resultados tienen importantes implicaciones a fin de optimizar el proceso de formulación de los ACB de *F. verticillioides*, y obtener productos eficaces y efectivos bajo las distintas condiciones de estrés ambiental.

Capítulo III

Incorporación Del Biofungicida A La Semilla. Estudio De Invernadero.

1. Introducción

La producción de un buen formulado es un punto decisivo que permite mejorar la eficacia y extender la vida útil del producto, facilitando el almacenamiento durante mayor tiempo para la comercialización (Janisiewicz y Jeffers, 1997). La aplicación de dicho formulado sobre las semillas o pelleteado, conduce al proceso denominado bacterización, el cual es el modo más confiable de aplicar un ACB en estrecha proximidad con la semilla y la plántula emergente (Kommedahl y Widels, 1981; Paulitz, 1992). Ha sido ampliamente investigada la bacterización de las semillas con bacterias endófitas y su papel en la inducción de mecanismos de defensa contra patógenos (Bardin y Huang, 2003; Sapak, 2008; Siddiqui y Meon, 2009), en dicho proceso se recubren las semillas con suspensiones sólidas o líquidas, con el inóculo disuelto o suspendido en sólidos, se forma una capa que recubre la semilla, la cual no debe inhibir la germinación ni el establecimiento de la plántula en el suelo (Scott, 1989).

El proceso de bacterización, implica el uso de adhesivos o stickers, los cuales permiten adherir el formulado a la superficie de la semilla. Realizar el proceso de bacterización de la semilla sin la incorporación de un adhesivo, por ejemplo con agua, puede conducir a la formación de capas frágiles, que se agrietan fácilmente provocando el desprendimiento del polvo y, consecuentemente, la pérdida de inóculo (Scott, 1989).

En cuanto a los adhesivos, es importante tener en cuenta la capacidad de adhesión del formulado a la semilla, y los efectos que pudieran causar en la misma y en el suelo, descartando adhesivos propensos a causar una aglomeración de semillas, lo cual es indeseable en el proceso de bacterización y/o siembra. Es importante tener en cuenta que el grado de atracción o repulsión de humedad que manifieste la cubierta de una semilla pelleteada, afecta de manera significativa la germinación de la misma (Miller y Bensin, 1974; Scott, 1989). Un adhesivo óptimo es aquel que tiene la capacidad de mantener afinidad tanto con la semilla como con el formulado. Los adhesivos normalmente utilizados, son compuestos orgánicos e inorgánicos, como la metilcelulosa, gelatina, dextran, goma arábica, alginato de sodio, derivados del polietileno y caseína (Scott, 1989; Taylor y Harman, 1990). Muchos autores destacan la

metilcelulosa, la goma arábica o la mezcla de ambas, como los mejores adhesivos (Musson y col., 1995; Bardin y Huang, 2003). En la práctica, la metilcelulosa es uno de los adhesivos más utilizado, debido a la facilidad de manejo y aplicación, disponibilidad, gran capacidad de adhesión, bajo costo y bajo volumen (3% w/v) comparado con la goma arábica (mayor al 45% w/v) (Scott, 1989).

Un buen adhesivo es esencial para que un formulado de biocontrol se adhiera a la semilla, incrementando su actividad y favoreciendo el control del patógeno. Incluso algunos aditivos que se aplican como adhesivos, también pueden aportar propiedades antifúngicas, como lo han demostrado El-Ghaouth y col. (2000, 2001) al desarrollar un producto de biocontrol denominado “recubrimiento bioactivo”, el cual consiste en una combinación única de un microorganismo antagonista (*Candida saitoana*) con el adhesivo glicol-quitosa, un quitosano modificado químicamente. La bacterización de la semilla con el recubrimiento bioactivo permite explotar las propiedades antifúngicas del glicol-quitosa más la actividad biológica antifúngica del antagonista. En otros estudios realizados por Siddiqui y Meon (2009) se demostró que la bacterización de las semillas de pimiento con el endófito antagonista *Pseudomonas aeruginosa* y el ácido algínico como adhesivo, es un método de aplicación del ACB que favorece la colonización y proliferación del mismo, reduciendo la podredumbre en pre y post emergencia causada por *Sclerotium rolfsii*, sin afectar la germinación de las semillas ni el establecimiento de las plántulas. También se han desarrollado sistemas de bacterización efectivos como el denominado “Pelgel-Pelinoc”, propiedad de la compañía Nitragin, en el cual se realiza la bacterización de las semillas utilizando un adhesivo nutritivo a base de goma arábica, llamado pelgel, y el inóculo seco en turba (50 g/kg semilla) llamado pelinoc. Este sistema proporciona una alta densidad de rizobios en la semilla y en el suelo, incluso los mantiene viables en suelos bajo condiciones desfavorables (Jones y col., 1978).

Para lograr el éxito del formulado biofungicida, es necesario desarrollar un sistema de bacterización eficiente, que se adapte a las prácticas convencionales de siembra y logre mantener la viabilidad y eficacia de los ACB a lo largo del crecimiento del cultivo de maíz, por ello es de suma importancia que los microorganismos antagonistas sean tolerantes y capaces de adaptarse a las condiciones climáticas del campo, como también que sean compatibles con los diferentes aditivos que se incorporen en el proceso de formulación y/o bacterización.

2. Objetivo

Buscar una alternativa para la incorporación del biofungicida a la semilla.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Determinar la eficiencia de cuatro adhesivos en la bacterización de las semillas de maíz con formulados sólidos y líquidos, determinando la viabilidad de los ACB en semillas pelleteadas.

2.1.2. Determinar el efecto de los adhesivos en la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas.

3. Metodología

3.1. Bacterización de las semillas

La producción de los formulados se realizó de acuerdo a las condiciones seleccionadas previamente, el medio de cultivo MSB [melaza (20 g L⁻¹) + polvo de soja (10 g L⁻¹)] con a_w modificada con ClNa, liofilizados y líquidos (Sartori y col., 2012b). Para adherir el formulado de ambos ACB a la semilla, se probaron cuatro adhesivos:

- Carboxi metil celulosa (CMC) de calidad industrial al 1 % (“Ranquel”).
- Melaza (ME) de calidad alimentaria al 10% (“Medio siglo”).
- Aceite de parafina (AP) de calidad industrial al 2% (“Ranquel”).
- Goma arábica (GA) de calidad industrial al 5% (“Ranquel”).

3.1.1 Bacterización con formulado liofilizado

Para todos los ensayos *in vitro*, se utilizó la simiente Dekalb 747 MGRR2 (Anexo I). Se colocaron las semillas en bolsas plásticas, se incorporó la solución de cada adhesivo (1ml/100 semillas) y el peso correspondiente a una concentración de 1 x 10⁹ UFC/g de polvo liofilizado. Las bolsas se agitaron durante 5 minutos y para el secado de las semillas, se colocaron sobre un film a temperatura ambiente durante toda la noche. A las 24 h se determinó la viabilidad de los ACB, se colocaron 5 semillas pelleteadas de cada tratamiento en 5 ml de agua estéril, se agitó en vórtex, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 0,1 ml de las diluciones en placas de Petri con agar nutritivo (Bardin y Huang, 2003).

3.1.2 Bacterización con formulado líquido de células frescas

Se colocaron las semillas en bolsas plásticas, se incorporó la solución de adhesivo (1ml/100 semillas) + 10 ml de inóculo de células frescas del ACB, a los que previamente se les determinó las UFC/ml. Las bolsas se agitaron durante 5 minutos, las semillas se secaron a temperatura ambiente sobre un film y luego se determinaron las UFC/ semilla igual a lo descripto con el formulado liofilizado.

3.1.3. Viabilidad de los ACB en semillas pelleteadas

Se determinó la viabilidad de ambos ACB en semillas pelleteadas con inóculo liofilizado y con células frescas, durante tres semanas consecutivas. Las semillas de cada tratamiento, se mantuvieron en bolsas plásticas a temperatura ambiente. Se colocaron 5 semillas pelleteadas de cada tratamiento en 5 ml de agua estéril, se agitó en vórtex, se realizaron diluciones seriadas y se sembró 0,1 ml en placas de Petri con agar nutritivo (Bardin y Huang, 2003). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h, luego se determinaron las UFC/semilla.

3.2. *Efecto de los formulados y adhesivos en la semilla*

Se determinó el efecto de los tratamientos y adhesivos sobre la germinación de las semillas de maíz en macetas con suelo.

3.2.1. Germinación en macetas

Se sembraron 10 semillas pelleteadas, con formulado liofilizado y con formulado de células frescas, por maceta, conteniendo tierra húmeda. La bacterización de las semillas se realizó 24 h previas a la siembra. Las macetas se mantuvieron en invernadero y se regaron con agua. A los siete días se retiraron las plántulas de cada maceta y se determinaron los siguientes parámetros agronómicos en cada una: largo de la raíz principal, largo de la parte aérea (cm), peso total y peso de la raíz (g). Se determinó el índice de estrés S/R: peso parte aérea (g) / peso sistema radical (g), como indicador de estrés en la planta, considerando que cuanto menor es la relación S/R, mayor es el estrés sufrido por la planta (Kozdrój y col., 2004).

3.2.2. Germinación en macetas con *F. verticillioides*

A partir de un cultivo de 7 días de incubación en el medio de esporulación Capellini-Peterson (Capellini y Peterson, 1965) se obtuvo una suspensión de esporas de *F.*

verticillioides, con una concentración de $2,1 \times 10^7$ esporas ml^{-1} , 100 μl de tal suspensión se adicionaron a semillas previamente bacterizadas con el formulado liofilizado y con el formulado líquido.

Se sembraron 10 semillas por maceta con tierra húmeda, por cada tratamiento. Las macetas se mantuvieron en invernadero y se regaron con agua. A los siete días se retiraron las plántulas de cada maceta y se determinaron los parámetros agronómicos como se describió en el punto 3.2.1.

3.2.3. Análisis estadístico

Se compararon los parámetros de crecimiento y el índice S/R mediante el análisis de la varianza. Para establecer diferencias significativas de los parámetros de crecimiento, las medias se separaron por el test de rangos múltiples de Duncan ($P < 0,05$). Mientras que para establecer diferencias significativas en el índice de estrés S/R, las medias se separaron por el test DGC ($\alpha=0,05$).

4. Resultados

4.1 *Efecto de los adhesivos en la supervivencia de los ACB en las semillas*

Las semillas de maíz inoculadas con ambos formulados, liofilizados y líquidos, tratadas por separado con los cuatro adhesivos y almacenadas durante tres semanas a temperatura ambiente, mostraron diferencias en la viabilidad de los ACB. Como se observa en la tabla III.1, el análisis estadístico de semillas pelleteadas con formulados liofilizados, demostró que el aceite de parafina registró la mayor media de ambos ACB, diferenciándose significativamente del resto de los adhesivos (test DGC, $\alpha=0,05$). En cuanto a la actividad acuosa, el menor valor ensayado (0,96) mostró la mayor sobrevivencia en las semillas pelleteadas con ambos ACB, la menor media se observó con a_w 0,99. Es importante destacar que el tiempo tuvo un efecto marcado con ambas cepas, a tiempo cero se observaron las mayores medias, decreciendo significativamente con el paso de los días.

Tabla III.1. Supervivencia luego de diferentes períodos de almacenamiento de semillas de maíz pelleteadas con formulados liofilizados a diferentes a_w y usando diferentes adhesivos.

B. amyloliquefaciens

<i>Adhesivo</i>	<i>Medias \pm EE</i>
AP	4,45 \pm 0,12 A
Metil	4,31 \pm 0,12 B
GA	4,30 \pm 0,12 B
ME	4,29 \pm 0,12 B

a_w	<i>Medias ± EE</i>	
0,96	4,59 ± 0,12	A
0,98	4,53 ± 0,12	A
0,97	4,52 ± 0,12	A
0,99	3,70 ± 0,12	B

<i>Tiempo</i>	<i>Medias ± EE</i>	
0	4,94 ± 0,21	A
7	4,37 ± 0,21	B
14	4,06 ± 0,21	B
21	3,97 ± 0,21	B

M. oleovorans

<i>Adhesivo</i>	<i>Medias ± EE</i>	
AP	2,34 ± 0,22	A
Metil	2,33 ± 0,22	A
GA	1,80 ± 0,22	B
ME	1,26 ± 0,22	B

a_w	<i>Medias ± EE</i>	
0,96	3,38 ± 0,22	A
0,97	2,81 ± 0,22	A
0,98	1,00 ± 0,22	B
0,99	0,54 ± 0,22	B

<i>Tiempo</i>	<i>Medias</i>	
0	2,87 ± 0,22	A
7	2,08 ± 0,22	B
14	1,73 ± 0,22	B
21	1,05 ± 0,22	C

EE: error estándar. Datos con la misma letra para diferentes tratamientos no significa diferencias significativas de acuerdo al test DGC (alfa=0,05).

Las semillas pelleteadas con formulado liofilizado mostraron mayor supervivencia de *B. amyloliquefaciens* en comparación con *M. oleovorans*. Los mayores recuentos de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, se obtuvieron con el formulado liofilizado a la a_w 0,97 y 0,96 y AP al 2% como adhesivo (fig. III.1.). El AP fue el único adhesivo, de los utilizados, que permitió mantener la viabilidad de los ACB luego de tres semanas. Con los formulados liofilizados se observó mayor sobrevivencia de *B. amyloliquefaciens* luego de 24 h, 7, 14 y 21 días de almacenamiento, principalmente en los tratamientos con baja a_w . Los formulados liofilizados de *M. oleovorans*, a las cuatro a_w , mostraron mayor viabilidad a las 24 h de la bacterización, mientras que a los 21 días solo se mantuvieron viables aquellas células crecidas a las a_w 0,97 y 0,96.

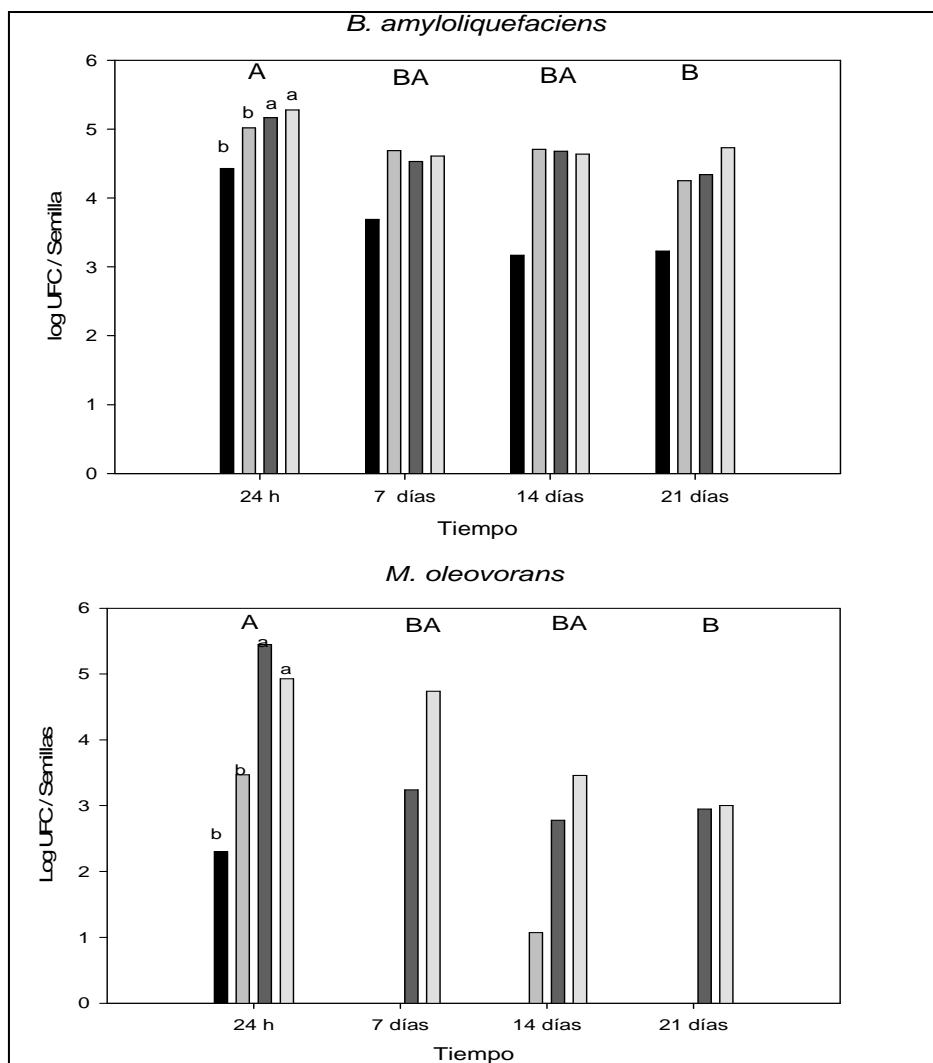


Fig. III.1. Supervivencia de los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en semillas pelleteadas con formulado liofilizado a diferentes a_w (0,99 ■ ; 0,98 ■ ; 0,97 ■ y 0,96 □) y adhesivo aceite de parafina al 2%, después del almacenamiento (24 h, 1, 2 y 3 semanas) a temperatura ambiente. El análisis estadístico se realizó entre diferentes a_w , a igual tiempo de almacenamiento y entre los distintos tiempos de almacenamiento para todas las a_w . Datos con la misma letra minúscula para diferentes a_w en un mismo tiempo, no significa diferencias significativas; y datos con la misma letra mayúscula para diferentes tiempos, no indica diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0,05$).

B. amyloliquefaciens mostró mayor viabilidad durante los cuatro tiempos de muestreo, cuando el formulado se obtuvo a las menores a_w (0,98; 0,97 y 0,96). Mientras que los formulados liofilizados de *M. oleovorans* a las cuatro a_w mostraron mayor viabilidad a las 24 h de bacterización. A los 7, 14 y 21 días de almacenamiento se encontraron viables en las semillas los formulados obtenidos a las a_w 0,97 y 0,96.

La supervivencia de los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en medios de cultivo acondicionados a las a_w 0,97 y 0,96 en formulados líquidos, en relación al tiempo de almacenamiento de semillas pelleteadas con aceite de parafina al 2%, se muestra en la fig. III.2.

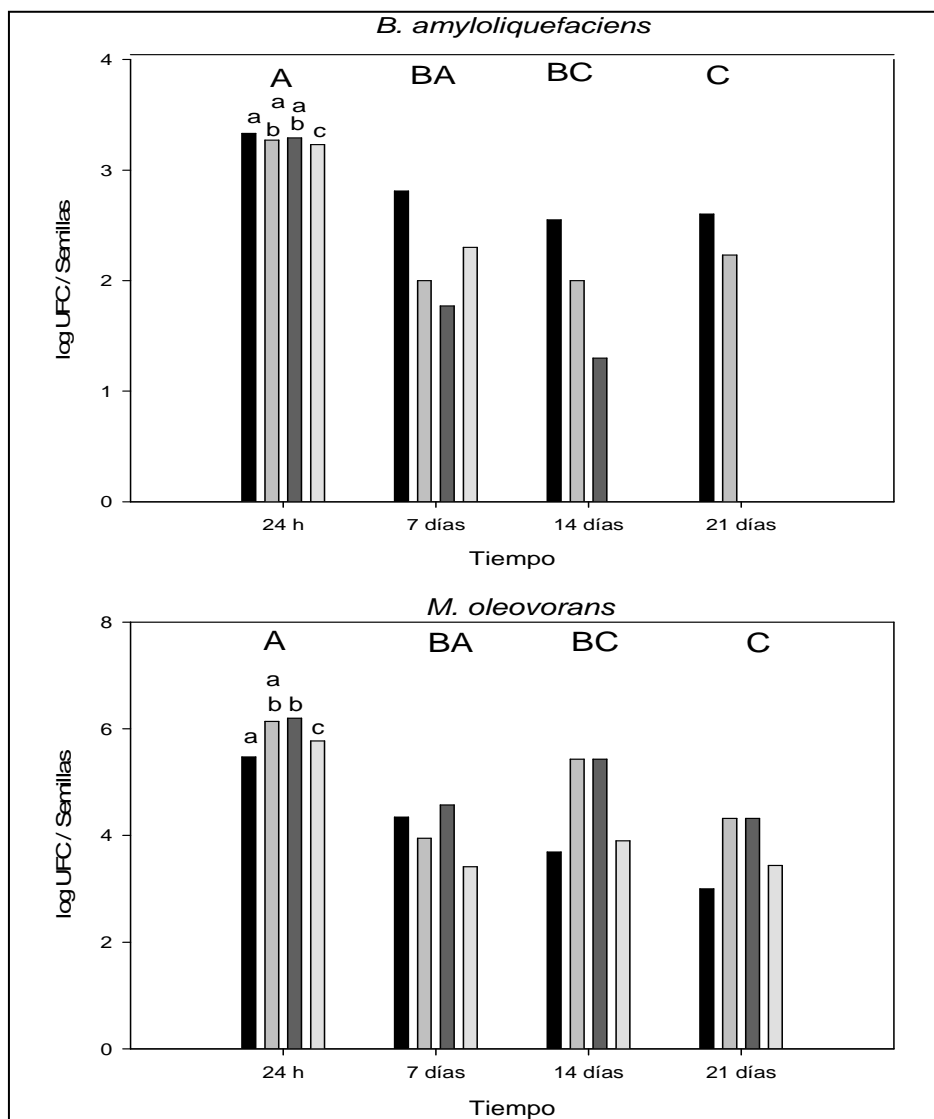


Fig. III.2. Supervivencia de los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en semillas pelleteadas con formulado líquido a diferentes a_w (0,99 ■ ; 0,98 ▒ ; 0,97 ▓ y 0,96 □) y adhesivo aceite de parafina al 2%, después del almacenamiento (24 h, 1, 2 y 3 semanas) a temperatura ambiente. El análisis estadístico se realizó entre las diferentes a_w , a igual tiempo de almacenamiento y entre los distintos tiempos de almacenamiento para todas las a_w . Datos con la misma letra minúscula para diferentes a_w en un mismo tiempo, indica diferencias no significativas; y datos con la misma letra mayúscula para diferentes tiempos, no indica diferencias de acuerdo al test de Duncan ($p < 0,05$).

En general, se observó mejor supervivencia de *M. oleovorans* durante 21 días de almacenamiento en comparación con *B. amyloliquefaciens*. La viabilidad de *B. amyloliquefaciens* no fue superior a 3 log UFC/g de semilla. Mientras que para *M. oleovorans* fue de aproximadamente 6 log UFC/g de semilla luego de 24 h de almacenamiento. No se observaron diferencias significativas en el recuento de UFC de *M. oleovorans* entre las a_w 0,98 y 0,97 a las 24 h, el mismo efecto se observó para *B. amyloliquefaciens*.

Por lo tanto, en la bacterización y almacenamiento de semillas pelleteadas, para el ACB *B. amyloliquefaciens* el formulado liofilizado y AP al 2% como adhesivo fue el más

eficaz, mientras que para *M. oleovorans* fue más eficaz el formulado líquido con el mismo adhesivo. La fig. III.3 muestra semillas pelleteadas con los ACB previo a la siembra.

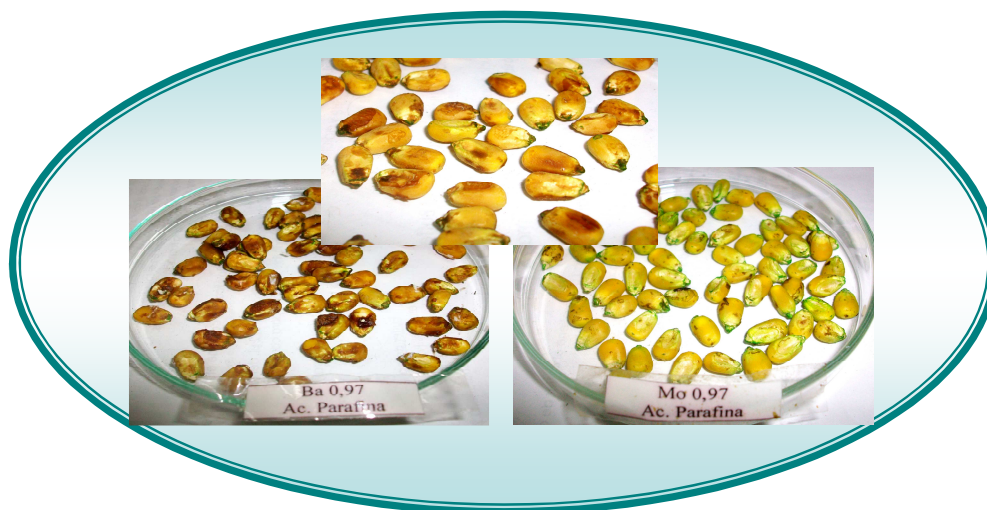


Fig. III.3. Semillas bacterizadas con formulados liofilizados de los ACB *B. amyloliquefaciens* (Ba) y *M. oleovorans* (Mo), y aceite de parafina como adhesivo.

4.2 Efecto de los tratamientos sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas

En base al índice de estrés S/R se observaron diferencias en el crecimiento de las plántulas provenientes de semillas bacterizadas con formulados líquidos y liofilizados. El análisis estadístico de los efectos de los ACB, a_w , adhesivos y sus interacciones sobre el índice S/R mostró diferencias significativas, siendo los ACB quienes causaron el mayor efecto ($F= 90,44; p < 0,0001$).

La tabla III.2 expone el efecto de los diferentes formulados liofilizados y los adhesivos sobre el crecimiento de las plántulas. Las plántulas de maíz provenientes de semillas sin tratar (sin ACB y sin adhesivos) mostraron el mayor índice S/R (0,566), y mostraron diferencias estadísticamente significativas, con respecto al índice obtenido de las plántulas desarrolladas a partir de semillas tratadas con cada adhesivo y sin los ACB. El mayor estrés se observó en el tratamiento con carboximetilcelulosa y el menor con aceite de parafina. También se observan diferencias al comparar el tratamiento de maíz (sin ACB y sin adhesivos) con las semillas bacterizadas con los inóculos de los ACB obtenidos en medios de cultivo a las distintas actividades agua y sin el agregado de los adhesivos. Es decir que la inoculación con los ACB solos también provocaron un estrés, aunque leve, en el crecimiento de las plántulas. Los tratamientos con los inóculos de *B. amyloliquefaciens* producidos a las a_w 0,97 y 0,96 y adheridos con AP mostraron diferencias significativas con el tratamiento de bacterización sin adhesivos, a las mismas

a_w . Mientras que no se observó estrés cuando estos mismos inóculos fueron adheridos con melaza.

Tabla III.2. Efecto de los diferentes tratamientos con formulados liofilizados sobre el índice S/R.

	Tratamientos					
	Maíz	Maíz + ACB sin adhesivo ^a	Maíz + CMC	Maíz + AP	Maíz + GA	Maíz + ME
	0.566	-	0.374 *	0.440 *	0.407 *	0.419 *
<i>B. amyloliquefaciens</i> a_w	Maíz + ACB sin adhesivo ^a A	Maíz + ACB + CMC B	Maíz + ACB + AP C	Maíz + ACB + GA BA	Maíz + ACB + ME BA	
	0.99	0.448 ba	0.467 ba	0.410 b	0.486 a	0.441 ba
	0.98	0.462 a	0.405 a	0.419 a	0.446 a	0.414 a
	0.97	0.468 a	0.412 ba	0.244 c	0.370 b	0.485 a
	0.96	0.415 a	0.349 ba	0.240 b	0.353 a	0.426 a
<i>M. oleovorans</i> a_w	Maíz + ACB sin adhesivo ^a A	Maíz + ACB + CMC BAC	Maíz + ACB + AP BA	Maíz + ACB + GA C	Maíz + ACB + ME BC	
	0.99	0.488 a	0.525 a	0.508 a	0.346 b	0.517 a
	0.98	0.453 a	0.357 b	0.435 ba	0.454 a	0.416 ba
	0.97	0.490 a	0.411 a	0.427 a	0.448 a	0.403 a
	0.96	0.470 a	0.483 a	0.489 a	0.448 ba	0.404 b

Cada valor representa la media de 10 semillas por tratamiento con tres replicas.

CMC (carboximetilcelulosa), AP (aceite de parafina), GA (goma arábica), ME (melaza).

^a Semillas bacterizadas con los agentes de control biológico (ACB) suspendidos en agua y sin adhesivo.

* Diferencias significativas entre el tratamiento de maíz y maíz con adhesivos.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias entre ^a y el maíz tratado con adhesivos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas para cada tratamiento a diferentes a_w . De acuerdo al test de Duncan ($p < 0,001$).

Cuando se evaluó la bacterización de los inóculos de *M. oleovorans* producidos a las a_w 0,97 y 0,96 y adheridos con aceite de parafina, no se observó diferencia significativa al compararlos con los tratamientos de los mismos inóculos pero sin adhesivos. En general se observó un menor estrés en todos los tratamientos en los que se usó *M. oleovorans*.

La tabla III.3 expone el efecto de la bacterización con el formulado líquido a diferentes a_w y los cuatro adhesivos, sobre el índice S/R. Sólo el adhesivo AP mostró diferencias significativas en comparación con las semillas de maíz sin tratar.

Tabla III.3. Efecto de los diferentes tratamientos con formulados líquidos sobre el índice S/R

	Tratamientos					
	Maíz	Maíz + ACB sin adhesivo ^a	Maíz + CMC	Maíz + AP	Maíz + GA	Maíz + ME
	0.439	-	0.422	0.244 *	0.447	0.430
<i>B. amyloliquefaciens</i> a_w		Maíz + ACB sin adhesivo ^a	Maíz + ACB + CMC	Maíz + ACB + AP	Maíz + ACB + GA	Maíz + ACB + ME
	0.99	A	C	D	B	C
		0.474 a	0.373 b	0.285 c	0.382 b	0.355 b
	0.98	0.470 a	0.438 a	0.381 b	0.485 a	0.355 b
	0.97	0.436 a	0.352 c	0.361 bc	0.410 bac	0.440 a
	0.96	0.421 a	0.328 bc	0.272 c	0.360 b	0.370 ba
<i>M. oleovorans</i> a_w		Maíz + ACB sin adhesivo ^a	Maíz + ACB + CMC	Maíz + ACB + AP	Maíz + ACB + GA	Maíz + ACB + ME
	0.99	A	C	CB	B	B
		0.488 a	0.353 b	0.389 b	0.412 b	0.413 b
	0.98	0.490 a	0.374 b	0.380 b	0.432 ba	0.381 b
	0.97	0.466 a	0.325 c	0.413 ba	0.381 bc	0.471 a
	0.96	0.483 a	0.351 cb	0.345 c	0.414 b	0.385 cb

Cada valor representa la media de 10 semillas por tratamiento con tres replicas.

CMC (carboximetilcelulosa), AP (aceite de parafina), GA (goma arábica), ME (melaza).

^a Semillas bacterizadas con los agentes de control biológico (ACB) suspendidos en agua y sin adhesivo.

* Diferencias significativas entre el tratamiento de maíz y maíz con adhesivos.

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias entre ^a y el maíz tratado con adhesivos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas para cada tratamiento a diferentes a_w . De acuerdo al test de Duncan ($p < 0,001$).

Al comparar el índice de estrés S/R que causan los formulados líquidos de ambos ACB con los diferentes adhesivos y el tratamiento control de las semillas de maíz, se observan diferencias significativas. Para *M. oleovorans* las diferencias son significativas para todas las células independiente de las a_w , se destaca que a la a_w 0,97 no existen diferencias entre las semillas bacterizadas sin adhesivo y las bacterizadas con los adhesivos AP y ME, mientras que para *B. amyloliquefaciens* las diferencias son menores a medida que la a_w del medio de desarrollo decrece con los diferentes adhesivos, como con AP o CMC. El menor índice se observó con el formulado de *B. amyloliquefaciens* a la a_w 0,96 adherido con AP y para *M. oleovorans* con el formulado a la a_w 0,97 y el adhesivo CMC.

5. Discusión

Se demostró a nivel de invernadero la posibilidad de uso de adhesivos en la bacterización de las semillas y su impacto sobre la germinación y parámetros agronómicos de la plántula de maíz. La bacterización de las semillas es un modo eficaz de aplicar ACB, favoreciendo la colonización y proliferación de endófitos antagonistas y es además, una alternativa saludable con el medio ambiente, en contraste con la aplicación de productos químicos (Siddiqui y Meón, 2009).

La mayor viabilidad de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* se obtuvo en semillas pelleteadas con el formulado liofilizado a las a_w 0,97 y 0,96 y AP al 2% como adhesivo. Cabe destacar que el número de células de los ACB en las semillas recubiertas no se incrementó, siendo el recuento a las 24 h, tanto con formulado liofilizado como con formulado líquido, menor que el inicial (10^9 células/ml). Por otro lado, el número de células viables de ambos ACB disminuyó en el período de almacenamiento de 21 días, siendo de 5 log UFC/g de semilla para *B. amyloliquefaciens* y de 4 log UFC/g de semilla para *M. oleovorans*. Dichos valores coinciden con estudios realizados anteriormente por Pereira y col. (2009), en los cuales se determinó el tamaño de las poblaciones de ambos ACB en el momento de la siembra, con valores de 5 log UFC/g de semilla. Otros estudios sobre inoculantes bacterianos eficaces han determinado que en el suelo la densidad de la población bacteriana se reduce a 3 o 4 log UFC/g de suelo y se mantiene en ese nivel (Dejonghe y col., 2001). La supervivencia de inoculantes en suelo ha sido descrita por Vandepitte y col. (1995) y Scher y col. (1994), quienes definen como colonizadores de las raíces del maíz aquellas bacterias que alcanzan valores de 3,7 log UFC/g de raíz o más. Por ello es importante destacar que el éxito de un formulado bacteriano que se introduce en el suelo junto a la semilla, esta directamente relacionado con la supervivencia de la cepa antagonista en la rizósfera (Kozdrój y col., 2004). Dicha supervivencia, a su vez esta directamente relacionada con la adaptación fisiológica de las células a condiciones desfavorables durante el proceso de formulación, la cual mejora la tolerancia al estrés acuoso y térmico del medio ambiente de la rizósfera (Deacon, 1991; Teixidó y col., 1998; Abadías y col., 2001).

Se concluyó que ninguno de los adhesivos probados afectó la germinación de las semillas de maíz. En el ensayo realizado, el 100% de las semillas de maíz de todos los tratamientos germinaron, coincidiendo con estudios que han evidenciado que adhesivos como PVA 10% (polivinil alcohol), CAR 0.5% (carragenina), MC 1% (metilcelulosa) y

ALG 1% (ácido algínico) no son tóxicos, ni afectan la germinación de semillas de remolacha (Bardin y Huang, 2003).

Nuestros resultados mostraron que las semillas pelleteadas con formulado liofilizado de *B. amyloliquefaciens* y AP como adhesivo, tuvieron mayor viabilidad durante tres semanas, a diferencia de *M. oleovorans* que mostró mayor viabilidad en tres semanas en semillas pelleteadas con formulado líquido. Estos resultados podrían explicarse por la capacidad del género *Bacillus* de esporular. En general, se obtuvo alta viabilidad luego de tres semanas de almacenamiento, en semillas pelleteadas con formulados liofilizados con las a_w 0,97 y 0,96; quizás esto podría deberse a la adaptación fisiológica que ambas bacterias sufrieron en su etapa de producción de células anterior a la formulación (Sartori y col., 2010).

En investigaciones previas, Pereira y col. (2009) determinaron que las plantas de maíz obtenidas a partir de semillas inoculadas con *F. verticillioides* (10^7 esporas/ml) y con los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, crecieron sin signos ni síntomas de enfermedad a los 20 días de cultivo bajo condiciones de invernadero. En este estudio se observó el mismo comportamiento en plántulas de 7 días de todos los tratamientos, no sin detectarse ninguna alteración sobre los parámetros de crecimiento, ni ningún signo de enfermedad, con lo cual se confirma, que los ACB evaluados no ejercieron ningún efecto sobre el normal crecimiento de las plántulas. Contrariamente otros ACB utilizados en semillas de maíz, como *Pseudomonas*, produjeron una reducción significativa del crecimiento de las plántulas (Kozdrój y col., 2004).

Los ACB y los adhesivos utilizados en el proceso de bacterización de las semillas, son factores que pueden generar estrés en la planta, causando una reducción de la relación tallo y raíz (S/R). A partir de ello el índice S/R se utiliza como un indicador de estrés en la plántula, considerando que cuanto menor es la relación S/R, mayor es el estrés (Kozdrój y col., 2004). En este ensayo realizado in situ en macetas, el estrés para las plántulas de maíz estuvo representado principalmente por los adhesivos, que produjeron el mayor efecto, y por la a_w del medio de producción de los formulados. En general, no se observaron variaciones en el índice S/R en respuesta a la adición de AP como adhesivo.

Los resultados obtenidos demuestran que la bacterización de las semillas con formulados liofilizados de ambos ACB a la a_w 0,97 y el adhesivo AP al 2%, es un proceso que facilita la aplicación a nivel de campo, dado que el adhesivo seleccionado

posee una viscosidad adecuada, que permite obtener un pelleteado uniforme y mantener la viabilidad de los ACB durante el almacenamiento de las semillas previo a la siembra.

Capítulo IV

Ensayo A Campo Con Semillas Bacterizadas Con Formulado Liofilizado Y Agua Como Adhesivo

1. Introducción

La inoculación de semillas, plántulas o suelos con ACB bacterianos puede conducir a alteraciones drásticas en la estructura y actividad de la comunidad nativa. El estudio de tales parámetros es necesario para garantizar una aplicación segura de los agentes en un determinado ambiente (Kozdrój y col., 2004). Por otro lado la aplicación exitosa de los ACB requiere del estudio de los distintos sistemas planta-patógeno-biocontrolador, este conocimiento permitirá dilucidar cómo, cuánto, cuándo y dónde será conveniente aplicarlos.

La rizósfera provee un complejo y dinámico microambiente, donde bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas, que afectan su fertilidad e intervienen en los ciclos de la materia, como en la mineralización de la materia orgánica, transformándola en nutrientes asimilables por plantas y compuestos de importancia geológica (carbón, petróleo, azufre), afectando tanto la salud y nutrición vegetal, como también la estructura y fertilidad de los suelos (Kirk y col., 2004). Suelos con alto contenido de materia orgánica se caracterizan por ser supresivos al desarrollo y a la actividad de diversos patógenos y nemátodos (Baker y Dunn, 1990), lo cual se fundamenta en la existencia de un amplio espectro de microorganismos, que de acuerdo al efecto que presenten sobre los vegetales se los puede clasificar como neutros, benéficos, deletéreos o patógenos (Kemmetz, 1998), que forman parte de un complejo sistema de interacciones que conforman la rizósfera, donde la competencia por las fuentes alimenticias y nichos entre predador - presa ayudan a limitar la población de microorganismos con potencial de plaga (Baker y Paulitz, 1996). Por lo tanto es relevante analizar el impacto de la aplicación de formulados de ACB sobre las poblaciones nativas presentes en la rizósfera.

A pesar de la complejidad del ambiente circundante en la rizósfera de las plantas, existen numerosas estrategias de control biológico, dirigidas a reducir patógenos resistentes y nemátodos parásitos (Alabouvette y col., 1985; Kerry, 1990; Kloepper y col., 1992; Sikora, 1992; Cook, 1993; Nelson y col., 1994), con mecanismos de acción

de los antagonistas como por ejemplo antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (parasitismo, lisis enzimática, predación), e inducción de resistencia del vegetal a la acción del patógeno, y mecanismos de acción indirecta, como la competencia por la fuente de nutrientes, (Cook y Baker, 1983). Todos estos mecanismos están directamente asociados a la ocupación del nicho en la rizósfera por los ACB (Lindermann, 1991), existiendo además una fuerte influencia de factores bióticos y abióticos que podrían dificultar la introducción y el efectivo establecimiento y control a largo plazo (Vilich y Sikora, 1998). Es por ello fundamental la manipulación de los agentes de biocontrol, con la finalidad de incrementar la sanidad de la raíz frente a una enfermedad particular, y mantener la actividad durante la producción del cultivo.

En diversos estudios se ha determinado que un formulado deshidratado es una de las mejores opciones para almacenar y transportar productos con agentes microbianos como compuestos activos (Rhodes, 1993). Por otro lado, la bacterización de las semillas se ha desarrollado como un proceso sencillo, capaz de integrarse fácilmente a los procesos de siembra con la maquinaria convencional utilizada habitualmente en el campo. También es un proceso que permite incorporar diferentes aditivos al momento de la siembra, ya sea con la finalidad de mejorar la estabilidad de las células bacterianas o su adherencia a las semillas (Muller y Berg, 2008). Por ello, creemos que la aplicación a las semillas de maíz del formulado desarrollado, previo a la siembra, es un proceso compatible con las técnicas agronómicas utilizadas, permitiendo un manejo normal de la semilla y un normal proceso de siembra en general.

2. Objetivo

Probar a campo la efectividad del formulado elaborado.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Evaluar la influencia de los diferentes tratamientos sobre los niveles poblacionales de *Fusarium* en la endorrizósfera de plántulas de maíz de 20 días de desarrollo.

2.1.2 Evaluar el impacto de los diferentes tratamientos bacterianos sobre distintos parámetros agronómicos del cultivo de maíz en crecimiento vegetativo y en madurez fisiológica.

2.1.3. Determinar los efectos de los formulados en plantas en madurez fisiológica, analizando el contenido de fumonisina B₁ y los niveles poblacionales de *F. verticillioides* en granos de maíz a cosecha.

2.1.4. Evaluar el impacto de la aplicación de diferentes formulados bacterianos sobre la actividad amonificante, nitrificante y celulolítica en el suelo no rizosférico.

3. Metodología

3.1. Bacterización de las semillas

El inóculo de los agentes de biocontrol se produjo en el medio MSB con a_w 0,97 modificada con ClNa (Dallyl y Fox, 1980). Posteriormente se liofilizó y se adhirió a las semillas (Dekalb 747 MGRR2 Anexo I). La bacterización se realizó previo a la siembra agregando agua al 1% y formulado en una concentración de 10^9 UFC/g de semillas. Las semillas se mezclaron por 5 minutos con el correspondiente tratamiento y se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

3.2. Inóculo fúngico

En los tratamientos con *F. verticillioides*, la inoculación se realizó en el laboratorio previo a la siembra, adicionando 2 ml / 400 semillas de un cultivo de la cepa *F. verticillioides* M7075 en el medio de esporulación Capellini – Peterson (Capellini y Peterson, 1965), con una concentración de 1×10^7 esporas ml⁻¹.

3.3. Área experimental, tratamientos y siembra

El ensayo se llevó a cabo en un campo experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, ubicado en frente de la misma (30°57'S latitud, 64°50'O longitud, 562 m altitud). El mismo está incluido en la región geomorfológica definida como "llanuras bien drenadas no medanosas", con suelo de textura franco arenosa (pH 6,1 en agua 1:1 P/V; 1.4% materia orgánica, 86 ppm de nitratos) (Kraus y col., 1999). Cada tratamiento se sembró en tres bloques aleatorios por triplicado, en parcelas de 7 x 3 m separadas por borduras de 1,5 m. En cada parcela se marcaron cuatro surcos a 0,5 m de distancia donde se sembraron 25 semillas, es decir un total de 100 semillas por parcela. La siembra se realizó el día 4 de diciembre de 2009 y luego de una semana se aplicó el herbicida glifosato en todo el ensayo, de acuerdo a las prácticas agrícolas comunes usadas para los cultivares Roundup Resistente (RR).

Tabla IV.1. Diseño del ensayo a campo, campaña de siembra 2009-2010.

Cabecera este T1					
T6	T1	T4	T2	T3	T5
T4	T5	T1	T6	T2	T3
T1	T2	T3	T4	T5	T6
Cabecera oeste T1					

Tratamientos:

- 1) Maíz control
- 2) Maíz + *B. amyloliquefaciens*
- 3) Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides*
- 4) Maíz + *M. oleovorans*
- 5) Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides*
- 6) Maíz + *F. verticillioides*

3.4. Registros pluviométricos y temperaturas

Los datos climáticos fueron registrados por la Estación ADCON Telemetry, propiedad de Aseagro y en Convenio de cooperación con la UNRC. La Estación ADCON se encuentra ubicada en el Campus de la UNRC, cerca del sitio donde se realizó el experimento, y cuenta con sensores de radiación, temperatura de aire, humedad relativa, velocidad y dirección del viento, y pluviometría. Se registraron las temperaturas mínimas y máximas diarias, y las precipitaciones acumuladas mensualmente durante todo el período de crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz en el campo.

3.5. Muestreo y procesamiento de muestras

3.5.1. Plántulas de 20 días

Se removieron 10 plántulas al azar de cada tratamiento; se colocaron en bolsas plásticas junto con el suelo adherido y se trasladaron al laboratorio para su análisis. Las bolsas se colocaron en un freezer a -20°C hasta su procesamiento. El muestreo se realizó el día 23 de diciembre de 2009.

3.5.1.1. Parámetros agronómicos

Se determinó en cada tratamiento el % de germinación, y en cada plántula los siguientes parámetros: longitud del tallo (mm), longitud de la raíz principal (mm) y número de hojas. Con los datos obtenidos se determinó el índice de estrés S/R el cual indica la relación peso (g) parte aérea/ peso (g) sistema radical (Kozdrój y col., 2004).

3.5.1.2. Aislamiento e identificación de especies del género *Fusarium* de la endorrizósfera

De cada tratamiento se tomaron al azar 3 raíces y se procedió a la desinfección de la superficie radical. Las raíces se lavaron durante 5 minutos en buffer fosfato salino (BPS), se transfirieron a una solución de etanol al 70% durante 1 minuto y luego a una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos con agitación. Finalmente, se colocaron en BPS y se maceraron en un mortero estéril, obteniendo así la dilución 1/10 de la muestra, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en BPS, hasta 10^{-3} . Una alícuota de 0,1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} se sembraron por duplicado en el medio Nash-Snyder, para el aislamiento de especies del género *Fusarium*. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días, luego se realizó el recuento y se expresó como \log_{10} UFC/g de raíz.

Cada tipo de colonia obtenida en el medio selectivo Nash-Snyder se repicó y purificó en agar hojas de clavel (AHC). Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días. Se realizó la identificación de los aislamientos de *Fusarium* hasta el nivel de especie para la sección *Liseola*, de acuerdo a Nelson y col. (1983).

3.5.2. Plantas en madurez fisiológica

3.5.2.1. Cosecha

Se realizó el día 5 de mayo de 2010. Se recolectaron todas las mazorcas de todas las plantas de cada tratamiento. Se determinó el número de plantas y el peso de las

mazorcas. Posteriormente las mazorcas se desgranaron en una trilladora estática (Forti MA. Ind. Argentina) y se determinó el peso de los granos de cada tratamiento. Finalmente los granos se molieron en un molino eléctrico industrial (RAS Mill, Romer Labs, USA) obteniendo muestras homogéneas de cada tratamiento.

3.5.2.2. Parámetros agronómicos

El efecto de los diferentes tratamientos sobre las plantas de maíz y el rendimiento a cosecha fueron evaluados a través del análisis del número de plantas por hectárea (ha), el rendimiento total de granos (kg/ha) y la relación grano-marlo (porcentaje de peso total de las mazorcas, representada por los granos y las mazorcas). El rendimiento del maíz fue ajustado a un contenido de humedad de 14.5% de acuerdo a las regulaciones para la comercialización de maíz en nuestro país (SAGyP, 1994).

3.5.2.3. Incidencia de *F. verticillioides* en granos

Se pesaron 10 g de maíz molido de cada tratamiento, se colocaron en 90 ml de BPS, obteniendo una dilución 1/10, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas al décimo en BPS hasta 10^{-2} . Una alícuota de 0,1 ml de cada dilución se sembró por duplicado en placas de Petri con medio Nash-Snyder. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días, luego las colonias se transfirieron a AHC y se incubaron a 25°C con ciclos alternativos de 12 h de luz blanca durante 7 días. Se realizó la identificación de cada aislado según Nelson y col. (1983) y posteriormente se determinó la incidencia de *F. verticillioides* para cada tratamiento.

3.5.2.4. Determinación de fumonisina B₁

La concentración de esta toxina se determinó por cromatografía líquida (HPLC), de acuerdo al método oficial AOAC N° 995.15, basado en Shephard y col. (1990) con modificaciones de Doko y col. (1995). Fueron analizadas 2 sub-muestras de 15 g de maíz molido de cada tratamiento. Las fumonisinas se extrajeron con 50 ml de una mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 y se agitó durante 1 hora en agitador orbital a 120 rpm. Los extractos se filtraron a través de un papel de filtro Whatman N° 4. Diez mililitros del extracto se limpiaron a través de cartuchos Bond-Elut (SAX 500 mg, cartuchos de fuerte intercambio aniónico, VARIAN), los cuales fueron previamente acondicionados por pasajes sucesivos de metanol (5 ml) y metanol:agua (5 ml) 3:1 (v/v). Los

procedimientos de limpieza se desarrollaron a presión atmosférica. Luego los cartuchos se lavaron con 5 ml de metanol:agua 3:1 (v/v) y finalmente con 5 ml de metanol. Las fumonisinas fueron eluidas de los cartuchos con 1% de ácido acético en metanol (10 ml). Los eluyentes fueron evaporados a sequedad en un evaporador rotatorio a 40°C. Para el análisis de HPLC los residuos fueron redissueltos en 500 µl de acetonitrilo/agua 1:1 (v/v). Alícuotas de 50 µl de esta solución fueron adicionados a tubos eppendorf y mezclados con 200 µl de solución derivatizante (o-phtaldialdehído 40 mg, metanol 1 ml, 2-mercaptoetanol 50 µl, 5 ml de tetraborato de sodio 0,1 M). La mezcla se protegió de la luz cubriendo los tubos con papel aluminio y luego se agitó manualmente por 30 s. Estas muestras se mantuvieron en oscuridad por 3 min. y después de este tiempo se inyectaron en el equipo HPLC. El sistema de detección de cromatografía líquida de alta presión/fluorescencia de fase reversa consistió de una bomba HP 1100 (Hewlett Packard, Palo AHO, CA, USA) conectado a un detector de fluorescencia programable HP 1046 A, y se utilizó una estación de trabajo HP. Las separaciones cromatográficas se desarrollaron en una columna de aluminio fase reversa C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula, phenomenex, Torrance, CA, USA). Una solución de metanol-hidrógeno fosfato de sodio 0,1 M 75:25 (v/v) ajustada a pH 3,35 con ácido ortofosfórico se usó como fase móvil isocrática, a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. Las curvas de calibración se construyeron con estándares de fumonisina B₁ (Romer Labs), diluidos en acetonitrilo-agua 1.1 (v/v). Se realizaron 2 inyecciones por muestra. Los datos se presentan como valores medios de triplicados de cada tratamiento. Fumonisina B₁ fue cuantificada correlacionando el área y altura de los picos de las muestras con el de las curvas estándares. El límite de detección bajo estas condiciones fue de 20 ng/g.

3.5.3. Suelo no rizosférico

Cada muestra de suelo no rizosférico consistió de 10 sub-muestras tomadas dentro de los surcos de las parcelas de cada tratamiento, luego de la cosecha. Se evaluó el potencial nitrificante, amonificante y celulolítico de cada muestra.

3.5.3.1. Potencial Nitrificante

Se utilizó la solución nitrificante (N), la cual se distribuyó en tubos de hemólisis (1 ml) y se esterilizó en autoclave. De la muestra de suelo se realizaron diluciones seriadas al décimo en BPS. A los tubos con solución nitrificante se adicionaron 0,5 ml de las

diluciones y se incubaron durante 21 días a 28°C. Dicha experiencia se realizó por duplicado para cada tratamiento de cada bloque. Para analizar la secuencia de oxidación bacteriana (de nitritos a nitratos) se utilizaron 10 gotas del reactivo difenilamina sulfúrico y 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado, los cuales se adicionaron luego de haber descartado el contenido de los tubos, dejando sólo 2 gotas en cada uno. Los tubos que se observaron con una coloración azul intensa, presentaron resultado positivo. La determinación del número de microorganismos/ g de suelo con actividad nitrificante se realizó utilizando la tabla de Mc Crady's (tabla IV.2) (Frioni, 2006).

Para las determinaciones del potencial nitrificante, amonificante y celulolítico, los resultados se expresaron como número de microorganismos/g de suelo empleado con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ microorganismos / g suelo} = \text{NMP} \times \text{FD} \times \text{FA}}{\text{NMP: número más probable}}$$

FD: factor dilución

FA: factor alícuota

Tabla IV.2. Tabla de McCrady

3 tubos / dilución					
1	2	1	2	1	2
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.4	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

1: número característico. 2: número más probable (NMP)

Fuente: Frioni, 2006.

3.5.3.2. Potencial amonificante

Se utilizó la solución amonificante (A), distribuída en tubos de hemólisis (1 ml) y se esterilizó en autoclave. De la muestra de suelo se realizaron diluciones seriadas al

décimo en BPS y se adicionó 1 ml de cada tubo de las diluciones a los tubos con solución amonificante, los cuales se incubaron durante 7 días a 28°C. Dicha experiencia se realizó por duplicado para cada tratamiento de cada bloque. Luego del período de incubación se realizó la lectura de los tubos, para lo cual se extrajo 1 ml de cada uno y se adicionaron dos gotas del reactivo de Nessler, siendo positivos los que viraron su coloración al amarillo. Finalmente la determinación del número de microorganismos con actividad amonificante se realizó utilizando la tabla de Mc Crady's (tabla IV.2) (Frioni 2006).

3.5.3.3. Potencial celulolítico

Para la determinación se utilizó la solución celulolítica (C), de la cual se distribuyeron 8 ml en cada tubo, a los cuales se les adicionó una banda de papel de filtro y se esterilizó en autoclave. De la muestra de suelo se realizaron diluciones seriadas al décimo en BPS. Se adicionó 1 ml de cada dilución a los tubos con la solución celulolítica. Se incubaron durante 15 días a 28°C. Dicha experiencia se realizó por duplicado para cada tratamiento de cada bloque. Se determinó como tubo positivo aquel en el cual se observó degradación parcial o total de la banda de papel de filtro. Finalmente la determinación del número de microorganismos con actividad celulolítica se realizó utilizando la tabla de Mc Crady's (tabla IV.2) (Frioni 2006).

3.6. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat Versión 3.10 (Systat Software, USA). El análisis de la varianza (ANOVA) se desarrolló para los parámetros agronómicos de las plántulas de 20 días y al momento de la cosecha; para el recuento y aislamiento de *Fusarium* Sección *Liseola* y *F. verticillioides* en la endorrizósfera y en granos de maíz cosechados; en el valor de mediana de fumonisinas B₁ y sobre la actividad microbiana en el suelo no rizosférico. El test de Duncan (P<0.05) y el test DGC alfa=0,05 (InfoStat) se aplicaron para comparar las diferencias significativas.

4. Resultados

4.1. *Condiciones climáticas de la campaña 2009-2010.*

La figura IV.1 muestra la acumulación mensual de precipitaciones en el área experimental desde diciembre de 2009 a mayo de 2010. El valor de precipitaciones acumuladas (420,4 mm) estuvo por debajo del promedio y ocurrió principalmente en diciembre y fue escaso en los otros meses.

Las temperaturas mínimas del suelo fueron elevadas, resultando en mayor acumulación térmica al compararlo con iguales períodos de campañas anteriores y menores amplitudes térmicas (datos no mostrados).

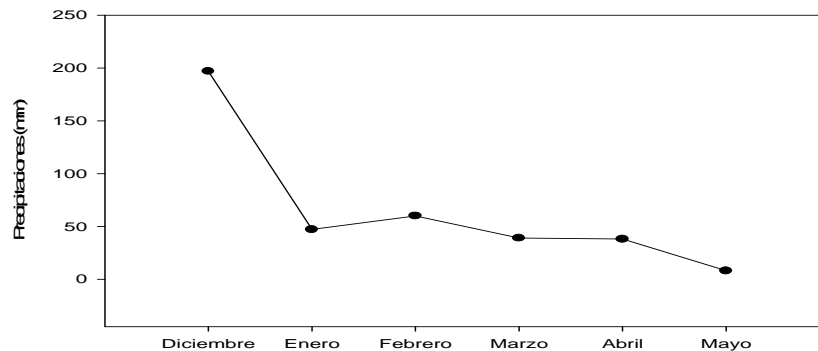


Fig. IV.1. Precipitaciones acumuladas mensualmente (mm) desde el mes de diciembre del año 2009 al mes de mayo del año 2010. Fecha de floración: febrero.

4.2. Efecto del formulado en plántulas de 20 días

4.2.1 Aislamiento, cuantificación e identificación de *Fusarium* sección *Liseola* de la endorrizosfera de plántulas de maíz.

Como muestra la fig. IV.2. el recuento de hongos del género *Fusarium* fue significativamente mayor en T2; y el menor recuento se determinó en T5, tratamiento en el cual se co-inoculó *M. oleovorans* con el patógeno. El tratamiento control del patógeno (T6) no mostró diferencias con el resto de los tratamientos.

La fig. IV.3. expone la distribución de especies aisladas en los diferentes tratamientos. Las especies identificadas fueron *F. verticillioides*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Hubo un porcentaje de especies no pertenecientes a la Sección *Liseola* identificadas como *Fusarium spp*. La especie *F. verticillioides* se identificó en todos los tratamientos con mayor porcentaje de aislamiento en T6.

F. subglutinans mostró el mayor porcentaje de aislamiento, con respecto al resto de las especies identificadas. *F. proliferatum* y *Fusarium spp* se encontraron en menor número. En T2 y T5 ningún aislado perteneció a la especie *F. proliferatum*.

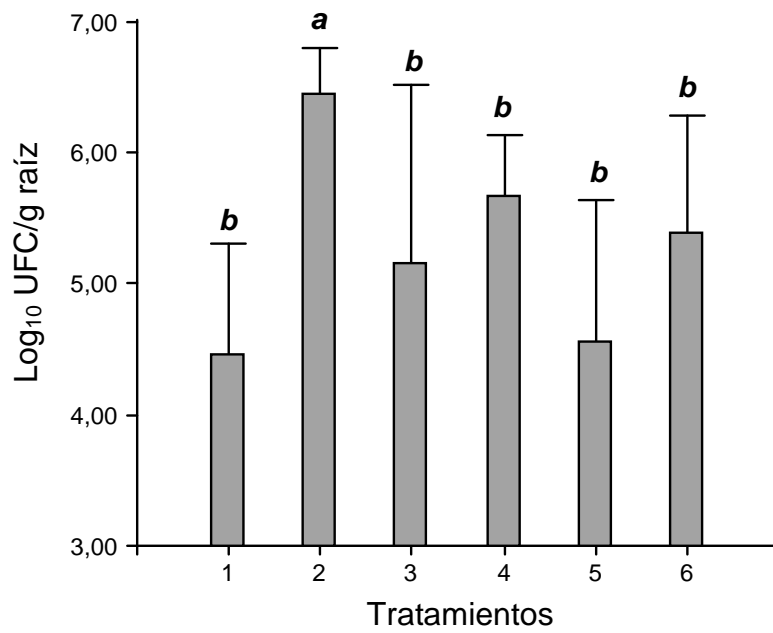


Fig. IV.2. Recuento total por tratamientos de *Fusarium* endofito en plántulas de maíz. Tratamientos con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$). **T1:** Maíz control - **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens*. - **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides*. - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* - **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* - **T6:** Maíz + *F. verticillioides*.

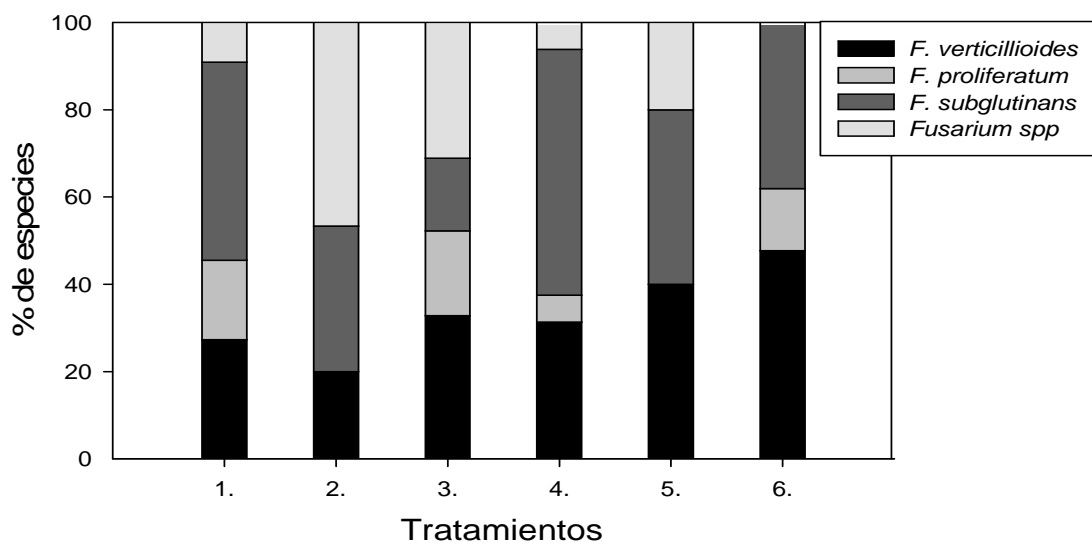


Fig. IV.3. Porcentaje de especies de *Fusarium* de endorrizósfera de plántulas de maíz de 20 días. **T1:** Maíz control - **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* - **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides*. - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* - **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* - **T6:** Maíz + *F. verticillioides*

4.2.2. Influencia de los tratamientos sobre los parámetros agronómicos

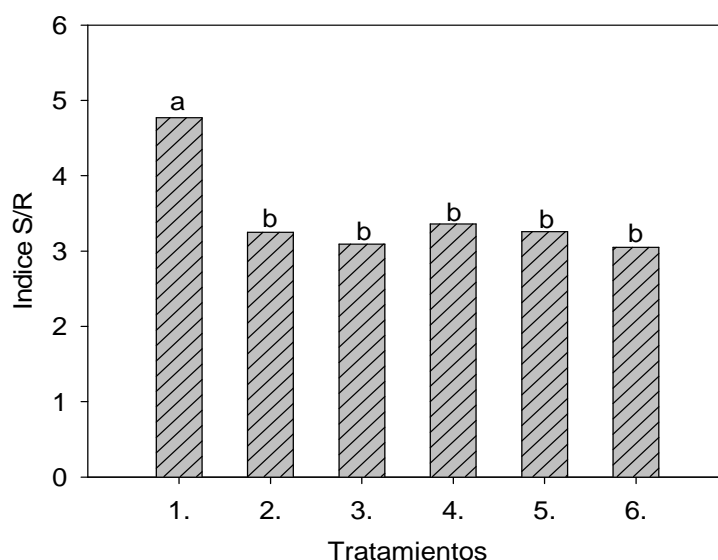


Fig. IV.4. Índice S/R por tratamiento. Valores medios de tres bloques. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test Duncan ($p < 0,05$). **T1:** Maíz control – **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens*. - **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* – **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* – **T6:** Maíz + *F. verticillioides*

Los índices S/R se muestran en la fig. IV.4, los mismos evidencian una diferencia significativa del tratamiento control, siendo el mayor índice en comparación con todos los tratamientos, lo cual indica que las semillas no inoculadas, es decir semillas sin la incorporación de inóculo liofilizado de los ACB y/o *F. verticillioides*, dieron origen a las plántulas que menor estrés sufrieron hasta los 20 días de desarrollo.

Los resultados obtenidos coincidieron con los observados en los ensayos en macetas, donde la incorporación de los diferentes inóculos liofilizados implicó una condición de estrés para la plántula de maíz.

4.3. Plantas en madurez fisiológica

4.3.1. Incidencia de *F. verticillioides* en granos cosechados

La incidencia de *F. verticillioides* en granos no evidenció efecto de bloque, por ello en la figura IV.5 se presentan los índices promedios de los tres bloques. El número de unidades formadoras de colonias de *F. verticillioides* en los granos de maíz cosechado no difiere entre tratamientos y control ($P=0,754$). El recuento de viables del patógeno fue del orden de 5 log para todos los tratamientos. El número de propágulos viables de *F. verticillioides* obtenido de granos de los tratamientos con agentes de biocontrol, no difiere de los valores obtenidos de los granos de plantas infectadas naturalmente (T1) y

plantas obtenidas de semillas inoculadas con el patógeno (T6). Los tratamientos no causaron estimulación del crecimiento de propágulos de *Fusarium*.

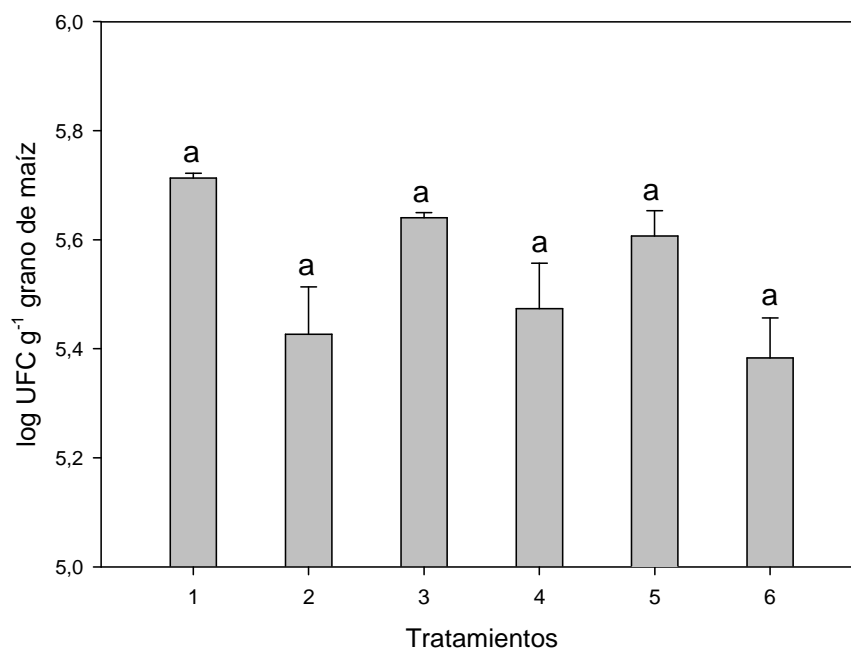


Fig. IV.5. Incidencia de *F. verticillioides* en granos cosechados, valores promedios de tres bloques. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan ($P < 0,05$). **T1:** Maíz control - **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* - **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* - **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* - **T6:** Maíz + *F. verticillioides*

4.3.2. Rendimiento de granos a cosecha

Se determinaron diferencias significativas del bloque 3, por lo cual los datos detallados en la tabla IV.3 corresponden a valores medios del bloque 1 y 2.

Tabla IV.3. Efecto de los tratamientos a cosecha durante la campaña 2009/2010.

Tratamiento	Numero de plantas por hectárea	Relación grano/marzo	Rendimiento \pm DS (kg ha ⁻¹)
T1	47619 a	79%-21%	5924 \pm 1333 a
T2	38572 a	77%-23%	4283 \pm 2899 a
T3	45238 a	78%-22%	4369 \pm 1128 a
T4	43333 a	78%-22%	6657 \pm 214 a
T5	40238 a	80%-20%	5969 \pm 1031 a
T6	45238 a	79%-21%	5641 \pm 690 a

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan ($P < 0,05$). **T1:** Maíz control - **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens*. - **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides*. - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* - **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* - **T6:** Maíz + *F. verticillioides*

La escasa acumulación de lluvias durante la campaña pudo haber afectado el rendimiento promedio (5474 Kg/ha). Los tratamientos de *M. oleovorans* sólo (T4) y *M. oleovorans* y *B. amyloliquefaciens* co-inoculados con el patógeno (T3 y T5) no

mostraron diferencias con el tratamiento control (T1). La adición de los agentes de biocontrol no afectó significativamente el número de plantas por hectárea obtenidas del tratamiento control (T1). El tratamiento de las semillas con *F. verticillioides* (T6) no afectó el número de plantas por hectárea respecto a los valores de T1. Las relaciones grano-marlo no presentaron diferencias significativas al compararlas con el tratamiento control (T1).

4.3.3. Contenido de fumonisin FB_1

La tabla IV.4 detalla la acumulación de fumonisin B_1 en granos cosechados. El mayor contenido de FB_1 se detectó en granos del tratamiento 6, semillas de maíz inoculadas con *F. verticillioides*. En este tratamiento, el contenido de FB_1 , fue 1263,8 ppb. En los tratamientos de las semillas inoculadas con las formulaciones (T2 y T4), los niveles de FB_1 fueron significativamente menores que los valores obtenidos en T1 (control), con una reducción de 51% y 72 % para los tratamientos con las formulaciones de *B. amyloliquifaciens* y *M. oleovorans*, respectivamente. Cuando se realizó la comparación entre T6 (semillas de maíz inoculadas con el patógeno) y la co-inoculación entre el patógeno y las formulaciones de los agentes de biocontrol (T3 y T5), los porcentajes de reducción fueron 43% y 77,5%, respectivamente.

Tabla IV.4. Contenido de FB_1 (ppb), valores promedios de tres bloques aleatorios

Tratamiento	Media \pm SD (ppb)	Mediana (ppb)	Mínimo (ppb)	Máximo (ppb)
1	136,9 \pm 83,6	160,2 b	44,1	206,5
2	180,9 \pm 208,6	78,7 d	43,1	420,9
3	322,1 \pm 439,7	114,3 c	24,8	827,3
4	383,8 \pm 595,5	44,4 f	35,9	1071,4
5	356,2 \pm 565,9	45,3 e	<	1009,4
6	513,2 \pm 653,2	202,0 a	74,0	1263,8

n= 3 muestras analizadas por tratamiento. < Límite de detección (20 ppb).

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan (P<0,05). **T1:** Maíz control – **T2:** Maíz + *B. amyloliquifaciens* - **T3:** Maíz + *B. amyloliquifaciens* + *F. verticillioides* - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* – **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* – **T6:** Maíz + *F. verticillioides*

Al realizar un estudio de correlación entre las variables fumonisin, rendimiento e incidencia del patógeno, se determinó una correlación negativa entre todas las variables (P<0,05), como lo expone la tabla IV.5. Se observa una débil correlación entre FB_1 con rendimiento e incidencia, y una modesta correlación entre rendimiento e incidencia.

Tabla IV.5. Coeficientes de correlación de Pearson entre diferentes variables.

	Rendimiento	Incidencia
FB ₁	-0.289 (0.579)	-0.245 (0.640)
Rinde	-----	-0.406 (0.424)

4.3.4. Efectos de los tratamientos sobre la actividad nitrificante, amonificante y celulolítica

La fig. IV.6. describe el recuento de microorganismos con actividad nitrificante, amonificante y celulolítica en muestras de suelo no rizosférico de cada tratamiento.

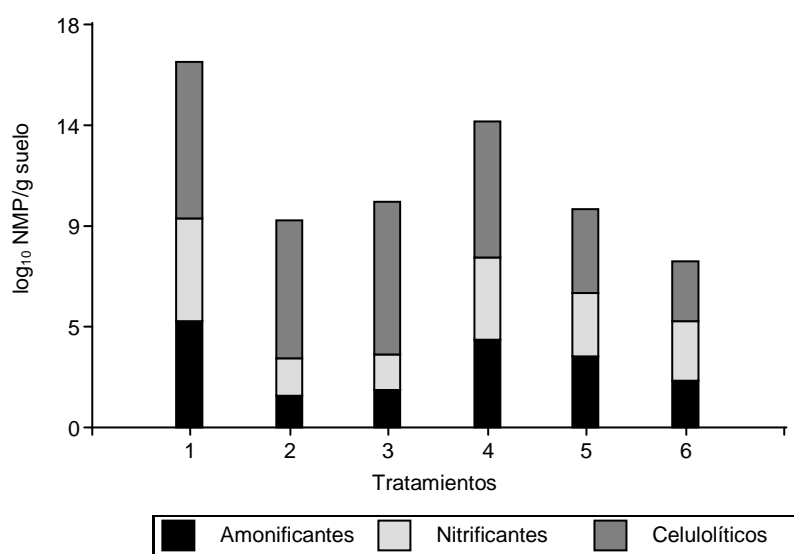


Fig. IV.6. Efecto de los tratamientos sobre la actividad amonificante, nitrificante y celulolítica del suelo. **T1:** Maíz control - **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* - **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* - **T4:** Maíz + *M. oleovorans* - **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* - **T6:** Maíz + *F. verticillioides*

Se observa que la actividad celulolítica fue llevada a cabo por un mayor número de microorganismos con respecto a las actividades de amonificación y nitrificación. El tratamiento control (T1), muestra la mayor actividad edáfica en suelo no rizosférico. Por otro lado, se destaca un recuento significativamente menor en T6 (control del patógeno), al comparar dicho tratamiento con los tratamientos inoculados con los agentes de biocontrol (T2 y T4) y co-inoculados con el patógeno (T3 y T5), se evidencia una importante reducción de la actividad edáfica. Esto indicaría que el agente patógeno es capaz de producir una reducción significativa de la actividad edáfica de la microbiota del suelo no rizosférico.

5. Discusión

El presente estudio muestra los resultados del crecimiento a campo de plantas de maíz provenientes de semillas tratadas con dos agentes de biocontrol. En base a los resultados obtenidos sobre los parámetros agronómicos de las plántulas de 20 días, puede señalarse que la inoculación de las simientes con *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* no revirtió el retardo en el crecimiento de las plántulas de maíz que se produjo cuando se trató a los granos solamente con *F. verticillioides*, pero sí provocó un incremento en el peso del sistema radical, en tanto que la longitud de las raíces no estuvo afectada. Estos resultados, son similares a los obtenidos por Kozdrój y col. (2004) quienes observaron una reducción en el crecimiento de plántulas de maíz luego de la inoculación de la simiente con *Pseudomonas chlororaphis* y *Pseudomonas putida* como ACB. Por el contrario, Correa y col. (2009) no observaron diferencias significativas en el crecimiento vegetativo de plantas de soja luego del tratamiento de las simientes con *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122 (10^8 ufc ml⁻¹). Dawar y col. (2008) tampoco encontraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento al comparar plántulas provenientes de semillas de girasol tratadas con *Rhizobium meliloti* y *Bacillus thuringiensis*, y plantas controles. Esto sugiere que el impacto de los ACB sobre los parámetros de crecimiento de las plántulas depende entre otros factores, del cultivar y del tipo de ACB empleado.

La relación S/R se ha utilizado ampliamente como un indicador de estrés vegetal ya que informa sobre un cambio en la fisiología de la planta: cuanto menor sea el índice, más estrés ha sufrido la planta (Kozdrój y col., 2004). En el presente ensayo a campo, los resultados obtenidos indicaron que las semillas no tratadas originaron las plántulas que menor estrés sufrieron. El índice S/R resultó disminuido en las plántulas de semillas tratadas con *F. verticillioides* al igual que con los ACB. Esto sugeriría que la inoculación de las simientes con *F. verticillioides*, con *B. amyloliquefaciens*, *M. oleovorans* o la co-inoculación del patógeno con los ACB, significó una situación de estrés para la plántula de 20 días de desarrollo. Hasta el momento no se han registrado reportes sobre el impacto de la co-inoculación de los ACB con el patógeno a controlar, sobre el crecimiento de plántulas. Sin embargo, esta situación de estrés generada en las plántulas de 20 días, no afectó la continuidad del desarrollo del cultivo, ya que los resultados obtenidos sobre los parámetros agronómicos a cosecha, indicaron que los tratamientos aplicados a las simientes no produjeron alteraciones en el número de plantas por hectárea, ni en el rendimiento de granos. Las relaciones grano-marlo

obtenidas coincidieron con los informes de la variedad utilizada (Dekalb 747 MGRR2, Anexo I), para la cual corresponde alrededor de 80-20% para la zona agroecológica de Río Cuarto (Dekalb, 2008).

En cuanto al aislamiento de *Fusarium* de endorrizosfera de las plántulas de 20 días, los resultados mostraron que *M. oleovorans* (T5) presentó un efecto antagónico frente a la colonización del interior radical del maíz por *F. verticillioides*, no así *B. amyloliquefaciens* dado que T2 mostró un recuento de *Fusarium* significativamente mayor. Entre las especies de *Fusarium* sección *Liseola* aisladas se destacó la presencia de *F. verticillioides* en todos los tratamientos con un importante porcentaje. Si bien se ha reportado que *F. verticillioides* es agente causal de podredumbres de granos y raíces de maíz (Yates y col., 2003), en el presente estudio se observó que todas las plantas provenientes de granos tratados con *F. verticillioides* solamente (T6) o en combinación con los ACB (T3 y T5) crecieron sin síntomas aparentes de enfermedad. Incluso la incidencia de *F. verticillioides* en los granos de maíz a cosecha no mostró diferencias significativas entre el tratamiento control y los tratamientos en los que se inóculo el patógeno.

La campaña de cultivo de maíz 2009-2010, es la primer campaña en la cual se aplicaron los agentes de biocontrol como principio activo de dos formulados liofilizados, luego de cuatro campañas consecutivas de maíz (2004-2005, 2005-2006, 2006-2007 y 2007-2008), en las cuales *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* fueron aplicados como inóculos líquidos. La aplicación de ambos formulados produjo reducciones significativas en el contenido de fumonisina B₁ en los granos de maíz. La mayor reducción, 72% al 77,5%, se observó con el formulado de *M. oleovorans* (T4), mientras que el formulado de *B. amyloliquefaciens* (T2) causó una reducción del 50% aproximadamente. Estos resultados son similares a los registrados en la campaña 2007-2008, en la cual se evidenció una reducción del 47% y 81% de acumulación de fumonisina B₁, con la aplicación de inóculos de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, respectivamente (Pereira y col., 2011).

Si bien la co-inoculación de la simiente con el ACB no se traduce en una disminución de la incidencia de *F. verticillioides* en los granos, si se observa una reducción significativa del contenido de fumonisina B₁. Es decir, las variaciones observadas en los niveles de inóculo de *Fusarium* en granos no se correlacionaron positivamente con el contenido de fumonisinas. Estos resultados no coinciden con los estudios de Chulze y col. (1999), donde los autores encontraron una correlación positiva entre el contenido de FB₁ y el

recuento de *F. verticillioides*. En un estudio previo, observamos una disminución de la incidencia de *F. verticillioides* en tratamientos con la adición de estos agentes de biocontrol, y una consecuente reducción de fumonisinas en los granos cosechados durante las campañas 2006-2007 y 2007-2008 (Pereira y col., 2010).

Por lo tanto, podría pensarse que la disminución del contenido de fumonisinas en los granos tratados con *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* puede ser consecuencia de la degradación de la toxina por los componentes activos de las formulaciones y/o por la inhibición del camino biosintético, independientemente del tamaño del inóculo de *F. verticillioides* en los granos cosechados.

Benedetti y col. (2006) demostraron que distintos aislamientos bacterianos del agroecosistema de maíz poseen la capacidad para degradar fumonisina B₁ en ensayos *in vitro*. Entre esas bacterias, *Sphingomonas sp* MTA144, demostró poseer una fuerte actividad en la degradación de fumonisinas (Täubel, 2005; Heintl y col., 2010). Otros estudios han demostrado que puede lograrse una disminución en el recuento de hongos asociados al maíz mediante la utilización de ACB bacterianos. Entre ellos, Bressan (2003) informó que el uso de aislamientos de *Streptomyces sp.* provocó una reducción significativa en el recuento de *F. subglutinans*, *Cephalosporium acremonium* y *Penicillium sp.* En estudios “*in vitro*” diferentes cepas bacterianas han demostrado capacidad para reducir la acumulación de toxinas de *F. verticillioides* (Bacon y col., 2001; Cavaglieri y col., 2004, 2005). Sin embargo, estas observaciones no provienen de estudios a campo, donde el número de variables que intervienen supera ampliamente al encontrado en ensayos de laboratorio o invernadero. Por lo tanto el recuento de *F. verticillioides* en granos y el contenido de fumonisinas también puede verse influenciado por las condiciones medioambientales. Warfied y Gilchrist (1999) han determinado que el crecimiento y la producción de toxina por *F. verticillioides* a campo, está fuertemente influenciado por el contenido de humedad del sustrato, siendo mayor la colonización de los granos y la producción de toxinas, cuanto menor sea el contenido de humedad de los mismos. La campaña 2009-2010 se caracterizó por ser deficitaria en precipitaciones, acumuladas en el mes de diciembre, y muy deficitarias en el resto de los meses. Estos bajos registros pluviométricos no afectaron la colonización de los granos por *F. verticillioides*, dado que los recuentos del patógeno son similares a los obtenidos en campañas previas, pero los valores de fumonisina B₁ acumulados fueron muy inferiores. Durante la campaña 2009-2010, la mayor producción de la toxina fue de 1264 ppb y correspondió al tratamiento de las semillas con *F. verticillioides*. Este

mismo tratamiento, durante la campaña 2007-2008, en la cual las precipitaciones fueron superiores desde la madurez hasta la floración, arrojó un contenido máximo de fumonisinas de 3800 ppb (Pereira y col., 2010). Fandohan y col. (2005) obtuvieron resultados similares al estudiar la acumulación de fumonisinas en maíz producido en Benin, África. Coincidentemente, Bush y col. (2004) encontraron elevados niveles de fumonisinas, y lo asocian a lluvias tardías en Clayton, Carolina del Norte (USA). En contraposición, Miller y col. (1995) informaron que la producción de fumonisinas estaba limitada a campos que presentaban estrés por sequía. Otros autores no encontraron correlación entre los registros de las precipitaciones y el nivel de fumonisinas en las temporadas de cultivo 2006 y 2007 en el sur de África (Ncube y col., 2011). Por lo cual es posible inferir que es la condición de estrés lo que favorece la producción de toxina y no necesariamente el contenido de humedad. Diversos estudios coinciden en que el estrés fisiológico durante el período previo a la cosecha de granos, debido a las oscilaciones drásticas de precipitaciones y humedad relativa, generan condiciones favorables para la producción de fumonisinas (Visconti, 1996). Todos conducen a la conclusión de que algunos fenómenos climáticos como los cambios en los patrones de lluvia o el estrés durante las últimas etapas del desarrollo de la planta de maíz en el campo, tienen una gran influencia sobre la producción de fumonisinas en el maíz previo a la cosecha (Fandohan y col., 2003).

Varios estudios realizados en diferentes partes del mundo mostraron bajos niveles de fumonisinas en los híbridos Bt (Munkvold y col., 1999; Pietri y Piva, 2000; Papst y col., 2005; Hammond y col., 2004). Un estudio realizado en Argentina entre 1999 y 2005, en diferentes zonas agroecológicas, mostró que la mediana de la contaminación por fumonisinas totales fue de 1712 ug/kg (Pacin y col., 2007). Otro estudio realizado en siete localidades diferentes de Argentina con maíz Bt, durante las temporadas de cultivo 2002/2003 y 2003/2004 mostraron valores medios de fumonisinas de 0,2 a 0,043 ug/g (Barros y col., 2009). Teniendo en cuenta que en el presente estudio, como en nuestros ensayos a campo previos, se trabajó con maíz Bt, es posible que sea la causa de los bajos niveles de fumonisina B₁ registrados en el tratamiento control. Los niveles de fumonisinas B₁ encontrados en este estudio fueron inferiores a los límites recomendados por la Unión Europea (CE, 2007), y a los valores totales de fumonisinas establecidos para maíz destinado al consumo humano, por el Centro para la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, 2001). A diferencia del maíz no Bt, en Europa y en otras

partes del mundo, en ensayos a campo se ha demostrado que el maíz Bt posee niveles significativamente más bajos de fumonisinas (Folcher y col., 2010).

Sin embargo, teniendo en cuenta que las condiciones ambientales pueden favorecer la infección de *F. verticillioides* y/o la síntesis de fumonisinas, la adición de los dos formulados desarrollados podría mejorar significativamente la calidad de los granos de maíces Bt y no-Bt. Dichos formulados tienen además la ventaja de ser estables durante un almacenamiento prolongado y a las fluctuaciones ambientales en el campo.

La actividad microbiana edáfica es regulada por las características físicas y químicas del suelo, por la composición de los materiales orgánicos y por la naturaleza de la comunidad microbiana, entre otros. Los resultados obtenidos demuestran que la inoculación de las semillas con *F. verticillioides* implicó una reducción de la actividad de la microbiota edáfica, ya que las actividades de nitrificación, amonificación y celulólisis se vieron disminuidas. Por lo tanto, la reducción de la actividad de la microbiota edáfica podría deberse a la reducción del número de microorganismos del rizoplano, como consecuencia de la competencia generada por la incorporación de *F. verticillioides*. Nuestros resultados indican que la actividad celulolítica es llevada a cabo por un número mayor de microorganismos que los que llevan a cabo la actividad nitrificante y amonificante. El recuento de microorganismos con actividad celulolítica estuvo dentro del rango de 1×10^4 - 1×10^6 UFC/g suelo. Botelho y col. (1998) también informaron resultados elevados para los microorganismos celulolíticos de la rizósfera de maíz, sin embargo el recuento correspondiente a los microorganismos nitrificantes registrados por estos investigadores fue ampliamente superior (10^6 UFC/g suelo) al observado en el presente trabajo a campo. Esta disparidad puede ser debida en gran parte a las características físico-químicas del suelo, al cultivo antecesor y a las prácticas culturales llevadas a cabo.

Capítulo V

Incidenia De Fusarium verticillioides Y Contenido De Fumonisinias En Granos De Maíz De Plantas Con Inflorescencias Femeninas Cubiertas Y No Cubiertas

1. Introducción

Las interacciones biológicas entre la planta de maíz y *Fusarium verticillioides* son complejas y pueden conducir a resultados perjudiciales (Yates y Sparks, 2008) o pueden beneficiar la performance y rendimiento del cultivo (Yates y col., 2005). Cuando el cultivo desarrolla en condiciones de estrés, la interacción entre patógeno-planta puede desencadenar en desarrollo de enfermedad y/o producción de micotoxinas (Bacon y Nelson, 1994; Abbas y col., 2006). La podredumbre de granos de maíz afecta gravemente el rendimiento en Argentina (Presello y col., 2006).

La distribución de *F. verticillioides* se ha asociado a factores abióticos (físicos y químicos), bióticos relacionados a las características genéticas de las especies en su dualidad endofito-patógeno, así como a las características intrínsecas morfológicas y genéticas del cultivo.

F. verticillioides puede invadir la planta de maíz por diferentes vías de infección: i) por las semillas infectadas a partir de las cuales se desarrollan las plantas provocando una invasión secuencial de los diferentes tejidos de la plántula en desarrollo (Bacon y Hinton, 1996), ii) por infección de los granos en las mazorcas a través de la transmisión, por aire o lluvia de microconidios o macroconidios presentes en los residuos de cultivos y en el suelo (Cotten y Munkvold, 1998, Desjardins y col., 2002), iii) por infección de los granos causada por heridas de insectos que transportan las estructuras de propagación del hongo .

La colonización, desarrollo micelial, alteración tisular y acumulación de metabolitos secundarios, como las fumonisinias, están íntimamente interrelacionados a las condiciones ambientales intrínsecas al grano en desarrollo y a las condiciones medioambientales de la zona agroecológica del cultivo de maíz. Entre las principales variables ambientales que intervienen en esta interrelación microorganismo-planta, la disponibilidad acuosa y la temperatura poseen una incidencia fundamental.

Es por ello que el estudio de la dinámica poblacional de *F. verticillioides* en granos de maíz en madurez fisiológica, teniendo en cuenta variables ambientales en condiciones

de campo, permite avanzar en la comprensión de un aspecto de la interacción biológica entre la planta de maíz y el patógeno. Dicho conocimiento incide en la optimización de estrategias de prevención biológicas como las planteadas en esta tesis.

2. Objetivo

Comparar el tamaño poblacional de *Fusarium* Sección *Liseola* y la acumulación de fumonisinas en mazorcas cubiertas y no cubiertas.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1. Evaluar el impacto que provoca la cobertura de las inflorescencias femeninas, sobre la incidencia de *F. verticillioides* y el contenido de fumonisinas en granos a cosecha.

2.1.2. Determinar los cambios de humedad y temperatura que se producen en las inflorescencias cubiertas durante las diferentes etapas del cultivo hasta la madurez fisiológica.

3. Metodología

3.1 Siembra

El ensayo se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en Río Cuarto (30 ° 57 'de latitud S, 64 ° 50'W de longitud, altitud 562m) con suelo de textura franco arenosa. Se realizó una aplicación del herbicida glifosato en toda la parcela una semana después de la siembra de acuerdo a las prácticas agrícolas comúnmente utilizadas para cultivares RR. Los tratamientos se plantaron en tres bloques al azar por triplicado para cada uno, en parcelas de 7 x 3 m separados por las borduras de 1,5 m. En cada parcela, se marcaron cuatro surcos a 0,5 m de distancia, se sembraron 25 semillas a 25 cm de distancia, con un total de 100 semillas por parcela. A partir del cuarto día de floración (apertura de estambres de la inflorescencia masculina) se colocaron sobre las inflorescencias femeninas bolsas especiales de papel Kraft (intemperie^R) permeables a la humedad con una porosidad <3 µm (en 15 plantas por parcela), las cuales se dejaron hasta la cosecha de las mazorcas maíz. El ensayo se realizó durante la campaña 2010/2011.

Tratamientos: 1) Maíz (control)

2) Maíz + *F. verticillioides*

3.2 Inóculo fúngico

Descrito en Capítulo IV. Punto 3.2. Las semillas de maíz fueron inoculadas con *F. verticillioides* para asegurar la presencia del patógeno en ausencia de ocurrencia natural del patógeno.

Tabla V. 1. Diseño del ensayo a campo

Cabecera norte	
T2	T1
T1	T2
T2	T1
Cabecera sur	

3.3. Registros pluviométricos y temperaturas

Los registros pluviométricos y térmicos, fueron registrados por la estación ADCON Telemetry en el campus de la UNRC. Se registró además la temperatura del aire dentro de la bolsa sobre las mazorcas, para ello se colocó un termómetro fijo de manera impermeable (fig. V.1.)



Fig. V.1. A) Fotografía de mazorca cubierta con bolsa de papel Kraft. B) Bolsa de papel kraft sobre mazorca, con termómetro incorporado para registrar temperatura interior.

Al momento de medir la temperatura en el interior de la bolsa, se tomó también la temperatura del aire. Por otro lado, con el fin de conocer el contenido de humedad dentro de la bolsa, se registró periódicamente el contenido de agua de los granos de inflorescencias cubiertas y no cubiertas, midiendo la a_w de los mismos a una muestra tomada por parcela, desde la floración hasta la madurez fisiológica del cultivo.

3.3. *Plantas en madurez fisiológica*

3.3.1 Cosecha

Descrito en Capítulo IV. Punto 3.5.2.1.

3.3.2. Incidencia de *F. verticillioides* en granos

Descrito en Capítulo IV. Punto 3.5.2.3.

3.3.3. Contenido de Fumonisin B1 y B2

Descrito en Capítulo IV. Punto 3.5.2.4.

4. Resultados

4.1. *Registro de precipitaciones y temperaturas*

Como se muestra la fig.V.2. en la temporada 2010/2011 se registraron importantes precipitaciones distribuidas uniformemente entre los meses de diciembre a marzo (total 561 mm). La temperatura media del aire varió entre 20 y 23°C durante los meses de verano (diciembre a febrero), y entre 15 y 20°C durante los meses de febrero a mayo.

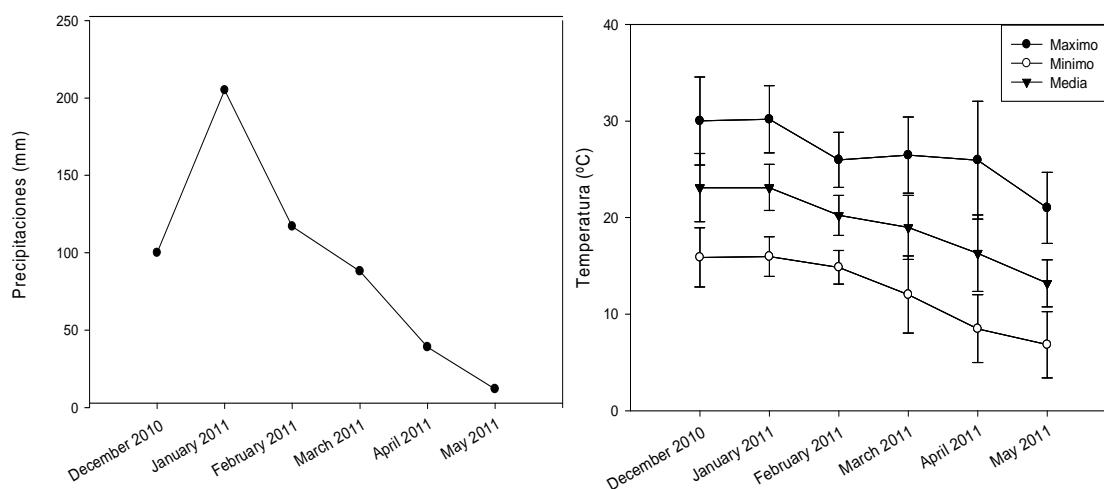


Fig. V.2. Precipitaciones acumuladas mensualmente y registro de temperatura del aire (máxima, mínima y media), durante la campaña 2010/2011.

4.2. Registros de temperatura y humedad en los granos durante el cultivo

En la fig. V.3 se grafica la temperatura del aire y del interior de la bolsa sobre las mazorcas, las cuales fueron registradas desde la floración (15 de marzo) hasta la madurez fisiológica del cultivo (5 de junio). El rango de temperatura en el interior de la bolsa osciló entre 19 y 35°C, mientras que el rango de la temperatura del aire fue menor (14 y 30°C). Como se observa la temperatura en el interior de la bolsa, siempre fue más elevada que la temperatura del aire registrada, la diferencia se incrementó especialmente en los días de sol. En el día N° 8 se observa una diferencia de sólo 2°C coincidiendo con un día completamente nublado, en los días de abundante radiación solar la diferencia se mantuvo alrededor de 5°C aproximadamente.

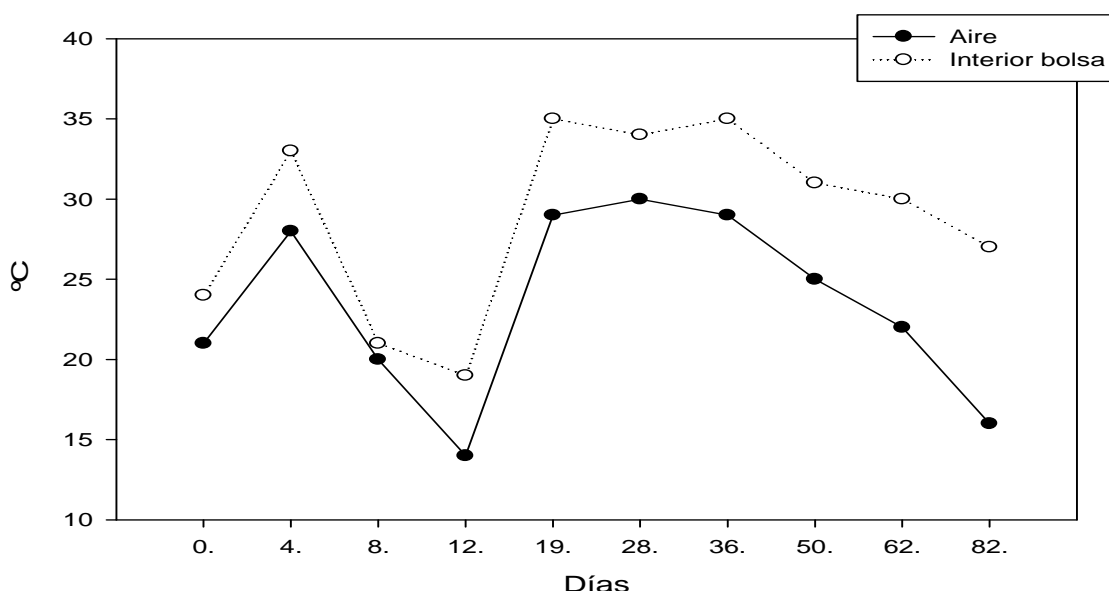


Fig. V.3. Temperatura del aire y temperatura interior de las bolsas de papel sobre mazorcas.

La fig.V.4 muestra la a_w de los granos de mazorcas cubiertas con bolsas y sin cubrir, de ambos tratamientos, desde el momento de la floración hasta la madurez fisiológica. Se puede observar que en los tratamientos 1 y 2 sin cubrir, la a_w de los granos tuvo un descenso paulatino. T1 muestra una a_w inicial de 0,9963 la cual descendió hasta 0,9595 a los 82 días después de la floración. Este valor fue similar al registrado en T2 (0,9532) en el mismo tiempo de muestreo (82 días).

En los tratamientos 1 y 2 con las mazorcas cubiertas se observó mayor cantidad de agua disponible en los granos, la cual osciló entre 0,9963 y 0,9648. En general se observó una disminución marcada de la a_w desde el día 12 al 36. En el día 50 se produjo un incremento, para finalmente descender hasta el momento de la cosecha. En el último

tiempo de muestreo los tratamientos con la bolsa registraron mayor a_w (0,9648 y 0,9662) que las mazorcas sin cubrir (0,9595 y 0,9532).

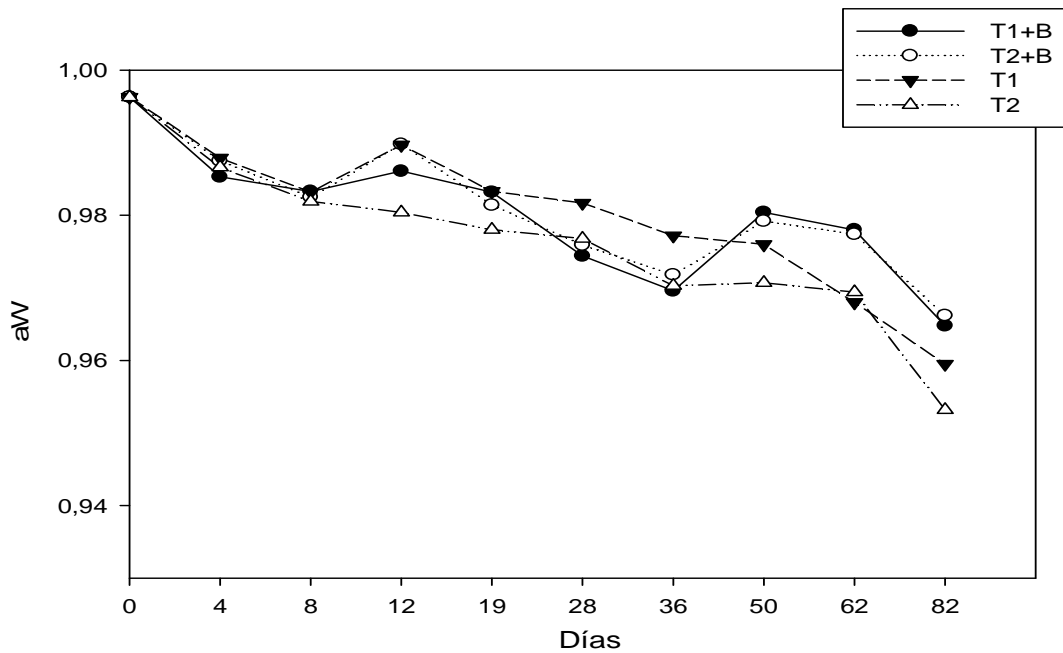


Fig. V.4. Actividad acuosa (a_w) de los granos de mazorcas cubiertas y no cubiertas, registrada desde la floración hasta la madurez fisiológica del cultivo. T1: Maíz (control); T2: Maíz + *F. verticillioides*; B: bolsa.

4.3. Incidencia de *Fusarium* Sección *Liseola* en granos de maíz cosechados

En la fig. V.5 se grafica la incidencia de *Fusarium* Sección *Liseola* en ambos tratamientos, con mazorcas cubiertas y no cubiertas.

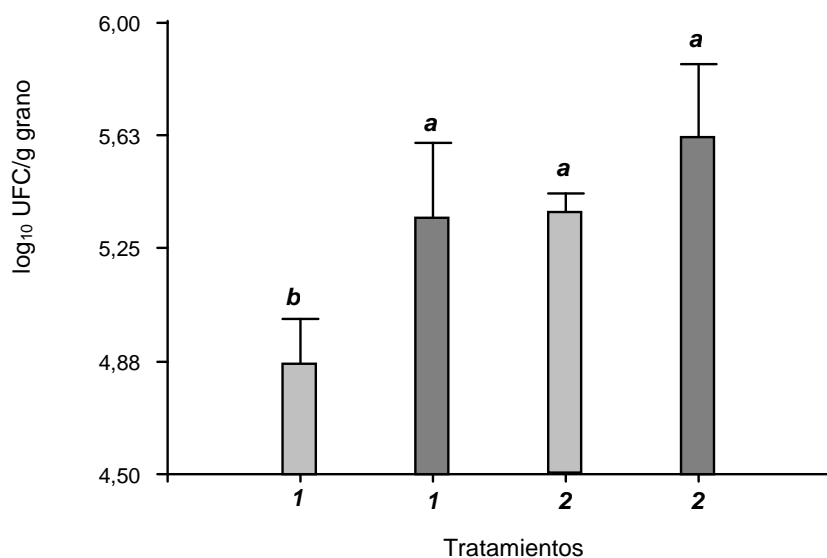


Fig.V.5. Incidencia de *F. verticillioides* en granos de maíz a cosecha, sin bolsa (□) y con bolsa (■) promedio de bloques I, II y III. T1: Maíz (control); T2: Maíz + *F. verticillioides*. Letras iguales indican diferencias no significativas, acorde al test de Duncan ($p < 0,05$).

El número de UFC de *Fusarium* obtenido en granos del tratamiento 2 (plantas crecidas de semillas inoculadas con *F. verticillioides*) fue significativamente mayor (5,63 log UFC) que el valor del tratamiento control (T1 sin bolsa) que fue de 4,88 log UFC/g. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el recuento obtenido al comparar T2 (con y sin bolsa) con T1 (con bolsa).

El recuento medio de UFC de *F. verticillioides* que permanece asociado con las semillas después del tratamiento con *F. verticillioides* M7075 fue 10^5 UFC/g, mientras que el valor medio de UFC de *F. verticillioides* en las semillas sin inocular con el patógeno fue de 10^4 UFC/g (datos no mostrados).

4.4. Identificación de especies de *Fusarium* Sección *Liseola*

Como se puede observar en la tabla V.2. *F. verticillioides* fue la especie que predominó en los granos de maíz, siendo la única identificada en los tratamientos sin cubrir las mazorcas. En los granos provenientes de mazorcas cubiertas, predominó *F. verticillioides* pero también se aislaron e identificaron las especies *F. proliferatum* y *F. subglutinans*.

Tabla V.2. Especies del género *Fusarium* identificadas por bloques.

	Especie
Bloque I	100 % <i>F. verticillioides</i>
Bloque II	100 % <i>F. verticillioides</i>
Bloque III	100 % <i>F. verticillioides</i>
Bloque I con bolsa	99 % <i>F. verticillioides</i> – 1% <i>F. proliferatum</i>
Bloque II con bolsa	98 % <i>F. verticillioides</i> – 2 % <i>F. subglutinans</i>
Bloque III con bolsa	100 % <i>F. verticillioides</i>

4.5. Contenido de fumonisinas

En la fig.V.6 se muestran los valores de fumonisinas detectados en granos de maíz en los diferentes tratamientos. No se observan diferencias significativas en el contenido de fumonisinas en granos provenientes de plantas desarrolladas de semillas no inoculadas (T1) e inoculadas con el patógeno (T2), al analizar los tratamientos en los que se utilizaron bolsas para cubrir las mazorcas. Este mismo comportamiento se observa entre los tratamientos 1 y 2 en los que no se cubrieron las mazorcas.

Sin embargo, si se observan diferencias significativas en el contenido de fumonisinas entre el tratamiento 1 con bolsa y el mismo tratamiento sin bolsa. También se observan

diferencias significativas al comparar el tratamiento 2 con y sin bolsa. Para T1 (con bolsa) se determinó una media de 1570 ppb de FB₁ y 885 ppb de FB₂, mientras que en el mismo tratamiento pero sin bolsas los valores fueron 654 ppb y 322 ppb de FB₁ y FB₂, respectivamente. En el tratamiento 2 los mayores valores de fumonisinas B₁ y B₂ (1360 ppb y 744 ppb respectivamente) se detectaron en granos provenientes de mazorcas cubiertas.

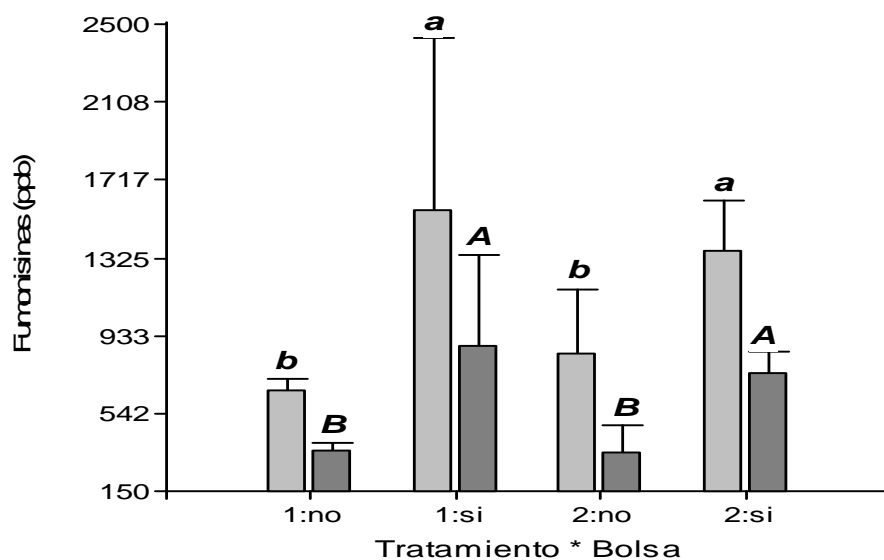


Fig. V.6. Valores promedio de FB₁ (■) y FB₂ (■) en tres bloques aleatorios. 1: Maíz (control); 2: Maíz + *F. verticillioides*; si: con bolsa; no: sin bolsa. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos, con y sin bolsa (si - no), en el contenido de FB₁. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos, con y sin bolsa (si - no), en el contenido de FB₂.

5. Discusión

En base a nuestros resultados podemos inferir que la cobertura de las inflorescencias femeninas desde la floración hasta la cosecha, no impidió la infección de los granos de maíz. En el interior de las bolsas que cubrieron las mazorcas la temperatura se mantuvo aproximadamente 5°C por encima de la temperatura aérea externa y la a_w sufrió fluctuaciones y permaneció más elevada que en mazorcas no cubiertas. Los rangos de a_w (0,95-1) y de temperatura (19-35°C) que se registraron en mazorcas cubiertas, desde la floración hasta la madurez fisiológica, favorecieron el incremento de los niveles de fumonisinas en los granos cosechados. Sin duda, las condiciones de incremento de la temperatura generada con las bolsas fue el principal factor evaluado que influyó en la síntesis de la micotoxina.

Velluti y col. (2000) al estudiar la competencia de especies fúngicas presentes en el maíz, demostraron que la velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* fue mayor a 25°C, mientras que a 15°C el crecimiento se redujo; y a temperatura constante, la velocidad de crecimiento aumentó con el incremento de la actividad agua. Por otro lado, Marín y col. (1999) demostraron que las condiciones óptimas para la síntesis de fumonisinas son 30°C y a_w 0,98. En una recopilación bibliográfica realizada por Maiorano y col. (2009), se muestra que la a_w óptima para la síntesis de fumonisinas es $> 0 = a$ 0,99, con un rango de temperatura óptima de 25 a 30°C. Es importante destacar que toda esta información corresponde a trabajos realizados *in vitro*. Munkvold y Desjardins (1997) informaron que *F. verticillioides* crece en el grano cuando el contenido de humedad es mayor al 18 - 20%. Scott (1993) sugirió que la mejor temperatura para la producción de fumonisina B₁ en maíz es 20°C.

A nivel de campo, en la misma zona agroecológica Pereira y col. (2010), obtuvieron el mayor contenido de fumonisinas durante la campaña 2007/2008, coincidiendo con abundantes lluvias desde la floración hasta la madurez del cultivo. En concordancia, Fandohan (2005) y Bush (2004), demostraron un incremento de los niveles de fumonisinas asociados con las lluvias tardías en diferentes zonas agroecológicas. Nuestros resultados, en la campaña 2010/2011, muestran la misma tendencia en cuanto a la relación entre el contenido de fumonisinas y las condiciones climáticas, que los estudios de Pereira (2010), Fandohan (2005) y Bush (2004). Las condiciones de cultivo con las bolsas sobre las mazorcas (alta humedad y alta temperatura), favorecieron significativamente los niveles de fumonisinas. En contraste, otros autores (Miller, 1995; Warfield y Gichrist, 1999) demostraron que el contenido de fumonisinas en maíz, está limitado al bajo contenido de humedad. Por lo tanto, es posible que la condición de estrés que sufre el patógeno en el grano y el cultivo en el campo, es lo que favorece la producción de toxina y no necesariamente el contenido de humedad (Bacon y col., 2008).

Evidentemente múltiples factores, además de la temperatura, el contenido de humedad y la incidencia del patógeno, condicionan la acumulación de fumonisinas en maíz a campo. Por lo tanto, datos aportados sobre algunos de estos factores, permite alcanzar mayores conocimientos tendientes al desarrollo de estrategias para mitigar la presencia de fumonisinas en maíz.

Capítulo VI

Ensayos A Campo Con Semillas Bacterizadas Con Formulados Liofilizados Y Aceite De Parafina Como Adhesivo

1. Introducción

En la campaña 2009-2010 la aplicación de ambas formulaciones en la simiente, sin el agregado de adhesivos, produjo reducciones significativas en el contenido de fumonisina B₁ en los granos a cosecha, a pesar de no reducir significativamente la incidencia del patógeno. Tales resultados coincidieron con los obtenidos durante cuatro campañas previas consecutivas (Pereira y col., 2011).

Con el fin de determinar a nivel de campo, la eficacia del adhesivo seleccionado *in vitro*, se realizó por dos años consecutivos el mismo ensayo con semillas bacterizadas con los formulados liofilizados y aceite de parafina.

2. Objetivo

Probar a campo por dos años consecutivos la efectividad del formulado elaborado adherido a la semilla con aceite de parafina al 2%.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1. Evaluar el impacto de los diferentes tratamientos bacterianos sobre distintos parámetros agronómicos del cultivo de maíz en madurez fisiológica.

2.1.2. Determinar los efectos de los formulados en granos a cosecha, analizando el contenido de fumonisinas y los niveles poblacionales de *F. verticillioides*.

3. Metodología

3.1. Bacterización de las semillas

Se utilizaron los formulados liofilizados de ambos agentes de biocontrol y la simiente Dekalb 747 MGRR2 (Anexo I). La bacterización de las mismas se realizó 24 h previas a la siembra con aceite de parafina (AP) al 2% como adhesivo + el polvo liofilizado, en una concentración de 10⁹ UFC/g de semillas.

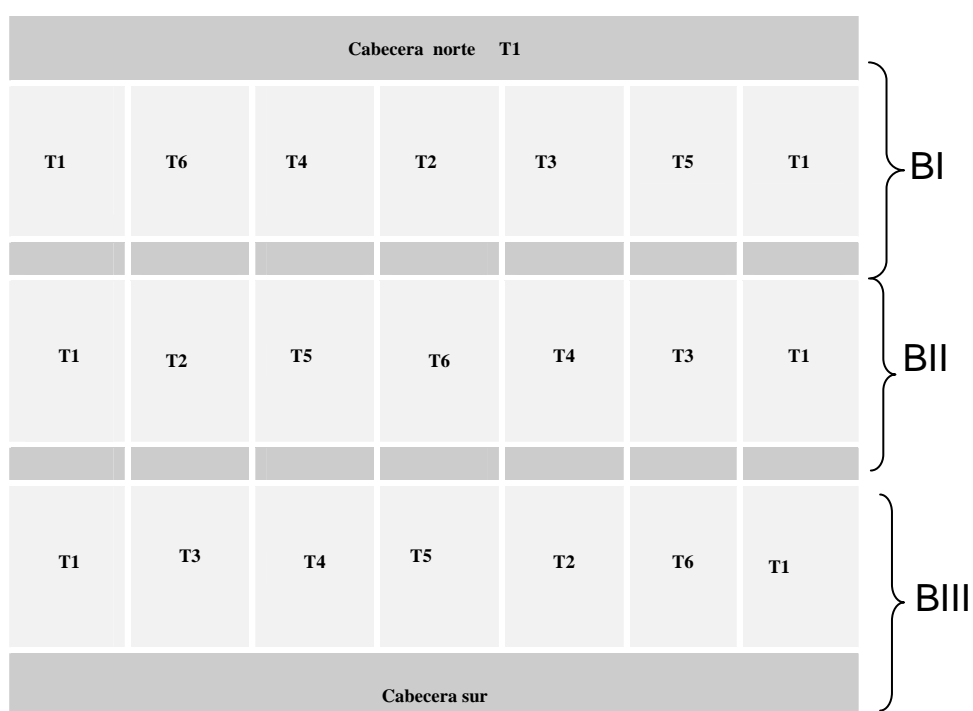
3.2. Inóculo fúngico

En los tratamientos con *F. verticillioides*, la inoculación se realizó en el laboratorio previo a la siembra, adicionando 2 ml / 400 semillas de un cultivo de la cepa *F. verticillioides* M7075. Descripto Cap. IV punto 3.2.

3.3. Área experimental, tratamientos y siembra

Los ensayos se llevaron a cabo en un campo experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Descripto Cap. IV punto 3.3. Cada tratamiento se sembró en tres bloques aleatorios por triplicado, en parcelas de 7 x 3 m separadas por borduras de 1,5 m. En cada parcela se marcaron cuatro surcos a 0,5 m de distancia donde se sembraron 25 semillas, es decir un total de 100 semillas por parcela (tabla VI.1).

Tabla VI.1. Diseño del ensayo a campo, campaña de siembra 2009-2010 y 2010-2011.



- Tratamientos:
- 1) Maíz control (simiente + adhesivo).
 - 2) Maíz + *B. amyloliquefaciens* + adhesivo
 - 3) Maíz + *B. amyloliquefaciens* + adhesivo + *F. verticillioides* M7075
 - 4) Maíz + *M. oleovorans* + adhesivo
 - 5) Maíz + *M. oleovorans* + adhesivo + *F. verticillioides* M7075
 - 6) Maíz + *F. verticillioides* M7075 + adhesivo.

BI ; BII ; BIII : Bloques I, II y III.

3.3.1. Registros pluviométricos y temperaturas

Descrito en capítulo IV. Punto 3.4.

3.4. *Plantas en madurez fisiológica*

3.4.1. Cosecha

Descrito en capítulo IV. Punto 3.5.2.1.

3.4.2. Parámetros agronómicos

Descrito en Cap. IV punto 3.5.2.2.

3.4.3. Incidencia de *F. verticillioides* en granos

Descrito en Cap. IV punto 3.5.2.3.

3.4.4. Contenido de FB₁

Descrito en Cap. IV punto 3.5.2.4.

3.5. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat Versión 3.10 (Systat Software, USA). El test de rangos múltiples de Duncan ($P < 0,05$) y el test DGC ($\alpha = 0,05$) (InfoStat) se aplicaron para comparar las diferencias de los tratamientos.

4. Resultados

4.1. *Condiciones climáticas de las campañas 2009-2010 y 2010-2011*

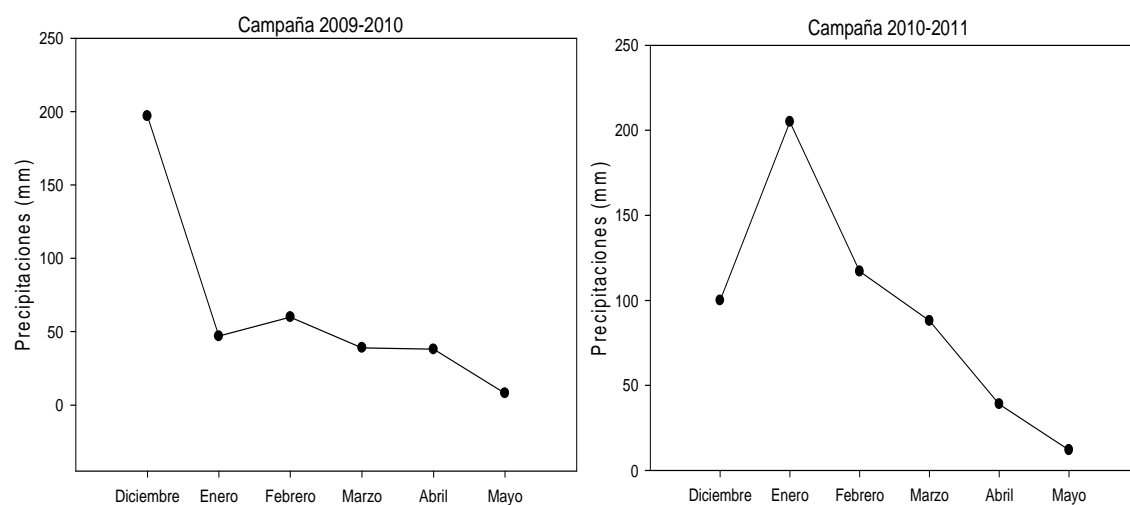


Fig. VI.1. Precipitaciones mensuales desde los meses de diciembre a mayo, durante las campañas de cultivo 2009-2010 y 2010-2011.

La fig. VI.1 detalla el registro de precipitaciones totales en los meses de desarrollo del cultivo durante las dos campañas consecutivas en las cuales se realizó el ensayo a campo. La campaña 2009-2010 registró un total de 420 mm de precipitaciones, acumuladas en el mes de diciembre y deficitarias el resto de los meses. En la campaña 2010-2011 el total fue de 561 mm, con el mayor registro en el mes de enero (205 mm) y una buena distribución en el resto de los meses.

4.2. Plantas en madurez fisiológica

4.2.1. Incidencia de *Fusarium* en granos cosechados

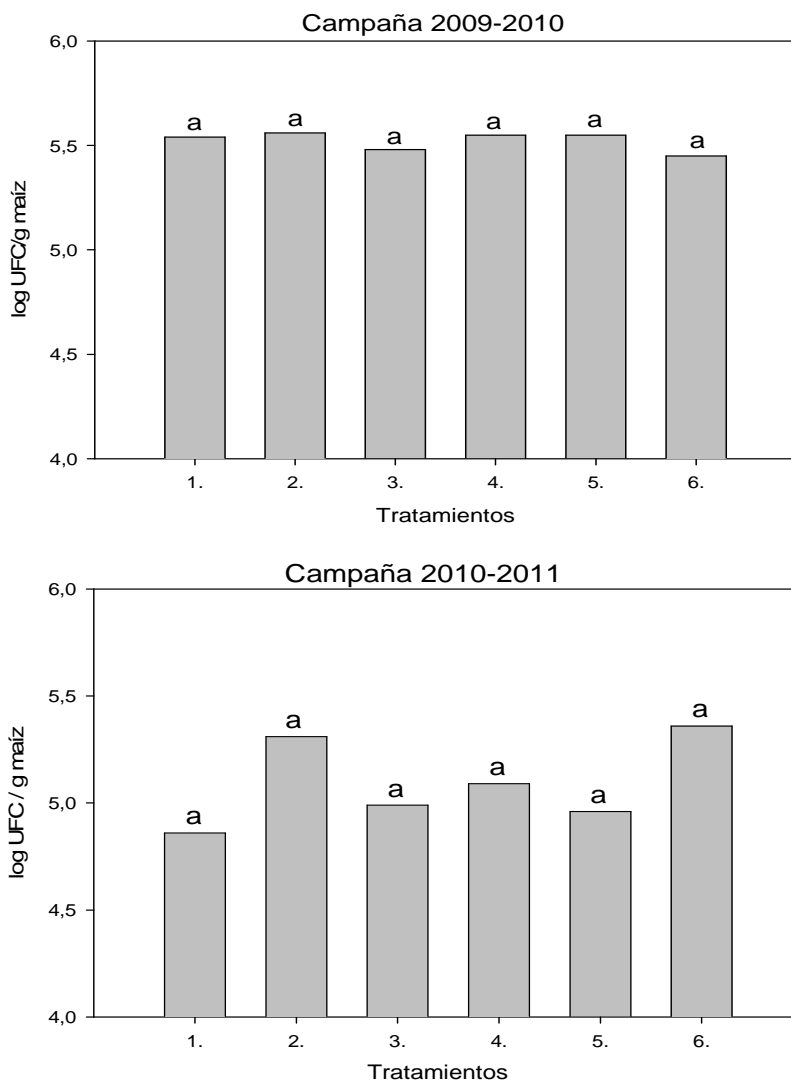


Fig. VI.2. Incidencia de *Fusarium* en granos de maíz a cosecha, durante la campaña 2009-2010 y 2010-2011, promedio de bloques aleatorios. Tratamientos con igual letra indican diferencias no significativas de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). **T1:** control (maíz + AP); **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + AP; **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* + AP; **T4:** Maíz + *M. oleovorans* + AP; **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* + AP; **T6:** Maíz + *F. verticillioides* + AP.

La fig.VI.2 expone la incidencia de *Fusarium* en los granos de maíz a cosecha. En ambas campañas no se observó efecto de bloque, ni tampoco existieron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control (T1) ni al control del patógeno (T6).

En la campaña 2009-2010, los recuentos de *F. verticillioides* fueron muy similares entre todos los tratamientos, manteniéndose en el mismo logaritmo (5 log). En la campaña 2010-2011 si bien se observan recuentos más dispares, siendo el mayor el correspondiente a T6, tales diferencias no fueron significativas de acuerdo al test de rangos múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

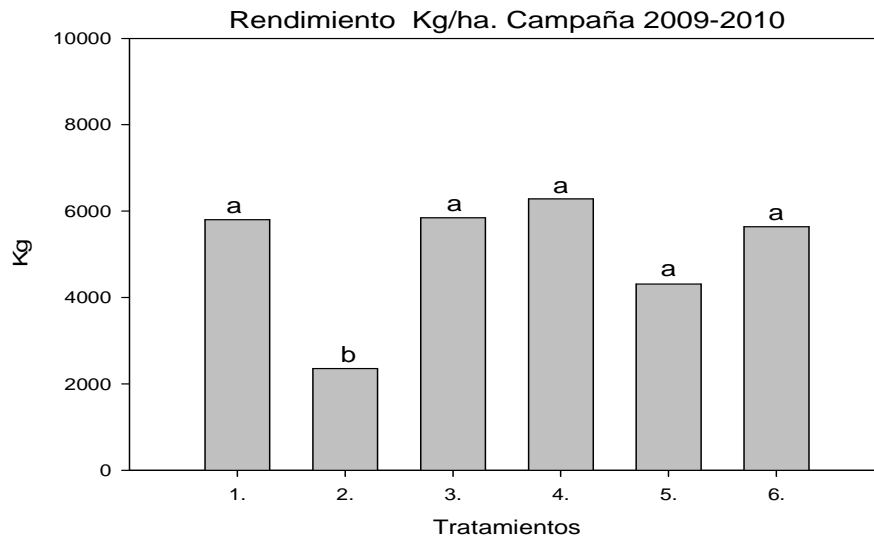
4.2.2 Rendimiento de maíz a cosecha

En la primera campaña la cosecha se realizó el día 5 de mayo de 2010 y en la segunda, el día 26 de mayo de 2011. En general se observaron mayores rendimientos en la campaña 2010-2011, como muestra la fig. VI.3.

En la campaña 2009-2010 el rendimiento promedio fue de 5043 kg/ha. El análisis estadístico demostró diferencias significativas entre los bloques aleatorios. La fig. VI.3.A, muestra el rendimiento promedio de los diferentes tratamientos correspondientes al bloque I y II. El mayor rendimiento se registró para T4 (*M. oleovorans*) con 6286 Kg/ha, el cual no se diferencio de los tratamientos 1, 3, 5 y 6; si resultó significativamente menor, el rendimiento de T2 (*B. amyloliquefaciens*) con 2362 Kg/ha.

En la campaña 2010-2011 el rinde promedio fue de 8672 kg/ha, siendo el mayor en T4 (*M. oleovorans*) con 9205,43 Kg/ha, el cual no se diferenció estadísticamente de los tratamientos 2, 3, 5 y 6. Resultó significativamente menor, el rendimiento de T1 (control) con 7235 kg/ha, como se observa en la fig. VI.3.B.

A)



B)

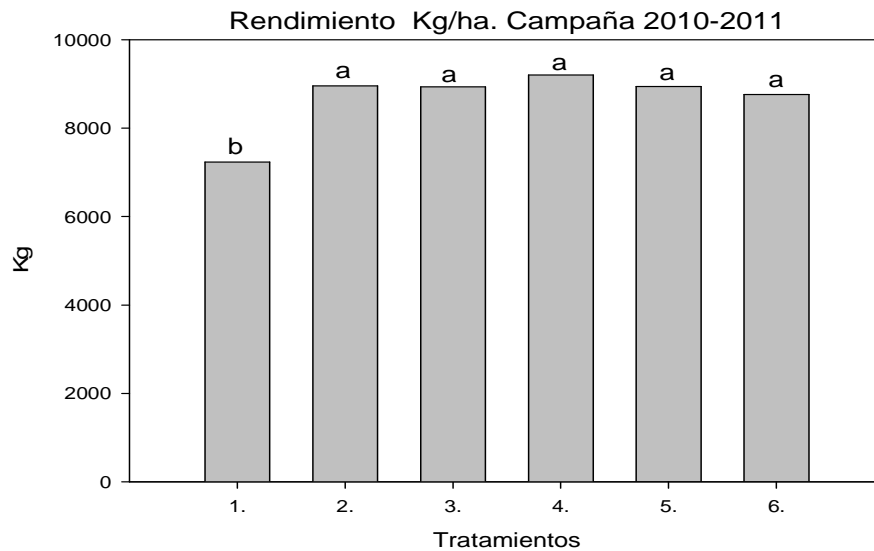


Fig. VI.3. Rendimiento de granos de maíz a cosecha (Kg/ha), media de tres bloques aleatorios. Tratamientos con diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$). **T1:** control (maíz + AP); **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + AP; **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* + AP; **T4:** Maíz + *M. oleovorans* + AP; **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* + AP; **T6:** Maíz + *F. verticillioides* + AP.

4.2.3. Identificación de especies de *Fusarium* aisladas de granos cosechados

La tabla VI.2 muestra las especies del género *Fusarium* identificadas por métodos convencionales en los diferentes bloques. Se destaca que *F. verticillioides* fue la única especie identificada en todos los tratamientos.

Tabla VI. 2. Especies del género *Fusarium* identificadas por bloques.

	Especie
Bloque I	100 % <i>F. verticillioides</i>
Bloque II	100 % <i>F. verticillioides</i>
Bloque III	100 % <i>F. verticillioides</i>

4.2.4. Contenido de Fumonisina B₁

Las tablas VI.3 y VI.4 detallan los valores detectados de FB₁, en las campañas de cultivo 2009-2010 y 2010-2011 respectivamente, en granos de maíz cosechados de todos los tratamientos.

En ambas campañas los niveles de fumonisinas fueron muy dispares entre iguales tratamientos de diferentes bloques, por lo que se compararon los valores de mediana.

Tabla VI.3. Contenido de FB₁ (ppb), valores de tres bloques aleatorios, campaña 2009-2010.

Tratamiento	Media ± SD	Mediana	Mínimo	Máximo
1	541,35 ± 846,25	69,3 d	36,45	1518,3
2	509,2 ± 657,4	197,9 b	65,4	1264,5
3	174,0 ± 159,3	123,0 c	46,4	352,6
4	155,9 ± 232,1	45,0 f	< 20	422,7
5	52,7 ± 26,0	66,8 e	22,7	68,6
6	513,2 ± 653,2	202,0 a	74,0	1263,8

T1: control (maíz + AP); **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + AP; **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* + AP; **T4:** Maíz + *M. oleovorans* + AP; **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* + AP; **T6:** Maíz + *F. verticillioides* + AP.

En la campaña 2009-2010 el máximo valor de mediana de FB₁ fue de 202 ppb correspondiente a T6, tratamiento inoculado con la cepa toxicogénica *F. verticillioides* M7075 al momento de la siembra. El menor nivel detectado fue en granos de T4 (*M. oleovorans*) con 45 ppb.

Tabla VI.4. Contenido de FB₁ (ppb), valores de tres bloques aleatorios, campaña 2010-2011.

Tratamiento	Media ± SD	Mediana	Mínimo	Máximo
1	654,8 ± 101,2	654,5 f	553,9	756,2
2	909,8 ± 737,9	1106,0 b	93,8	1530,2
3	793,6 ± 213,0	875,4 d	551,7	953,6
4	1231,6 ± 718,3	1230,0 a	514,4	1950,9
5	895,2 ± 383,2	757,0 e	600,3	1328,3
6	840,3 ± 558,2	1069,0 c	204,0	1247,9

T1: control (maíz + AP); **T2:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + AP; **T3:** Maíz + *B. amyloliquefaciens* + *F. verticillioides* + AP; **T4:** Maíz + *M. oleovorans* + AP; **T5:** Maíz + *M. oleovorans* + *F. verticillioides* + AP; **T6:** Maíz + *F. verticillioides* + AP.

En la campaña 2010-2011 se observaron reducciones en los niveles de fumonisinas al comparar el tratamiento 6, es decir el maíz inoculado con el patógeno, con los

tratamientos 3 y 4, en los que se realizó una co-inoculación del patógeno con los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*, respectivamente. Por otro lado, se observó una estimulación en los niveles de fumonisinas en los tratamientos 2 y 4, al comparar con los controles (T1 y T6).

Con los datos obtenidos en ambas campañas se realizó un estudio de correlación, se estudiaron las variables por tratamiento de cada ensayo, con la finalidad de comparar a través de los coeficientes de Pearson la correlación de los distintos tratamientos con las diferentes variables. De tal estudio se destaca en el primer ensayo una tendencia de correlación negativa entre las variables incidencia y rendimiento, aunque no significativa. Se puede interpretar una tendencia de todos los tratamientos que a $>$ incidencia de *F. verticillioides* $<$ rendimiento de granos a cosecha. En un segundo estudio de correlación entre variables de incidencia y rendimiento, de la campaña 2010-2011, se destaca que para T2 (CP:-0,249), T3 (CP:-0,589), T4 (CP:-0,774) y T5 (CP:-0,771), la tendencia de correlación es negativa, no significativa, indicando que dichos tratamientos, todos inoculados con los formulados de ACB, a $<$ incidencia de *F. verticillioides* tienden a aumentar el rendimiento de granos. Para T6 (CP: 1,000) y T1 (CP: 0,008) la tendencia de correlación es positiva; y en el caso de T6 significativo (P=0,00468), teniendo en cuenta que T6 es el control de *F. verticillioides*, y T1 el control de semilla, se destaca que a $>$ rendimiento de granos, $>$ es la incidencia de *F. verticillioides*.

5. Discusión

Se estudió por dos años consecutivos la influencia de dos formulados biofungicidas adheridos con aceite de parafina al 2%, sobre la incidencia de *Fusarium* y el contenido de fumonisinas en granos de maíz de plantas crecidas a campo.

La campaña 2009-2010 se caracterizó por tener un déficit de precipitaciones a diferencia de la campaña 2010-2011, en la cual fueron mayores (total: 561 mm) y estuvieron mejor distribuidas entre los meses de diciembre a marzo. Los bajos registros pluviométricos de la campaña 2009-2010 afectaron significativamente el rendimiento de granos a cosecha, con una media de 5474 kg/ha, significativamente menor al rendimiento medio obtenido en la campaña 2010-2011 (8672 kg/ha), favorecido positivamente por las condiciones climáticas. En los dos ensayos se observó que las

relaciones grano – marlo obtenidas, coincidieron con los informes de la variedad utilizada (Dekalb 747 MGRR2, anexo I), para la cual corresponde alrededor de 80-20% para la zona agroecológica de Río Cuarto, y en general, las plantas crecieron sanas sin síntomas de enfermedad aparente.

Al correlacionar el rendimiento de ambas campañas se pudo observar una tendencia de coeficientes de Pearson negativa, justamente entre ambas campañas existió una diferencia significativa ($P=0,002$). Teniendo en cuenta que el ensayo se llevó a cabo en el mismo campo, se utilizó la misma simiente (maíz de segunda), el mismo formulado, el mismo adhesivo, se sembró y cosechó en fechas similares e iguales condiciones, las únicas variables responsables de la diferencia de rinde rendimiento niveles de toxinas son las medioambientales, principalmente precipitaciones y temperatura, condiciones que generaron en las plantas de maíz de la primer campaña un importante estrés hídrico en etapas claves del cultivo, afectando el llenado de los granos y consecuentemente, el rendimiento a cosecha, a diferencia de la segunda campaña, donde las plantas no sufrieron tales situaciones de estrés.

Por otro lado, cabe destacar que en ambas campañas de cultivo, la incidencia de *F. verticillioides* en granos cosechados no mostró diferencias significativas entre tratamientos y controles, sin embargo se observaron diferencias significativas en el contenido de fumonisinas, que demuestra que no existe una correlación entre el contenido de toxina y la incidencia del patógeno en los granos. En la campaña 2009-2010, que registró un déficit de precipitaciones, los niveles de FB₁ fueron muy bajos, el mayor nivel de mediana de FB₁ fue 202 ppb para T6 (*F. verticillioides*), a diferencia de la campaña 2010-2011, que registró mayor contenido de humedad, se detectaron mayores niveles de FB₁, con una mediana para T6 de 1069 ppb.

En ensayos realizados en el mismo campo, la contaminación por micotoxinas no es necesariamente la misma de un año a otro. Hennigen y col. (2000) encontraron en Argentina una marcada diferencia en términos de la contaminación con fumonisinas para las mismas variedades de maíz durante dos temporadas de cultivo consecutivas, debido al hecho de que las condiciones ambientales difieren de una temporada a otra. Del mismo modo Pereira y col. (2010) en ensayos a campo previos con ambos ACB, en las campañas 2006-2007 y 2007-2008, demostraron que las variables climáticas juegan un rol fundamental en el contenido de fumonisinas. Por lo tanto, se puede inferir con datos de cinco años consecutivos de ensayos a campo que el factor clave que induce la biosíntesis del metabolito secundario, no sería solo la disponibilidad de agua, sino la

interacción de un conjunto de factores que generan una condición de estrés para el cultivo y el patógeno.

El objetivo planteado para ambos ensayos a campo, fue determinar la eficacia del adhesivo aceite de parafina en el proceso de bacterización de las semillas con los formulados liofilizados, sin alterar la efectividad de los biocontroladores.

Al comparar los tratamientos evaluados en el ensayo a campo del Cap. IV (campana 2009-2010) con semillas bacterizadas sin adhesivo, determinamos que la aplicación de ambos formulados produjo reducciones significativas en el contenido de fumonisina B₁ en los granos de maíz. El formulado a base de *M. oleovorans* (T4), produjo una reducción del 77%, y el formulado a base de *B. amyloliquefaciens* (T2) causó una reducción del 50% aproximadamente. Dichos resultados coincidieron con los registrados en la campana 2007-2008 por Pereira y col. (2011), en la cual se evidenció una reducción del 81% con inóculos de *M. oleovorans* y del 47% con *B. amyloliquefaciens*. Tales resultados nos permitieron confirmar que los formulados liofilizados de ambos ACB, cultivados en medio a base de melaza con actividad acuosa modificada osmóticamente, tienen la capacidad de mantener el potencial de las cepas microbianas de disminuir el nivel de fumonisinas en granos a cosecha.

Por el contrario, al evaluar los datos obtenidos durante las dos campañas consecutivas con los mismos tratamientos y el adhesivo aceite de parafina, no observamos los mismos resultados. Las simientes bacterizadas con los formulados y el adhesivo, no generaron una reducción significativa del contenido de la toxina en los granos cosechados. En el primer ensayo, campana 2009-2010, los tratamientos T4 (*M. oleovorans* + AP) y T5 (*M. oleovorans* + *F. verticillioides* + AP) generaron una leve reducción (35% y 3%, respectivamente) con respecto al control (T1), y los tratamientos con el formulado a base de *B. amyloliquefaciens* (T2 y T3) produjeron un aumento significativo del nivel de toxina (287 % y 178%, respectivamente). En el segundo ensayo, campana 2010-2011, el menor nivel de fumonisinas se registró en el tratamiento control (T1) con 655 ppb, cabe destacar además, que los tratamientos T2 (*B. amyloliquefaciens* + AP) y T4 (*M. oleovorans* + AP) registraron los mayores niveles de toxina, con 1106 y 1230 ppb respectivamente, un nivel incluso mayor que T6 (*F. verticillioides*). Estos datos sugieren que la aplicación de los formulados liofilizados de los agentes de biocontrol en combinación con el aceite de parafina, generan una posible estimulación de la biosíntesis de fumonisinas.

Como vimos en el Cap. III, el proceso de bacterización implica el uso de adhesivos, que permiten adherir el formulado a la superficie de la semilla, sin alterar la germinación de las mismas, ni el potencial de biocontrol de los agentes microbianos que se apliquen en la simiente (Scott, 1989). En base a los resultados obtenidos durante dos campañas consecutivas, concluimos que la bacterización de las semillas con los formulados liofilizados y aceite de parafina como adhesivo, no es un método adecuado de aplicación de los formulados liofilizados de los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans*. En los ensayos *in vitro* seleccionamos el aceite de parafina como adhesivo, dado que el mismo nos permitió obtener un pelleteado uniforme, permitió mantener la mayor viabilidad durante el almacenamiento previo a la siembra y además, no afectó la germinación ni el crecimiento de las plántulas en el ensayo de invernadero. En los ensayos a campo, el agregado de aceite de parafina en el proceso de bacterización, demostró limitar y alterar la capacidad de ambas cepas bacterianas de reducir los niveles de fumonisinas en los granos a cosecha. En el Cap. III determinamos que los adhesivos utilizados en el ensayo *in vitro* son factores que pueden generar estrés a la planta, reduciendo el índice de estrés S/R (Kozdrój y col., 2004), sin embargo, el aceite de parafina no afectó de manera significativa dicho índice. Es posible también, que el adhesivo impermeabilice la cutícula de la semilla, impidiendo el paso de los ACB, imposibilitando así el control del patógeno endófito.

Bardin y Huang (2003) al determinar la eficacia de diferentes adhesivos en la bacterización de semillas de remolacha con materia orgánica y los agentes de biocontrol del damping-off, comprobaron que ninguno de los adhesivos probados aumentó significativamente el recuento bacteriano en las semillas en comparación con las semillas bacterizadas con agua. La bacterización de semillas con suspensiones de agua ha sido utilizada para la aplicación de ACB en semillas de tomate y colza, resultando un procedimiento de recubrimiento exitoso, y además, permitiendo un eficaz control de las enfermedades de marchitamiento (Nejad y Johnson, 2000).

El proceso simple de humectar los formulados liofilizados con agua para adherirlos a las semillas, permite mantener la capacidad y efectividad de ambos ACB. Si bien los resultados obtenidos con este proceso son similares a los obtenidos con la aplicación de inóculos líquidos en medio de cultivo, contamos con la ventaja adicional que implica la producción, almacenamiento y manipulación de un formulado liofilizado.

CONCLUSIONES PARCIALES

Adaptación fisiológica de los agentes de control biológico

- *Bacillus amyloliquefaciens* y *Microbacterium oleovorans* mostraron mejor tolerancia a la baja a_w en medio líquido y alta supervivencia al estrés por calor, luego de la manipulación fisiológica en medios de cultivo.
- Es posible mejorar la tolerancia de ambos ACB al estrés *in vitro*, lo cual favorece el rendimiento durante el proceso de formulación, y permite a las células mejorar la tolerancia al estrés hídrico de la rizósfera de maíz.
- *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* poseen capacidad de sintetizar glicina-betaína y ectoína bajo condiciones de estrés osmótico.
- La manipulación ecofisiológica, sobre todo la escasez de agua, puede aumentar el potencial de control biológico de *F. verticillioides* en el campo, bajo rangos de a_w más amplios.

Producción del inóculo de los agentes de biocontrol

- El medio de cultivo MSB fue el elegido para la producción de biomasa de ambos ACB, debido al alto crecimiento y buena producción de biomasa, como también alta supervivencia luego del liofilizado.

Incorporación del biofungicida a la semilla. Estudio de invernadero.

- La mayor viabilidad de *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* en semillas pelleteadas, se obtuvo con el formulado liofilizado a las a_w 0,97 y 0,96; y aceite de parafina (AP) como adhesivo.
- El recuento de *B. amyloliquefaciens* disminuyó a 5 log UFC/g de semilla luego de 21 días de almacenamiento y *M. oleovorans* a 4 log UFC/g de semilla.
- El adhesivo AP no afectó el crecimiento de plántulas de maíz.
- El pelleteado de semillas, es un proceso eficaz de aplicación de los ACB, favoreciendo la colonización y proliferación de los endófitos antagonistas, además dicho proceso, es sencillo y factible de aplicar en el campo.

Ensayo a campo con semillas bacterizadas con formulado liofilizado y agua como adhesivo

- *F. verticillioides* provocó una reducción de la actividad edáfica (amilolítica, celulolítica y nitrificante) en el suelo no rizosférico de la planta de maíz.
- Los ACB *B. amyloliquefaciens* y *M. oleovorans* no afectaron significativamente la microbiota nativa.
- La concentración de fumonisina B₁ en granos de maíz cosechados, fue reducida significativamente por los ACB. El tratamiento de las simientes con *M. oleovorans* produjo una reducción mayor al 70% y el tratamiento con *B. amyloliquefaciens* mayor al 50%.
- La aplicación pre-siembra del formulado liofilizado de ambos ACB en la simiente de maíz, podría significar una importante mejora en la calidad de los granos obtenidos a cosecha.

Incidencia de *Fusarium verticillioides* y contenido de fumonisinas en granos de maíz de plantas con inflorescencias femeninas cubiertas y no cubiertas

- La cobertura de las inflorescencias femeninas desde la floración hasta la cosecha, no impidió la infección de los granos de maíz por *F. verticillioides*.
- El incremento de temperatura y humedad dentro de la bolsa de papel sobre las mazorcas, favoreció el incremento de los niveles de fumonisinas en granos cosechados.

Ensayo a campo con semillas bacterizadas con formulado liofilizado y aceite de parafina como adhesivo

- La aplicación pre-siembra del formulado mejorado fisiológicamente a la a_w 0,97 y aceite de parafina al 2% como adhesivo, no produjo reducción del contenido de fumonisinas en granos a cosecha, durante dos campañas de cultivo consecutivas.
- La bacterización de las semillas con formulados liofilizados y agua, como humectante y adhesivo, es un proceso factible de realizar en el campo, y permite mantener la capacidad y efectividad de ambos agentes de biocontrol sobre la reducción de los niveles de fumonisina B₁.

ASPECTOS DE LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA A DESTACAR

- Los formulados biológicos elaborados poseen actividad biofungicida, se aplican a la semilla en el momento de la siembra como un curasemilla, y protegen la simiente, la planta y el fruto del maíz, reduciendo el contenido de toxinas peligrosas para la salud humana en el grano cosechado.
- Los productos obtenidos son compatibles con los curasemillas convencionales utilizados, se pueden aplicar y obtener los mismos efectos en semillas comerciales previamente curadas.
- Los formulados de ambos agentes de biocontrol otorgan protección a la planta de maíz para una micotoxina regulada por mercados internacionales.
- Ambos formulados son inocuos, no producen efectos colaterales sobre los microorganismos nativos, ni sobre las actividades microbianas del ecosistema del suelo, protegiendo el medio ambiente donde se apliquen; además no dejan residuos, no generan resistencia.
- El proceso de producción de los formulados y los insumos requeridos son económicos, con lo cual el producto final sería de bajo costo en el mercado.
- En cuanto a la competencia comercial de los formulados, no existe en el mercado nacional e internacional actual un producto con las mismas características.

Conclusión final

“Los formulados liofilizados elaborados con los agentes de biocontrol Bacillus amyloliquefaciens y Microbacterium oleovorans, son productos con acción biofungicida de aplicación pre-siembra, capaces de producir una reducción significativa del contenido de fumonisinas en granos a cosecha. Ambos formulados son productos ambientalmente seguros, de bajo costo y fácil aplicación en el campo.”

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Trabajos publicados

1) “Impact of osmotic/matric stress and heat-shock on environmental tolerance induction of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides*”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. 2010. *Research in Microbiology* 161: 681-686.

2) “Production of *Fusarium verticillioides* biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans* using different growth media and evaluation of biomass freeze-drying”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. 2012. Food additives and contaminants. *Food Additives and Contaminants (Part A)* 29 (2): 287-292.

3) “Accumulation of the betaine and ectoine in osmotic stress adaptation of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* in maize”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. 2012. *Agricultural Sciences* 3(1) : 83-89.

Trabajos enviados en revisión

1) “Biological formulations for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize at field level”. Sartori, M., Nesci, A., Castillo, C., Etcheverry, M. *Biological agriculture and horticulture*.

2) “*Fusarium verticillioides* infection and fumonisins content in maize grains with covered and uncovered female inflorescens”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. *International Journal of Agronomy*.

Capítulos de libro

1) “Biological Strategy Applied to Maize Preharvest Agroecosystem in Argentina to Prevent Fumonisin Contamination”. Etcheverry, M., Nesci, A., Pereira, P., Sartori, M. In: *Mycotoxins: Properties, Applications and Hazards*. Eds: Melborn, B. and Greene, J. Año: 2011. ISBN: 978-1-62100-644-2.

Presentaciones a congresos

- 1) “Impact of osmotic/matric stress and heat-shock on environmental tolerance induction of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides*”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. ISM Conference 2009. Worldwide Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains. Tulln, Austria. 9-11 Septiembre de 2009.

- 2) “Production of *Fusarium verticillioides* biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans* using different growth media and evaluation of biomass freeze-drying”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. VI Congreso Latinoamericano de Micotoxicología y II Symposium International de Toxinas de Hongos y Algas para la Industria. Mérida, Yucatán, México. 27 Junio al 2 de Julio de 2010.

- 3) “Efficacy of stickers in the application of the biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans* on the maize seed”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. VI Congreso Latinoamericano de Micotoxicología y II Symposium International de Toxinas de Hongos y Algas para la Industria. Mérida, Yucatán, México. 27 Junio al 2 de Julio de 2010.

- 4) “Accumulation of the betaine and ectoine in osmotic stress adaptation of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* in maize”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M., Magan, N. IMC9: The Biology of Fungi. Edinburgh, UK. 1-6 Agosto 2010.

- 5) “Selección de adhesivos para la bacterización de semillas de maíz con agentes de control biológico de *Fusarium verticillioides*”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. XII Congreso Argentino de Micología y XXII Jornadas Argentinas de Micología 2011. Posadas, Misiones, Argentina. 15 al 17 de junio de 2011.

- 6) “Comparison of *Fusarium verticillioides* incidence and fumonisins content in maize grains from plants with female inflorescences covered and uncovered”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. ISM Conference 2011. “Strategies to reduce the impact of mycotoxins in Latin America in a global context”. Mendoza, Argentina. 15 al 18 de Noviembre 2011.

7) “Native bacterial formulations for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize at field level”. Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. WMFmeetsIUPAC 2012. Rotterdam, Holanda. 5- al 9 de Noviembre de 2012.

Premios obtenidos

1) INNOVAR 2011, Categoría: Investigación aplicada “Biofungicida para el control de fumonisinas en maíz”. Miriam Etcheverry, Andrea Nesci, Paola Pereira, Melina Sartori. Otorgado por la Secretaría de Planeamiento y Políticas en Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Presidencia de la Nación Argentina.

Registro de propiedad intelectual

1) Patente de invención N° de solicitud 10226409: “Bioformulado biofungicida a base de *Microbacterium oleovorans*”. Autores: Etcheverry, M., Nesci, A., Pereira, P., Sartori, M. Fecha: 18/11/2010. Campo de aplicación: Sanidad vegetal – prevención. Administración Nacional de Patentes del Instituto Nacional de la Producción Industrial de Argentina (I.N.P.I). Examen preliminar aprobado: Noviembre 2011. N° Expediente 20100104257.

2) Patente de invención en trámite N° de solicitud 10226405: “Bioformulado biofungicida a base de *Bacillus amyloliquefaciens*”. Autores: Etcheverry, M., Nesci, A., Pereira, P., Sartori, M. Fecha: 18/11/2010. Campo de aplicación: Sanidad vegetal – prevención. Administración Nacional de Patentes del Instituto Nacional de la Producción Industrial de Argentina (I.N.P.I).

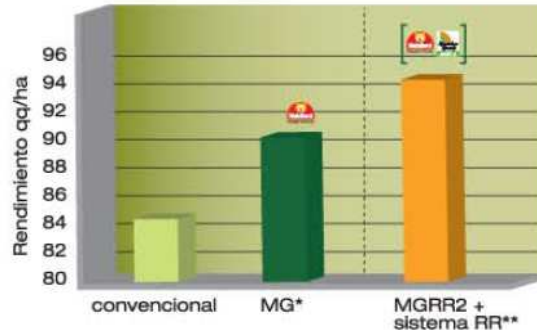
Anexo I

Simiente utilizada en ensayos *in Vitro* y en ensayos a campo.

MGRR2

La alternativa de mayor rendimiento**

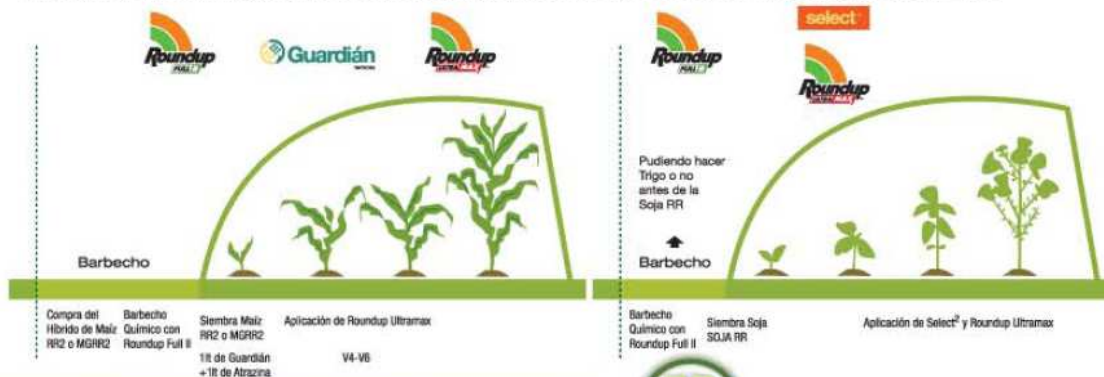
La tecnología **MGRR2** actúa protegiendo al maíz de los factores reductores del rendimiento (barrenador del tallo, isoca de la espiga y malezas) permitiendo que exprese su máximo potencial.



*fuente: Departamento de desarrollo de Monsanto Arg. (ECHOS 01-04) **fuente: Departamento de desarrollo de tecnologías de Monsanto Arg. (ensayos campañas 05-07)

Sistema RR

La aplicación del Sistema RR es clave para brindar la mayor protección al cultivo de la manera más eficiente. Dekalb recomienda la utilización de Roundup UltraMax para obtener el máximo rendimiento la mayor seguridad de su cultivo y que mantenga limpio su maíz en los primeros estadios con 1lt de Guardián y 1lt de Atrazina.



Control de Guachos en Soja



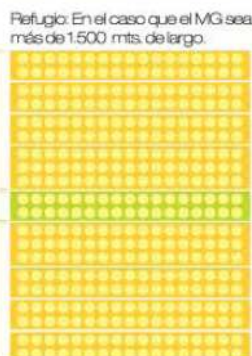
Programa RR

Dekalb recomienda:

- Realizar el control cuando el promedio de los guachos se encuentren en V4-V6.
- La utilización de Select² para el control de maíz RR2 guacho sobre cultivos de Soja RR, según recomendaciones de Bayer®.¹

Aplice la recomendación de manejo y obtenga el máximo retorno de su inversión. Obtenga **3 a 6 U\$S/ha** adicionales. Para mayor información ingrese en www.programarr.com.ar

Proteja su tecnología. Siembre 10% de Refugio



- 10% de Refugio
- Asegurar que no haya más de 1500 mts. lineales sin refugio
- No aplicar insecticida para control de Diatraea en el refugio
- Se pueden hacer controles tempranos sobre Spodoptera frugiperda.

El sistema MGRR2 nos permite realizar el refugio aprovechando los beneficios y rinde adicional del Maíz RR2.

SEGURIDAD DEKALB

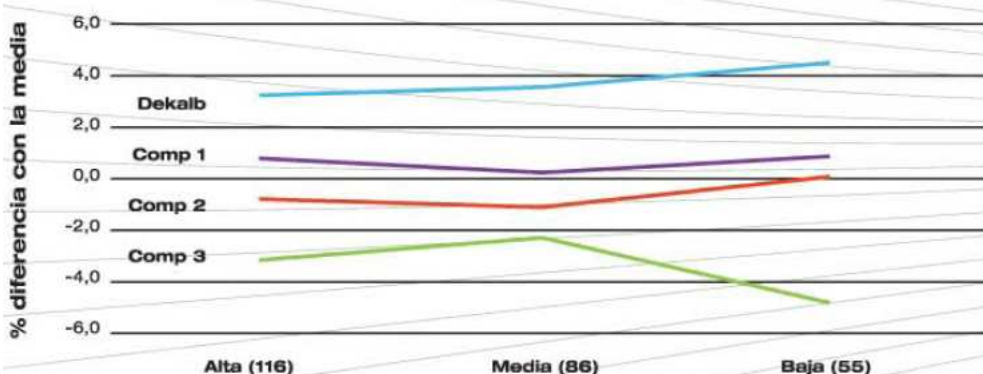
Frente a los diferentes factores de estrés que afectan al cultivo (clima, insectos, enfermedades, ambiente) DEKALB presenta la mejor defensa, incorporando las últimas tecnologías y selección de germoplasma, para maximizar el rinde:

Potencial de Rendimiento

Los híbridos DEKALB poseen el máximo potencial de rinde del mercado

Estabilidad

A través de años y diversos ambientes, los híbridos DEKALB muestran la mayor estabilidad de rendimiento, viéndose menos afectados por los factores de estrés que otros híbridos. Esta característica es uno de los pilares de DEKALB, que combinando la selección de germoplasmas tolerantes a enfermedades y condiciones ambientales, y las tecnologías de protección contra insectos y malezas, le dan a la planta energía adicional para proteger el rendimiento en condiciones adversas.



Fuente: ensayos propios (ECHOS) y de terceros, campañas 2006, 2007 y 2008.

Calidad de la semilla DEKALB

Nuestra semilla es producida bajo los más altos estándares de calidad internacionales, y bajo estrictos controles internos, que permiten garantizar el más alto Poder Germinativo y Prueba Fría del mercado. Entendiendo que un cultivo exitoso se logra asegurando un óptimo stand de plantas desde el inicio, sumamos el servicio DPS que complementa la propuesta de la marca.
Fuente: datos de análisis internos.

Mal de Río IV

Simplemente la mayor tolerancia del mercado frente al Mal de Río IV, lograda a través de un constante mejoramiento genético.

Dekalb y su correspondiente logo es una marca registrada de titularidad de Dekalb Genetics Corporation.

MaizGard, Roundup Ready2, Roundup UltraMax, Guardián, SD y sus correspondientes logos son marcas registradas de titularidad de Monsanto Technology LLC.

1. Bayer es una marca registrada del Grupo Bayer

2. Select es una marca registrada de Arysta LifeScience

© 2009 MONSANTO ARGENTINA S.A.I.C. Quedan todos los derechos reservados.

Para más información:

www.dekalb.com.ar

Centro de Atención al Cliente

0810-555-DEKALB (335252)

ANEXO II

I. Medios de cultivo

I.1. Agar nutritivo (AN)

Extracto de carne	3 g
Peptona de soya	5 g
CINa	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

I.2. Caldo nutritivo (CN)

Extracto de carne	3 g
Peptona de soya	5 g
CINa	8 g
Agua destilada	1000 ml

I.3. Agar tripteína soya (ATS)

Tripteína	15 g
Peptona de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

I.4. Caldo tripteína soya (CTS)

Tripteína	17 g
Peptona de soya	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g

Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar y calentar hasta disolver.

Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.

I.5. Agar Hojas de Clavel (CLA)

Agar	2 g
Agua destilada	100 ml

Hojas jóvenes de clavel

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Agregar 4-5 hojas de clavel jóvenes estériles por placa, cosechadas en las etapas de mayor desarrollo y libres de residuos de plaguicidas.

I.6. Agar agua

Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

I.7. Agar harina de maíz (MMEA)

Maíz molido	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

I.8. Nash- Snyder modificado (PCNB)

Peptona	15 g
PO ₄ H ₂ K	1 g
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	0,5 g
Agar ultra puro	20 g
Pentaclorodinitrobenzeno	1 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar hasta 45- 50°C, luego agregar 20 ml de una solución madre de sulfato de estreptomicina (5%) y 12 ml de una solución madre de neomicina (1%).

I.9. Medio a base de melaza (MSB)

Melaza	20 g
Peptona de soja	10 g
Agua destilada	1000 ml

I.10. Caldo nutritivo dextrosa (NYDB)

Caldo nutritivo	8 g
Dextrosa	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua destilada	1000 ml

I.11. Caldo Capellini- Peterson

Carboximetilcelulosa	1 g
$\text{NO}_3 \text{NH}_4$	1 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Extracto de levadura	1 g
Agua destilada	1000 ml
Ajustar pH a 7.	

II. Soluciones

II.1. Buffer fosfato salino (BPS):

CINa	8 g
ClK	0,2 g
PO_4HNa_2	1,15 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,2 g

II.2. Solución amonificante (A):

Asparagina	0,2 g
PO_4KH_2	0,25 g
SO_4Mg	0,125 g
CINa	0,125 g
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	0,0025 g
SO_4Mn	0,0025 g
Agua destilada	1000 ml

II.3. Solución celulolítica (C)

PO ₄ KH ₂	1 g
SO ₄ Mg	0,5 g
(SO ₄) ₃ Fe ₂	0,01 g
NO ₃ Na	0,5 g
Agua destilada	1000 ml

II.4. Solución nitrificante (N):

PO ₄ KH ₂	0,25 g
SO ₄ Mg	0,125 g
CINa	0,125 g
(SO ₄) ₃ Fe ₂	0,0025 g
SO ₄ Mn	0,0025 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,5 g
CO ₃ Ca	1 g
Agua destilada	1000 ml

II.5. Solución Derivatizante (para HPLC):

O- phthaldialdehido	40 mg
Metanol	1 mg
2- mercaptoetanol	50 µl
Tetraborato de Sodio	5 ml (0,1 M)

III. Reactivos

III.1. Reactivo de Nessler

Solución A

I ₂ Hg	50 g
IK	36,5 g
Agua destilada	100 ml

Solución B

KOH	150 g
Agua destilada	1000 ml

III.2. Reactivo Difenilamina sulfúrico

Difenilamina	10 g
SO ₄ H ₂	1000 ml
Agua destilada	200 ml

BIBLIOGRAFÍA

- Abadías, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Magan, N. 2001. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Can J Microbiol.* 47: 123-129.
- Abbas, H., Cartwright, R., Shier, W. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot.* 25: 1-9.
- Alabouvette, C., Couteaudier, Y., Louver, J. 1985. Soil suppressive to Fusarium wilt: Mechanisms and management of suppressiveness. Ecology and Management of soilborne Plant Pathogens. Am Phytopathol. Soc. St. Paul. MN.
- Ang, D., Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M., Georgopoulos, C. 1991. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem.* 266: 24233-24236.
- Ariño Moneva, A. 2008. Informe relativo a las micotoxinas fumonisinas. Grupo de trabajo, Comisión científica de la Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria. Universidad de Zaragoza.
- Armolick, N., Dickson, J. 1956. Minimum humidity requirements for germination of conidia of fungi associated with storage of grain. *Phytopathology.* 46: 462-465.
- Bacon, C., Nelson, P. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *J Food Protect.* 57(6):514-521.
- Bacon, C., Hinton, D. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can J Bot.* 74: 1195-1202.
- Bacon, C., Yates, I., Hinton, D., Meredith, F. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health. Perspect.* 109: 325-332.
- Bacon, C., Glenn, A., Yates, I. 2008. *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Rev.* 27: 411-446.
- Baker, K. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 25: 67-85.
- Baker, R., Dunn, P. 1990. Biologically Based Technologies. Baker, R., Dunn, P. (Eds). Pest Management American Chemical Society, Washington, DC.
- Baker, R., Paulitz, T. 1996. Theoretical basis for microbial interactions leading to biological control of soilborne plant pathogens. En: Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens. Hall, R. (Ed.). The American Phytopathol. Soc. St. Paul, MN. P. 50-79.
- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculation carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol.* 51: 1089-1098.
- Bardin, S., Huang, H. 2003. Efficacy of stickers for seed treatment with organic matter or microbial agents for the control of damping-off of sugar beet. *Plant Pathology Bulletin* 12: 19-26.

- Barros, G., Torres, A., Chulze, S. 2005. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *J. Sci. Food Agric.* 85: 2349 – 2353.
- Barros, G., Magnoli, C., Reynoso, M., Ramirez, M., Farnochi, M., Torres, A., Dalcero, M., Sequeira, J., Rubinstein, C., Chulze, S. 2009. Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina. *World Mycotoxin J.* 2: 53-60.
- Battilani, A., Pietri, A., Silva, A., Giorni, P. 2003. Critical control points for ochratoxin A control in the grape-wine chain. *J Plant Pathol.* 85: P. 285.
- BCCBa (Bolsa de Cereales de Córdoba), 2011. Sistema de Información Agroeconómica. Informe Especial N° 23 Maiz - Noviembre 2011.
- Benedetti, R., Nazzi, F., Locci, R., Firrao, G. 2006. Degradation of fumonisin B₁ by a bacterial strain isolated from soil. *Biodegradation* 17: 31-38.
- Berny, J., Hennebert, G. 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia.* 83: 805–815.
- Botelho, G., Guimaraes, V., De Bonis, M., Fonseca, M., Hagler, A., Hagler, L. 1998. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* colonizing the maize endorhizosphere in tropical soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 14: 499-504.
- Boyetchko, S., Pedersen, E., Punja, Z., Reddy, M. 1998. *Formulations of Biopesticides*. Hall F.R. & Barry J.W. Editores *En Methods in Biotechnology*, vol 5: 487-508. Humana Press, Totowa, NJ.
- Bremer, E., Kraemer, R., 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. En: *Bacterial Stress Responses*. Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.). ASM Press, Washington, D.C. P. 79-97.
- Bressan, W. 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *Biocontrol.* 48: 233-240.
- Brown, A. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol Rev.* 40: 803-846.
- Burges, H. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Burges, H. (Ed.), Kluwer Academic, Dordrecht. P. 1–6.
- Burges, H., Jones, K. 1998. Formulation of bacteria, viruses and Protozoa to control insects. En: *Formulation of Microbial Biopesticides*. Burges, H. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, London. P. 31–128.
- Bush, B., Carson, M., Cubeta, M., Hagler, W., Payne, G. 2004. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* 94: 88–93.
- Butt, T., Copping, L. 2000. Fungal biological control agents. *Pestic Outlook.* 11: 186-191.
- Cahagnier, B., Melcion, D., Richard-Molard, D. 1995. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiology.* 20: 247-251.

- Calvert, G., Plate, D., Das, R., Rosales, R., Shafey, O., Thomsen, C. 2004. Acute occupational pesticide-related illness in the US, 1998-1999: Surveillance findings from the SENSOR-pesticides program. *A J Ind Med.* 45:14-23.
- Cañamas, T., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., Solsona, C., Teixidó, N. 2008. Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 viability after spray-drying. *J Appl Microbiol.* 104: 767-775.
- Capellini, R., Peterson, J. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by sporulating strain of *Giberella zeae*. *Micología.* 57: 962 – 966.
- Cárcova, J., Borrás L., Ortegú, M. 2004. Maíz: ciclo ontogénico y períodos críticos. Producción de Granos. FAUBA. Disponible en <http://www.econoagro.com>.
- Carmona, M., Scandiani, M. 2011. Importancia y control de *Fusarium verticillioides* en semillas de maíz. Propuesta para su manejo. En: Enfermedades en maíz, Aapresid. Disponible en www.aapresid.org.ar.
- CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes), 2010. www.casafe.org.ar
- Cavaglieri, L., Passone, A., Etcheverry, M. 2004 (a). Screening procedures to select rhizobacteria with biocontrol activity on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Res Microbiol.* 155: 747-754.
- Cavaglieri, L., Passone, A., Etcheverry, M. 2004 (b). Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biol control.* 259-267.
- Cavaglieri, L., Andrés, L., Ibañez, M., Etcheverry, M. 2005 (a). Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterization and inoculum density. *A van Leeuw J microb.* 87 (3): 179-187.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, S., Chulze, S., Etcheverry, M. 2005 (b). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides*: in vitro and at the maize root level. *Res Microbiol.* 156 (5): 748-754.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Etcheverry, M. 2005 (c). In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. Effect of seed treatment on maize root colonization. *Lett Appl Microbiol.* 41 (5): 390-396.
- CE (Comisión Europea) 2000. Comité científico de la alimentación humana sobre las toxinas de *Fusarium*. Parte 3: Fumonisina B₁ (FB₁). pp.1-33 (Emitido el 17 de octubre de 2000).
- CE (Comisión Europea) 2003. Comité científico de la alimentación humana sobre las fumonisinas B₁, B₂ y B₃. (Emitido el 4 de abril de 2003).
- CE (Comisión Europea) 2007. Commission Regulation 1126/(2007) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off J Eur Union.* 255: 14–17.
- Cepal (Comisión Económica para América Latina y el Caribe), 2011. Colección Documentos de proyectos: Las empresas privadas de biotecnología en Argentina. Copyright © Naciones Unidas, enero de 2011.

- Chamley, L., Trenholm, H., Prelusky, D., Rosenberg, A. 1995. Economic losses and decontamination. *Nat toxins*. 3: 199-203.
- Chulze, S., Ramírez, M., Farnochi, M., Pascale, M., Visconti, A., March, G. 1996. Fusarium and fumonisins occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *J Agric Food Chem*. 44: 2797-2801.
- Chulze, S., Etcheverry, M., Lecumberry, S., Magnoli, C., Dalcerro, A., Ramirez, M.L., Pascale, M., Rodriguez, M. 1999. Fumonisin production on irradiated corn kernels: effect of inoculum size. *J. Food Protect*. 62: 814-817.
- Compant, C., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*. 71: 4951-4959.
- Cook, J., Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press. P. 539.
- Cook, R. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of pathogens. *Ann Rev Phytopathol*. 31: 53-80.
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Garcia, N., Viñas, I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol*. 89: 793-800.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., Viñas, I. 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 367-371.
- Correa, O., Montecchia, M., Berti, M., Fernández Ferrari, M., Pucheu, N., Kerber, N., García, A.F. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Appl Soil Ecol*. 41: 185-194.
- Cotten T., Munkvold G. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology*. 88:550-555.
- Crawley, M. 1997. Plant-herbivore dynamics. Plant ecology. Cap. 13. Crawley, M. (Ed.), Blackwell Science, Malden (MA), USA, p. 717.
- Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., Anchordoguy, T. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*. 27: 219-231.
- Csonka, L. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev*. 53: 121-147.
- Da Costa, M., Santos, H., Galinski, E. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. En: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol 61. Scheper, T. (Ed.). Berlin: Springer-Verlag. P. 117-153.
- Dallyl, H., Fox, A. 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. Gould, G.H., Corry, E.L. (Eds.), *Society of Applied Bacteriology Technical Series 15*, Academic press London, UK 219-139.

- Dawar, S., Sattar, A., Zaki, M. 2008. Seed dressing with biocontrol agents and nematicide for the control of root knot nematode on sunflower and okra. *Pakistan J Bot.* 40: 2683-2691.
- Deacon, J. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne plant pathogens. *Biocontrol Sci Technol.* 5-20.
- Dejonge, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E., Verstraete, W. 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol.* 3: 649-657.
- Dekalb, 2008. Descripción de parámetros agronómicos. Disponible en: www.dekalb.com.ar/includes/pop-maiz.php
- Desjardins, A., Plattner, M., Claffin, L. 1998. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. *Plant Dis.* 82: 953-958.
- Desjardins, A., Munkvold, G., Plattner, R., Proctor, R. 2002. *FUM1* a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol Plant-Microbe Interact.* 15: 1157-1164.
- Doko, M., Rapior, S., Visconti, A., Schjoth, J. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination maize genotypes grown in Europe and Africa. *J Agric Food Chem.* 43: 429-434.
- Eilenberg, J., Hakek, A., Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl.* 46: 387-400.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J., Wisniewski, M., Wilson, C. 2000. Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Dis.* 84: 249-253.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J., Brown, G., Ippolito, A., Wilson, C. 2001. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-Deoxy-d-glucose. *Biol control.* 20: 96-101.
- EMAN (European Mycotoxin Awareness Network), 2007. En www.mycotoxins.org.
- Emmert E., Handelsman, J. 1999. Biocontrol of Plant Disease: a (Gram-) Positive Perspective. *FEMS Microbiol Lett.* 171(1): 1-9.
- Etcheverry, M., Torres, A., Ramirez, M., Chulze, S., Magan, N. 2002. In Vitro control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. Proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *J Appl Microbiology* 92 (4): 624-632.
- Etcheverry, M., Scandolara, A., Nesci, A., Vilas Boas Ribeiro, M., Pereira, P., Battilani, P. 2009. Biological interactions to select biological agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from maize. *Mycopathologia* 167: 287 – 295.
- Evans, R., Kay, B., Young, J. 1975. Microenvironments of a dynamic annual community in relation to range improvements. *Hilgardia.*45:79-90

- Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W., Wingfield, M. 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *Afr J Biotechnol.* 2: 570-579.
- Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W., Wingfield, M. 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *Int J Food Microbiol.* 99: 173–183.
- FAO, 1993. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y Nutrición, N° 25. Roma. Disponible en: <http://www.FAO.org>.
- FDA, 2001. Guidance for Industry Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds. En: www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm134663.
- Federico, F., Funes, G., Salas, M., Resnick, S. 2010. Natural occurrence of fumonisins in corn puff in Argentina. *Mycotox res.* 26: 273 – 278.
- Fernando, W., Miller, J., Seaman, W., Seifert, K., Paulitz, T. 2000. Daily and seasonal dynamics of airborne spores of *Fusarium graminearum* and other *Fusarium* species sampled over wheat plots. *Can J Botany* 78: 497-505.
- Fitt, B., McCartney, H., Walklate, P. 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Ann rev phytopathology* 27: 241-270.
- Folcher, L., Delos, M., Marengue, E., Jarry, M., Weissenberger, A., Eychenne, N., Regnault-Roger, C. 2010. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agron Sustain Dev.* 30: 711-719.
- Fravel, D., Marois, J., Lumsden, R., Connick, W. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* 75: 774-777.
- Fravel, D., Rhodes, D., Larkin, R. 1999. Production and commercialization of biocontrol products. En: *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse* Albajes, R. (Ed.). Crops. 365-376.
- Frioni, L. 2006. Análisis de la actividad microbiana. Microbiología básica, ambiental y agrícola. Universidad de la República. Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.
- Galinski, E., Truper, H. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 15: 95-108.
- Gatch, E., Hellmich, R., Munkvold, G. 2002 A comparison of maize stalk rot occurrence in Bt and non- Bt hybrids. *Plant Dis.* 86: 1149-1155.
- Gimeno, A., Martins, M. 2006. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans. Special Nutrients Inc. USA. Victor Mireles Communications(Ed.). Mexico City. P. 1-127
- GLM (Gruppo Lavoro micotossine), 2007. Fourth *Fusarium* Forum hosted by the European Commission, Brussels 15-16 January 2007.
- Göller, K., Ofer, A., Galinski, E. 1998. Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.* 161: 293–300.

- González Alquinzones, U. 1995. El maíz y su conservación. Trillas (Eds.), México. ISBN: 968-24-4832-8. P. 399.
- González, M., Incremona, M., Ghio, A., Botta, G. 2004. Patógenos fúngicos prevalentes en granos de maíz en la zona maicera núcleo argentina. Revista de investigaciones de la Fac. Cs Agrarias. UNR- 6: 65-68.
- Hallsworth, J., Magan, N. 1994 (a). Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. *Proc Brit Crop Prot Conf Pests Dis.* 8D: 1091-1096.
- Hallsworth, J., Magan, N. 1994 (b). Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology-U.K.* 140: 2705-2713.
- Hammond, B., Campbell, K., Pilcher, C., DeGooyer, T., Robinson, A., McMillen, B., Spangler, S., Riordan, S., Rice, L., Richard, J. 2004. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1390-1397.
- Harman, G., Jin, X., Stasz, T. 1991. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum*. *Biol Control.* 1: 23-28.
- Harman, G. 1992. Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *J Plant Nutr.* 15: 835-843.
- Hebbar, K., Davey, A., Dart, P. 1992. Rhizobacteria of maize antagonistic to F. Moniliforme, a soil-borne fungal pathogen: isolation and identification. *Soil Biol Biochem.* 24: 979-987.
- Hecker, M., Völker, U. 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the - B regulon. *Mol Microbiol.* 29: 1129-1136.
- Heinl, S., Hartinger, D., Thamhesl, M., Vekiru, E., Krska, R., Schatzmayr, G., Moll, W., Grabherr, R. 2010. Degradation of fumonisin B₁ by the consecutive action of two bacterial enzymes. *J. Biotechnol.* 145: 120-129.
- Hennigen, M., Valente Soares, L., Sanchez, S., Di Benedetto, N., Longhi, A., Eyhéabide, G., Torroba, J., Zanelli, M. 2000. Fumonisin in corn hybrids grown in Argentina for two consecutive seasons. En: Proceeding of the Xth international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins. De Koe, W., Samson, R., van Egmond, H., Gilbert, J., Sabino, M. (Eds.). Guarujá, Brazil. P. 331-339.
- Hofstein, R., Fridlender, B., Chaulutz, E., Droby, S. 1994. Large scale production and pilot testing of biocontrol agents of postharvest diseases, Biological Control of postharvest Diseases – Theory and practice. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. P. 89.
- Hope, R., Aldred, D., Magan, N. 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* on wheat grain. *Lett Appl Microbiol.* 40: 295-300.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr.
- ILSI (Internacional Life Sciences Institute), 2006. “Maíz y nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal”. Recopilación de ILSI Argentina, vol. 2. Serie de Informes Especiales.

- Imrie, F. 1969. Fermentation media. Sugar and molasses. *Process Biochem.* Jan: 34-35.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), 2009. Economía del cultivo de maíz. Disponible en: www.inta.gov.ar/info/documentos/economía.htm.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), 2011. Control biológico de Carpocapsa. www.inta.gov.ar/control%20biologico%20carpocapsa.pdf
- INTA precop II. 2011. Evolución del sistema productivo agropecuario argentino. Actualización técnica N°69. Disponible en: www.cosechaypostcosecha.org.
- ISAAA, 2012. Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas. Disponible en www.isaaa.org.
- James, R., Perez, R., Dumroese, R., Wenny, D. 2000. Virulence of *Fusarium oxysporum* on Douglas-fir germinants: comparison of isolates from nursery soil and roots of healthy and diseased seedlings. En: Proceedings of the Fourth Meeting of IUFRO Working Party S7.03-04, Finland. Ed: Lilja, A., Sutherland, J. Research Paper 781. pp. 49–64.
- Janisiewicz, W., Jeffers, S. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection.* 16: 629-633.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. Fifty-sixth meeting, Geneva, 6-15 February 2001. P. 1-33.
- Jones, M., Burton, J., Vaughn, C. 1978. Role of inoculation in establishing subclover on California annual grasslands. *Agron J.* 70: 1081-1085.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaen, M. 2008. Relationship between solute and matrix potential stress, temperature, growth and FUM 1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Appl Environ Microbiol.* P. 2032–2036
- Kaczewer, J. 2006. Uso de agroquímicos en las fumigaciones periurbanas y sus efectos nocivos sobre la salud humana. www.grr.org.ar/trabajos/agrotóxicos.
- Kalia, A., Mudhar, R. 2011. Biological Control of Pests. En: Bioargumentation, Biostimulation and Biocontrol. Soil Biology. Singh, A. y col. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P. 223 – 240.
- Kemmett, A. 1998. The rhizosphere and rhizosphere. Principles and Applications of upper saddle River, New Jersey. P. 550.
- Kempf, B., Bremer, E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 170: 319-330.
- Kerry, B. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *J Nematol.* 22: 621-631.
- Kieferr, M., Mahurin, R. 1997. Chronic neurologic effects of pesticide overexposure. *Occupational Medicine* 12: 291-304.
- Kirk, J., Beaudette, L., Hart, M., Moutoglou, P., Kilironomos, J., Lee, H., Trevors, J. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods.* 58: 169-188.

- Kloepper, J., Schroth, M. 1981. Development of powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*. 71: 590–592.
- Kloepper, J., Rodriguez-Kabana, R., McInroy, J., Young, R. 1992. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-rot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant soil*. 139: 75-84.
- Kóhl, J., Fokkena, N. 1998. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. En: *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Boland, G., Kuykendall, L. (Eds). New York: Marcel Dekker, Inc. P. 49-88.
- Kommedahl, T., Windels, C. 1981. Introduction of microbial antagonists to specific court of infection: seed, seedling and wounds. *Biological Control in Crop Production*. P. 227-248
- Kozdrój, J., Trevors, J., van Elsas, J. 2004. Influence of introduced potential biological control agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 36:1775-1784.
- Kraus, T., Bianco, C., Núñez, C. 1999. Los ambientes naturales del sur de la provincia de Córdoba. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto (Ed.), Río Cuarto, Córdoba, Argentina. P. 112.
- Kuhlmann, A., Bremer, E. 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Appl Environ Microbiol*. 62: 259-261.
- Kunte, H., Galinski, E., Trüper, H. 1993. A modified FMOC-method for detection of amino acid-type osmolytes and tetrahydropyrimidines (ectoines). *J Microbiol Methods* 17: 129–136.
- Lahdenpera, M. 2003. Streptomices biofungicides in seed application. *Veradera Infoletter* 12: 1-3
- Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. 2003. Drying of Conidia of *Penicillium oxalicum*, a Biological Control Agent against *Fusarium* Wilt of Tomato. *J Phytopathol*. 151: 600-606.
- Lawlor, P., Lynch, P. 2001. Mycotoxins in pig feeds 1: source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. *Peer review*. 54(3): 117-120.
- Lebars, J., Lebars, P., Dupuy, J., Boudra, H., Cassini, R. 1994. Biotic and abiotic factors in Fumonisin B1 production and stability. *J Aoac Int*. 77 (2): 517-512.
- Lentzen, G., Schwarz, T. 2006. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 72: 623–34.
- Leslie, J., Summerell, B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual, Blackwell Profesional, Ames.
- Lewis, J. 1991. Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. En: *The Rhizosphere and Plant Growth*. Keister D., Cregan P. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. P. 279-287.
- Liddel, C., Burgess, L. 1985. Survival of *F. moniliforme* at controlled temperature and relative humidity. *Transaction of the British Mycological Society* 84: 121-130.
- Li, B., Tian, S. 2006. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *J Appl Microbiol*. 100: 854–861.

- Liendo, M., Martin, G. 2004. Maíz Fisiología y Cultivo. Rectorado de la Universidad Nacional de Tucumán (Ed.), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. P. 366.
- Lindermann, R. 1991. Mycorrhizal interactions in the rhizosphere. En: The Rhizosphere and Plant Growth. Keister D., Cregan P. (Eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. P. 343-348.
- Lino, C., Silva, L., Pena, A. 2004. Fumonisin: presence in foods, health implications and legislative aspects. *Rev Port Cien Vet.* 99: 181-192.
- London, L., De Grosbois, S., Wesseling, C., Kisting, S., Rother, H., Mergler, D. 2002. Pesticide usage and health consequences for women in developing countries: out of sight, out of mind?. *Int.J. Occup Environ Health* 8: 46-59.
- Louis, P., Trüper, H., Galinski, E. 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41: 684–688.
- Lumsden, R., Lewis, J. 1989. Biotechnology of fungi for improved plant growth. Problems and progress in the selection, production, formulation and commercial use of plant disease control fungi. London: British Mycological Society. P. 171–190.
- Lumsden, R., Lewis, J., Fravel, D. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. Hall F.R. & Barry J.W. (Eds.) En: Biorational Pest Control Agents. Formulation and delivery. American Chemical Society, Washington, DC.
- Magan, N., Whipps, J. 1988. Growth of *Coniothyrium minium*, *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum* and *T. Viride* from alginate pellets and interaction with water availability. *Bulletin OEPP.* 18: 37-45.
- Magan, N. 2007. Fungi in extreme environments. En: The Mycota. IV. Environmental and microbial relationship. Kubicek, C., Druzhinia, I. (Eds.) Springer Verlag. Berlin, Germany. P. 85-103.
- Maiorano, A., Reyneri, A., Sacco, D., Magni, A., Ramponi, C. 2009. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protect.* 28: 243-256.
- MAIZAR (Asociación Maíz Argentino). 2004. Clusters Regionales de Maíz para la producción de Proteínas de Origen Animal. Disponible en: www.maizar.org.ar.
- Mallman, C., Dilkin, P. 2007. Micotoxinas e micotoxicosis em suínos. Sociedade Vicente Pallotti-Ed. Brasil. P. 1- 238.
- Marasas, W. 1995. Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural toxins.* 3: 193 – 198.
- Marasas, W., Miller, J., Riley, R., Visconti, A. 2000. Fumonisin B₁. Environmental Health Criteria 219. WHO, Geneva.
- Marin, S., Sanchis, V., Magan, N. 1995. Water activity, temperature and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Can J Microbiol.* 41 (12): 1063-1070.

- Marin, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, A., Viñas, I., Magan, N. 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can J Microbiol.* 42 (10): 1045-1050.
- Marin, S., Magan, N., Belli, N., Ramos, A.J., Canela, R., Sanchis, V. 1999 (a). Two dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxigen formation in maize grain. *Int J Food Microbiol.* 41: 1063-1070.
- Marin, S., Magan, N., Serra, A., Ramos, A., Canela, R., Sanchis, V. 1999 (b). Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *J Food Sci.* 64: 921-924.
- Marin, S., Homedes, V., Sanchis, V., Ramos, A., Magan, N. 1999 (c). Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. *J Stor Prod Res.* 35: 15–26.
- Martinez, M., Moschini, R., Barreto, D., Bodega, J., Comerio, R., Forjan, H., Piatti, F., Presello, D., Valentinuz, O. 2010. Factores ambientales que afectan el contenido de fumonisina en granos de maíz. *Trop Plant Pathol.* 35 (5): 277 – 284.
- McGee, D. 1998. Maize disease. APS Press. St Paul Minnesota. EUA. P. 150.
- Merrill, A., Sullards, M., Wang, E., Voss, K., Riley, R. 2001. Environmental Health Perspectives. 109 Suppl. 2: 283 – 289.
- Minuto, A., Migheli, Q., Garibaldi, A. 1995. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of Fusarium wilt of cyclamen. *Crop protection.* 14: 221-226.
- Miller, J., Savard, M., Schaafsma, A., Seifert, K., Reid, L. 1995. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. *Can J Plant Pathol.* 17: 233–239.
- Miller, J. 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ Health Perspectives* 109 (2): 321-324.
- Millier, W., Bensin, R. 1974. Tailoring pelleted seed coatings to soil moisture conditions. *NY Food Life Sci.* 7(1): 20-23.
- Mishra, P. 1989. Relationship between ethanol and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 30: 194–198.
- Moenne-Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'Connor, B., O'Gara, F. 1999. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F 113. *J Appl Microbiol.* 86: 108-116.
- Morbach, S., Krämer, R. 2002. Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem.* 3: 384-397.
- Muller, H., Berg, G. 2008. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. *Biocontrol.* 53: 905-916.

- Munkvold, G., Desjardins, A. 1997 Fumonisin in maize. Can We Reduce Their Occurrence? *Plant Dis.* 81(6): 556-565).
- Munkvold, G., Hellmich, R., Rice, L. 1999. Comparison of fumonisin concentration in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Dis.* 83: 130-138.
- Munkvold, G. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Ann Rev Phytopathol.* 41: 99-116.
- Musson, G., McInroy, J., Kloepper, J. 1995. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Sci Technol.* 5: 407 – 416.
- Navaratnam, P., Arasaratnam, V., Mahendran, S., Balasubramaniam, K. 1996. Formulation of Medium and Recycling of Biomass for Glucoamylase production by *Botryodiplodia theobromae*. *Process Biochem.* 3: 77–80.
- Ncube, E., Flett, B., Waalwijk, C., Viljoen, A. 2011. *Fusarium* spp. and levels of fumonisins in maize produced by subsistence farmers in South Africa. *S. Afr. J. Sci.* DOI: 10.4102/sajs.v107i1/2.367
- Nejad, P., Johnson, P. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control* 18: 208–215.
- Nesci, A., Etcheverry, M., Magan, N. 2004. Osmotic and matric potential effects on growth and compatible solute accumulation in *Aspergillus* section *Flavi* strains from Argentina. *J Appl Microbiol.* 96: 965–972.
- Nelson, P., Toussoun, T., Marasas, W. 1983. (Eds.) *Fusarium Species: An Illustrated Manual for identification*, The Pennsylvania State Univ. Press, University park, PA/London.
- Nelson, E., Burpee, L., Lawton, M. 1994. Biological control of turfgrass diseases. En: *Handbook of integrated Pest management for Turf and Ornamentals*. Leslie, A. (Ed.). P. 409-440.
- Nicholas, A., Jacques, V., Wolf, A., Wittenberger, C. 1985. Does an increase in membrane unsaturated fatty acids account for the stimulation of glycosyl transferase secretion by *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol.* 131: 67-72.
- ONCCA. 2011. Informe exportaciones agroindustriales argentinas. www.oncca.gov.ar/documentos/informe_exportaciones_agroindustriales_argentinas.pdf.
- Ooka, J., Kommedhal, T. 1977. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology.* 67: 1023-1026.
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., Sharon, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolated. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1695-1701.
- Pacin, A., Withchurch, E., Cano, G., Taglieri, D., Ciancio Bovier, E. 2007. Mycotoxins in Argentinian maize in preharvest from 1999 – 2005. En: *Abstract Book ICC International Conference on cereals and cereal products quality and safety*. Rosario, Argentina. P. 116.
- Papst, C., Utz, H., Melchinger, A., Eder, J., Magg, T., Klein, D., Bohn, M. 2005. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. In isogenic Bt vs non Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agron J.* 97: 219 – 224.

- Patzek, T. 2004. Thermodynamics of the corn-ethanol biofuel cycle. *Cri Rev Plant Sci.* 23(6): 519–567.
- Paulitz, T. 1992. Biological control of damping-off diseases with seed treatments. En: Biological control of plant diseases. P. 145-156.
- Pedrol, H., Castellarín J., Ferraguti F., Rosso, O. 2008. Respuesta a la fertilización nitrogenada y eficiencia en el uso del agua en el cultivo de maíz según nivel hídrico. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* N° 40. P. 17 - 20.
- Pereira, P., Nesci, A., Etcheverry, M. 2007. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biol Control.* 42: 281-287.
- Pereira, P., Nesci, A., Etcheverry, M. 2009. Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. *BioControl.* 54: 103-111.
- Pereira, P., Nesci, A., Castillo, C., Etcheverry, M. 2010. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. *Biol Control.* 53: 258–266.
- Pereira, P., Nesci, A., Castillo, C., Etcheverry, M. 2011. Field Studies on the relationship between *Fusarium verticillioides* and maize (*Zea mays L.*): Effect of Biocontrol Agents on Fungal Infection and Toxin Content of grains at harvest. *Int J Agron.* Doi:101155/2011/486914.
- Pietri, A., Piva, G. 2000. Ocurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy. Proceedings of the 6th International Feed Production Conference. Piacenza, Italia. 226 - 236.
- Poolman, B., Glaasker, E. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol.* 29: 397-307.
- Powell, K. 1992. Biocontrol product fermentation, formulation and marketing. *NATO ASI Ser. Ser. A life Sci.* 230: 381-387.
- Presello, D., Botta, G., Iglesias, J., Eyhéabide, H. 2006. Efecto de la severidad de síntomas de podredumbre de espiga causado por *Fusarium verticillioides* sobre el rendimiento y al concentración de fumonisinas en granos de maíz. INTA - EEA Pergamino.
- Price, C. 2000. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. En: Bacterial Stress Responses. Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.). ASM Press, Washington, D.C. P. 179.
- Rao, Y., Tsay, K., Wu, W., Tzeng, Y. 2007. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochem.* 42: 535-541.
- Record, M., Courtenay, E., Cayley, D., Guttman, H. 1998. Responses of *E. Coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem Sci.* 23: 143-148.
- Reed, G., Nagodawithana, T. 1991. yeast technology. 2nd edn. Van Nostrand Reinhold, New York.

- Reid, L., Stewart D., Hamilton R. 1996. A 4-year study of the association between gibberella ear rot severity and deoxynivalenol concentration. *J Phytopathol.* 144: 431-436.
- Rheeder, J., Marasas, W., Vismer, H.. 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 68(5): 2101-2105.
- Rhodes, D. 1993. Formulation of biological control agents. En: Exploitation of Microorganisms. Jones, D.G. (Ed.) London: Chapman & Hall. P. 411-439.
- Ritchie, S., Hanway, J. 1982. How a com plant develops Iowa. State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service Ames, Iowa. Special Report N° 48.
- SAGPyA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos). 1994. Norma de comercialización de maíz 1075/94. Norma XII. Disponible en: <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/postcosecha/basescomercializacionmaiz.pdf>.
- SAGyP (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca) 2001. El cultivo de maíz. Disponible en: <http://www.agricultura.gob.do>.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Debevere, J. 2005. Effect of water activity and temperatura on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *J Food Protec* 68 (5): 1054-1059.
- Sanchis, V., Marin. S., Ramos, A. 2000. Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Rev Iberoam Micol.* 17: S69-S75.
- Sapak, Z., Meon, S., Ahmad, Z. 2008. Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* infection in oil palm. *Int J Agric Biol.* 10: 127-32.
- Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. 2010. Impact of osmotic/matric stress and heat-shock on environmental tolerance induction of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides*. *Res Microbiol.* 161: 681-686.
- Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. 2012 (a). Accumulation of the betaine and ectoine in osmotic stress adaptation of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* in maize. *Agr Sci.* 3(1): 83-89.
- Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M. 2012 (b). Production of *Fusarium verticillioides* biocontrol agents, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans*, using different growth media: evaluation of biomass and viability after freeze-drying. *Food Addit Contam. Part A.* 29(2): 287-292.
- Scher, F., Ziegler, J., Kloepper, J. 1994. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Can J Microbiol.* 30: 151-157.
- Schulthess, k., Cardwell, k., Gounou, S. 2002. The effect to endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lipidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. *Phytopathology* 92(2): 121-128.
- Scott, J. 1989. Seed coatings and treatments and their effects on plant establishment. *Adv Agron.* 42: 23-83.
- Scott, P. 1993. Fumonisins. *Int J Food Microbiol.* 18: 257-270.

- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y calidad Agroalimentaria), 2010. Situación de la producción orgánica en la Argentina durante el año 2009. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3277-informe-estadistico-2009.pdf>
- Shephard, G., Sydenham, E., Thiel, P., Gelderblom, W. 1990. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr.* 13: 2077-2087.
- Shephard, G., Thiel, P., Stockenstrom, S., Sydenham, E. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *JAOAC Int.* 79: 671-687.
- Siddiqui, Y., Meon, S. 2009. Effect of Seed Bacterization on Plant Growth Response and Induction of Disease Resistance in Chilli. *ASC.* 8: 963-971.
- Sikora, R. 1992. Management of the antagonistic potencial in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodos. *Ann Rev Phytopath.* 30: 245-270.
- Smith, D., Onions, A. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi, Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. P. 51.
- Smith, D. 1979. Is a lichen a good model of biological interactions in nutrient-limited environments? En: Strategies of microbial life in extreme environments. Shilo, M. (Ed.) Dahlem Konferenzen, Berlin. P. 291-304.
- Stirling, G. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems, and prospects. CAB International, Wallingford, Oxon, p 282.
- Sydenham, E., Shephard, G., Thiel, P., Marasas, W. 1993. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *J Agr Food Chem.* 41: 891-895.
- Täubel, M. 2005. Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen zur biologischen Inaktivierung von Fumonisinen. Doctoral Thesis. University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria.
- Taylor, A., Harman, G. 1990. Concepts and technologies of select seed treatments. *Annu Rev Phytopathol.* 28: 321-339.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. 1998. Improving ecological fitness and environmental stress tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *J Appl Microbiol.* ISSN 1364-5072.
- Teixidó, N., Cañamas, T.P., Abadías, M., Usall, J., Torres, R., Magan, N., and Viñas, I. 2005. Accumulation of compatible solutes, glycine-betaïne and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross-protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Lett Appl Microbiol.* 41: 248-252.
- Teixidó, N., Cañamas, T., Abadías, M., Usall, J., Solsona, C., Casals, C., Viñas, I. 2006. Improving low water activity and desiccation tolerance of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 by osmotic treatments. *J Appl Microbiol.* 101: 927-937.
- Teixidó, N., Usall, J., Nunes, C., Torres, R., Abadías, M., Viñas, I. 2010. Pre-harvest strategies to control postharvest diseases in pome fruits. En: Post-harvest pathology Series: Plant Pathology in the 21st Century. Prusky, D., Gullino, M. (Eds.). Springer. Vol. 2. P. 89-106

- Torres, A.; Ramos, A.; Soler, J.; Sanchis, V.; Marin, S. 2003. SEM study of water activity and temperatura effects on the inicial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticilliodes* on maize grain. *Int. J Food Microbiol.* 81: 185-193.
- USDA (United States Department of Agricultural), 2012. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Mayo 2012. www.usda.gov/oce/commodity/waste/latest.pdf
- Vandepitte, V., Quataert, P., De Rore, H., Verstraete, W. 1995. Evaluation of the Gompertz function to model survival of bacteria introduced into soil. *Soil Biol Biochem.* 27: 365-372.
- Vandermeer, J. 1995. The ecological basis of alternative agriculture. *Ann Rev Ecol Syst.* 26: 201-224.
- Van Elsas, J., Heijnen, C. 1990. Methods for the introduction of the bacteria into soil. A review. *Biol Fertil Soils.* 10: 127-133.
- Velluti, A., Marin, S., Bettucci, L., Ramos, A., Sanchis, V. 2000. The effect of fungal competition of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *Int J Food Microbiol.* 59: 59-66.
- Vidhyasekaran, P., Muthamilan, M. 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for the control of chickpea wilt. *Plant Dis.* 79: 782-786.
- Vidhyasekaran, P., Sethuraman, K., Rajappan, K., Vasumathi, K. 1997. Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Biol Control.* 8: 166-171.
- Vilich, V., Sikora, R. 1998. Diversity in soil-borne microbial communities - a tool for biological system management of root health. En: *Plant-Microbe Interactions and Biological Control.* P. 1-14.
- Visconti, A. 1996. Fumonisin in maize genotypes grown in various geographic areas. *Adv Exp Med Biol.* 392: 193-204.
- Walter, J., Paau, A. 1993. Microbial Inoculant Production and Formulation. Metting, F. B. (Ed.). En: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural & Environmental Management.* Marcel Dekker, Inc. New York, USA, p 646.
- Warfield, C., Gilchrist, D. 1999. Influence of kernel age on fumonisin B₁ production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microb.* 65: 2853-2858.
- Wesseling, C., Keifer, M., Ahlbom, A., Mc Connell, R., Moon, J., Rosenstock, L. 2002. Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticide among banana workers. *Int. J. Occup Environ Health* 8: 27-34.
- Whipps, J. 1997. Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soil-borne diseases. En: *Modern soil microbiology.* Van Elsas, J., Trevors, J., Wellington, E. (Eds). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel Hongkong. P. 525-545.
- White, D. 1999. Compendium of corn diseases. *Am Phythopatol Soc.* APS.EU. P. 78.
- Whitesides, S., Daoust, R., Gouger, R. 1994. Commercialization of biological control agents: An industry perspective. *Biological Control of Postharvest Diseases, Theory and Practice.* CRC Press Inc. Boca Raton, FL. P. 107.

- WHO (World Health Organization), 2002. Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 906. Geneva. P. 1-62.
- Wickramanayake. 1987. Food and Nutrition Trunpet Publishers, Sri Lanka. P. 80-160.
- Yates, I., Bacon, C., Hinton, D. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium verticillioides* on corn growth and cellular morphology. *Plant Dis.* 81(7): 723-728.
- Yates, I., Jaworshi, A. 2000. Differential growth of *Fusarium verticillioides* relative to tissues from Silver Queen, a sweet maize. *Can J Bot.* 78(4): 472-480.
- Yates, I., Arnold, J., Hinton, D., Basinger, W., Wlcott, R. 2003 *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. *Can J Bot.* 81: 122-128.
- Yates, I., Widstrom, N., Bacon, C., Glenn, A, Hinton, D., Sparks, D., Jaworski, A. 2005. Field performance of maize grown from *Fusarium verticillioides*-inoculated seed. *Mycopathologia* 159: 65-73.
- Yates, I.E., Sparks, D. 2008. *Fusarium verticillioides* dissemination among corn ears of field-grown plants. *Crop Protection.* 27(3-5): 606-613.
- Zhang, L., Wang, Y., Zhang, C., Wang, Y., Zhu, D., Wang, C. 2006. Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *J Biosci Bioeng.* 102: 560- 563.
- Zhao, G., Zhang, G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolatic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol.* 99: 333-338.